

**Н.А. Нідялкова¹, Л.Д. Варбанець¹, В.В. Шепелевич², Зелена П.П.,
Ю.М. Юмина², К.Г. Гаркава³, Л.О. Трошина³**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України, вул. Акад. Д.К. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна;

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 60, Київ, 01033, Україна;

³Національний авіаційний університет,
пр-т Космонавта Комарова, 1, Київ, 03680, Україна

ПРОТЕАЗА *STREPTOMYCES* SP. 12: ОЧИЩЕННЯ І ВЛАСТИВОСТІ

Мета. Оптимізувати умови культивування *Streptomyces* sp. 12 для забезпечення максимального синтезу протеаз, одержати очищений препарат протеази, дослідити її субстратну специфічність, фізико-хімічні властивості та функціональні групи активного центру. **Методи.** Оптимізацію умов культивування за допомогою однофакторних експериментів проводили на базовому середовищі наступного складу(г/л): K_2HPO_4 – 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1; $NaCl$ – 1; $(NH_4)_2SO_4$ – 2; $CaCO_3$ – 2; крохмаль – 10; розчин солей мікроелементів ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 1, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1) – 1 мл. Загальну казеїнолітичну (протеолітичну) активність визначали кількісно за тирозином, що утворюється при гідролізі казеїну під дією досліджуваного ензиму. Для виділення та очищення ензиму застосовували осадження $(NH_4)_2SO_4$ 90% насичення, хроматографію на нейтральних та заряджених TSK-гелях. **Результати.** Встановлено, що оптимальними джерелами карбону, нітрогену і мінерального живлення в поживному середовищі є кукурудзяне борошно, $(NH_4)_2SO_4$ і $CaCl_2$ відповідно. При вирощуванні *Streptomyces* sp. 12 в глибинних умовах культивування протягом трьох діб в 200 мл оптимізованого поживного середовища при початковому значенні рН 7,0, температурі 37°C, швидкості обертання качалки 220 об/хв питома протеолітична активність становила 62,7 од·мг протеїна⁻¹, що в 4,8 рази вище в порівнянні з контролем (базове середовище). Фракціонуванням сульфатом амонію, гель-фільтраційною та іонообмінною хроматографією на TSK-гелях – Toyopearl HW-55, DEAE 650(M) і Sepharose 6B була отримана протеаза *Streptomyces* sp. 12 з питомою активністю 538 од·мг протеїна⁻¹ і виходом 35,8%. Молекулярна маса протеази *Streptomyces* sp. 12 складала ~35,6 кДа. Показано, що ензим проявляє найвищу активність до колагену та менішу – до казеїну, альбуміну і желатину. Інгібування групспецифічними реагентами виявило, що досліджувана протеаза є металопроteaseою з оптимальними умовами дії на колаген при рН 8,0 і температурі 50°C. **Висновки.** Одержана протеаза *Streptomyces* sp. 12 з питомою протеолітичною активністю 538 од·мг протеїна⁻¹, що в 8,6 разів вище, ніж активність в супернатанті культуральної рідини.

Ключові слова: протеаза, *Streptomyces*, оптимізація поживного середовища, культивування, очищення, молекулярна маса

На сьогодні протеази привертають увагу дослідників завдяки тому, що вони виконують багато різноманітних складних фізіологічних функцій. Їх важливість в здійсненні метаболічних і регуляторних функцій підтверджується тим, що вони присутні в усіх формах живих організмів. Внутрішньоклітинні протеази відіграють критичну роль в регуляції метабо-

лізму, в той час як позаклітинні протеази каталізують гідроліз білків, які містяться в позаклітинному середовищі і перетворюють їх у форму, яка здатна легко проникати усередину мікробної клітини. Оскільки мікробну клітину в залежності від умов існування оточують різні білкові субстрати, то і синтезуються різні за специфічністю протеази – широкої специфічності, які гідролізують декілька субстратів, або високо специфічні, які діють виключно на певний субстрат. Пошук протеаз, які гідролізують нерозчинні білки, такі як кератин, колаген, фібрин, еластин, є особливо перспективним в зв'язку зі стійкістю таких субстратів до дії звичайних протеаз, а також для розробки лікарських препаратів, які використовуються в створенні медичних препаратів для лікування трофічних виразок, гнійних ран, опіків, для розчинення фібринових згустків, а також в кардіології.

Серед продуцентів протеаз важливе місце посідають ґрунтові мікроорганізми, які відносяться до різних таксономічних груп, але більшість з них представлена мікроміцетами та стрептоміцетами [1]. Літературні джерела свідчать, що стрептоміцети мають потенційну можливість розкладати різні природні полімери, такі як хітин і пектин. Зацікавленість до цих продуцентів також обумовлена тим, що вони здатні продукувати протеолітичні ензими з різною субстратною специфічністю, які, як показано [2], є безпечними для використання у виготовленні продуктів харчування і лікарських засобів (FDA-approved or GRAS). Крім того, субстратна специфічність позаклітинних протеаз стрептоміцетів є важливим елементом у систематиці цих мікроорганізмів. У зв'язку з цим стає актуальним вивчення умов біосинтезу протеаз стрептоміцетами, одержання очищених ензимних препаратів різної субстратної специфічності, вивчення їх властивостей, що не лише доповнить ряд промислово перспективних продуцентів, але й зробить певний внесок в існуючі на сьогодні дані щодо систематики цих мікроорганізмів.

Раніше [3] у відділі біохімії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України в результаті скринінгу 45 штамів *Streptomyces* sp., виділених з ризосфери різних рослин, було відібрано культуру *Streptomyces* sp. 12, яка відзначалась найвищою протеолітичною активністю. Тому метою роботи було оптимізувати умови культивування *Streptomyces* sp. 12 для забезпечення максимального синтезу протеаз, одержати очищений препарат протеази, дослідити її субстратну специфічність, фізико-хімічні властивості та функціональні групи активного центру.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був штам актинобактерій *Streptomyces* sp. 12, виділений із ризосфери кропиви, який був відібраний раніше в результаті скринінгу [3].

Оптимізацію поживного середовища для накопичення протеаз проводили, використовуючи рідкі середовища: 1) містило наступні компоненти (г/л): K_2HPO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; мальтоза – 1,0; желатин – 10,0; дріжджовий автолізат – 0,15; pH – 6,5-6,7 [4]; 2) крохмало-аміачне середовище (г/л): K_2HPO_4 – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1; NaCl – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2; CaCO_3 – 2; крохмаль – 10; розчин солей мікроелементів ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1) – 1 мл [5]. Культивування проводили в умовах качалки при 220 об/хв. при 28°C

протягом трьох діб. Колби Ерленмейера (750 мл), які містили 150 мл поживного середовища, засівали інокулюмом (10^5 КУО).

Вивчення впливу різних джерел карбону проводили, виключаючи зі складу середовища (яке було встановлено експериментально, а дані наведені в розділі Результати досліджень) крохмаль і замінюючи його вуглець-вмісними сполуками в кількості, еквівалентній вмісту карбону в базовому середовищі та в різних концентраціях (г/л): крохмаль – 5, 10, 15, глюкоза – 10, 50, сахароза – 10, 20, 30, соєве борошно – 10, 20, 30, кукурудзяне борошно – 3,5, 6,5, 10.

Вивчення впливу джерел нітрогену проводили, виключаючи зі складу базового середовища культивування $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, замінюючи його досліджуваною сполукою в кількості, еквівалентній вмісту нітрогену в базовому середовищі. Як джерела нітрогену використовували: сечовину, NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, а також $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в різних концентраціях 1, 2, 4 г/л.

Встановлення значущих елементів мінерального живлення базового середовища проводили, використовуючи Na_2HPO_4 , KHSO_4 , Na_2SO_3 , CaCl_2 , Na_2CO_3 , MgCO_3 і K_2CO_3 . Концентрація їх відповідає концентрації кожного з компонентів в базовому середовищі культивування.

Для дослідження впливу параметрів культивування штам вирощували на відповідному оптимізованому середовищі протягом чотирьох діб, змінюючи початкове рН середовища (6, 7, 8, 9) за допомогою 1 М розчинів NaOH і HCl , а також температуру (28 і 38 °C).

Для накопичення препарату протеаз *Streptomyces* sp. 12 вирощували в 200 мл оптимізованого в результаті досліджень поживному середовищі.

Протеази у *Streptomyces* sp. 12 виділяли з супернатанту, отриманого центрифугуванням культуральної рідини при 5000g впродовж 30 хв, осадженням сульфатом амонію 90% насичення. Осад збирали центрифугуванням при 5000g, 30 хв, розчиняли в 0,01 М Трис- HCl буфері (рН 7,5) та наносили на колонку (2,8×40 см) з нейтральним TSK-гелем – Toyopearl HW-55 (“Toyosoda”, Японія). Врівноваження колонки та елюцію проводили за допомогою 0,01М Трис- HCl буферу (рН 7,5) зі швидкістю витікання 0,85 мл/хв. Білкові фракції, які проявляли протеолітичну активність, відбирали, об’єднували та наносили на колонку (2,5×40 см) з аніонообмінником TSK DEAE 650 (M) (“Toyosoda”, Японія). Елюцію проводили тим же буфером в градієнті хлориду натрію від 0 до 1М, зі швидкістю 0,5 мл/хв.

Встановлення молекулярної маси очищеного ензиму в нативних умовах проводили гель-фільтрацією на колонці (1,5×25 см) з Sepharose 6B (“Pharmacia”, Швеція), врівноваженій 0,01М Трис- HCl буфером (рН 7,5). На колонку наносили 1 мл розчину ензиму. Елюцію проводили тим же буфером; швидкість елюції складала 0,3 мл/хв. Для розрахунку молекулярної маси будували калібрувальну криву, використовуючи білки-маркери (“Pharmacia”, Швеція): бичачий сироватковий альбумін (67,0 кДа), пероксидаза (44,2 кДа), протеїназа К (28,9 кДа), трипсин (24,0 кДа), лізоцим (14,5 кДа).

На всіх етапах дослідження вміст протеїна реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 280 нм. Вміст його визначали за методом Lowry та ін [6]. Інтенсивність забарвлення проб вимірювали при довжині хвилі 750 нм. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Загальну казеїнолітичну (протеолітичну) активність визначали за методом Ансона в модифікації Петрової [7], який базується на кількісному визначенні тирозину, що утворюється при гідролізі казеїну під дією досліджуваних ензимів. В дослідну пробірку додавали 0,5 мл супернатанту культуральної рідини і 0,5 мл 1% розчину казеїну. Контрольна пробірка містила 0,5 мл супернатанту культуральної рідини і 2 мл 4% розчину трихлороцтової кислоти (ТХО). Інкубування проводили на водяній бані при 37 °С 30 хв, після чого в дослідну пробірку вносили 2 мл 4% розчину ТХО, витримували 20 хв при кімнатній температурі та центрифугували при 10000g протягом 5 хв. До 0,5 мл супернатанту додавали 2,5 мл 0,5М розчину Na_2CO_3 і 0,5 мл розведеного реактиву Фоліна (1:3) та витримували 20 хв при кімнатній температурі. Продукти розщеплення визначали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 670 нм. За одиницю активності приймали здатність ензиму за 1 хв при температурі 37°С перетворювати казеїн в неосаджений трихлороцтовою кислотою стан в кількості, що відповідає 1 мкмоль тирозину.

Субстратну специфічність протеази оцінювали, використовуючи такі субстрати: еластин, колаген, фібрин, фібриноген, казеїн, желатин і альбумін [8]. Інкубаційну суміш, яка містила 10 мг субстрату, 2,5 мл 0,01 Трис-НСІ буфера (рН 9,0-10,0) і 1 мл досліджуваного препарату, витримували на водяній бані 3 год при 37°С. Після цього 0,1 мл реакційної суміші переносили в пробірки, які містили 0,5 мл 4 % розчину нінгідрину в суміші з 0,2М цитратним буфером. Інкубування проводили 20 хв на киплячій водяній бані, після чого в охолоджену суміш додавали 5 мл 50% розчину н-пропанолу і витримували 15 хв при кімнатній температурі. Продукти розщеплення визначали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 600 нм. Зі стандартної кривої, побудованою для вільного L-лейцину, визначають еквівалентну кількість мкмолей амінокислот, вивільнених в процесі гідролізу. Одна одиниця активності еквівалентна 1 мкмоль L-лейцину, вивільненому з субстрату за 3 год гідролізу при 37°С.

Для вивчення дії хімічних реагентів на активність ензимів використовували очищений препарат протеази *Streptomyces* sp. 12 з концентрацією протеїна 0,16 мг/мл. Для інгібіторного аналізу застосовували наступні специфічні хімічні реагенти: фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ), дитіотреїтол (ДТТ), 1-етил-3-[3-диметиламінопропіл]карбодіїмід (ЕДК), парахлормеркурібензоат (*p*-ХМБ), N-етилmaleїмід (НЕМ), етиленгліколь тетраоцтова кислота (ЕГТА), динатрієва сіль етилендіамінотетраоцтвої кислоти (трилон Б), L-цистеїн і соєвий інгібітор трипсину. Інкубування їх (в кінцевій концентрації 0,001М) з ензимом проводили при температурі 18-20 °С. Аліквоти для визначення активності ензиму відбирали через 60 хв інкубування. Колагеназну активність ензиму за наявності хімічних реагентів перераховували у відсотках відносно контролю (100%).

Дослідження впливу рН та температури середовища на активність очищеної протеази *Streptomyces* sp. 12 проводили в інтервалі температур від 6 до 80°С та рН від 5,0 до 11,0. Останній створювали 0,05М універсальним фосфатним буфером.

Усі досліди проводили в 5-8 повторностях. Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням критерію Ст'юдента (*t*) [9]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні по-

хибки ($M \pm m$). Обробку результатів, що подані графічно, здійснювали з використанням програми Microsoft Excel 2010. Значення розглядали як достовірні при $p < 0,05$ [10].

Результати досліджень та їх обговорення. Для інтенсифікації синтезу біологічно активних речовин використовуються різні підходи, одним з яких є встановлення сукупності оптимальних зовнішніх факторів, таких як температура культивування, рН середовища, його склад, зокрема природа і концентрація джерел карбону і нітрогену. Для виявлення найбільш придатного для культивування середовища *Streptomyces* sp. 12 вирощували на двох поживних середовищах з різним складом: №1 і №2. Визначення загальної казеїнолітичної активності в супернатанті культуральної рідини *Streptomyces* sp. 12 свідчить, що кращі результати отримані при вирощуванні культури на середовищі №2, де питома активність (13 од·мг протеїна⁻¹) була в 3,4 рази вищою, ніж на середовищі №1 (3,8 од·мг протеїна⁻¹). Тому подальшу оптимізацію умов культивування *Streptomyces* sp. 12 проводили на середовищі №2 (надалі згадується як базове), яке містило крохмаль і $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ як джерела карбону і нітрогену відповідно. Дослідження по оптимізації поживного середовища проводили з використанням різних джерел карбону, нітрогену та мікроелементів. Джерело карбону є надзвичайно важливим компонентом поживного середовища для синтезу протеолітичних ензимів мікроорганізмами, оскільки наявність його впливає на кількість виходу ензиму. В результаті проведення однофакторного експерименту встановлено (рис. 1), що наявність глюкози (в концентрації 50 г/л) і сахарози приводила до пригнічення синтезу протеолітичного ензиму *Streptomyces* sp. 12, а найбільший вплив на питому протеолітичну активність відіграє кукурудзяне борошно в кількості 3,5 г/л, що приводило до підвищення в 1,2 рази активності в порівнянні з контролем (початкове середовище №2). Подібні дані, отримані нами щодо позитивного впливу кукурудзяного борошна на синтез протеаз *Streptomyces*, в літературі не зустрічаються. Є свідчення про використання соєвого борошна і кукурудзяного екстракту [11]. Карбон повинен бути легко доступним для споживання, а також міститись в сировині, яка є економічно вигідною, тобто повинна бути дешевою. Оскільки кукурудзяне борошно є економічно вигідною сировиною, в якій карбон легко доступний для споживання, наступні етапи оптимізації поживного середовища для накопичення ензиму *Streptomyces* sp. 12 проводили, використовуючи кукурудзяне борошно (3,5 г/л).

Вивчення протеолітичної активності в супернатанті культуральної рідини *Streptomyces* sp. 12 за умов додавання до складу поживного середовища різних джерел нітрогену виявило (рис. 2), що максимальна активність відзначалась в присутності $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в концентрації 2 г/л, що в 1,3 рази вище за контроль. Показано, що такі сполуки, як $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, NH_4Cl , NaNO_3 , а також $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в концентрації 1 і 4 г/л знижували синтез протеази відносно контролю.

Отримані результати корелюють з даними інших дослідників [12], які показали, що певні концентрації солей амонію забезпечують швидкий ріст культури *Streptomyces candidus* 91 і в значній мірі впливають на накопичення колагенази в культуральному середовищі.

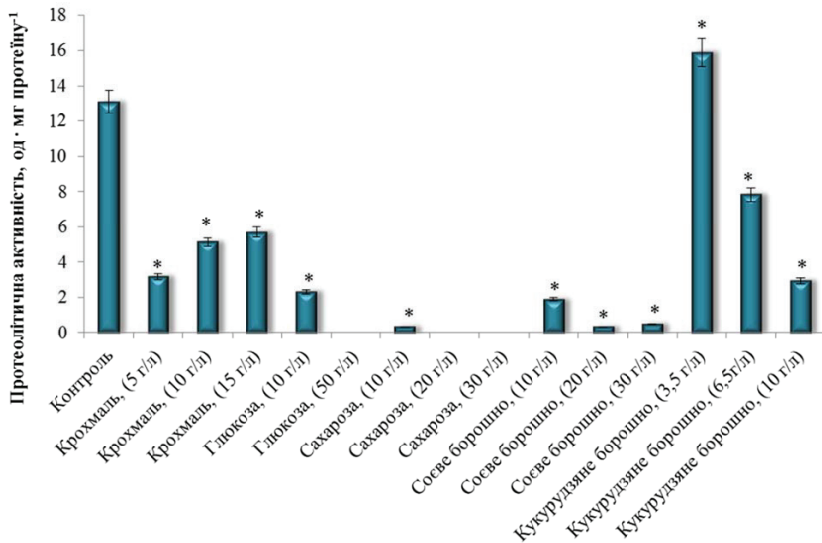


Рис. 1. Рівень протеолітичної активності супернатанту культуральної рідини *Streptomyces* sp. 12 за умов використання різних джерел карбону

Примітка: * – статистично достовірні зміни при $p < 0,05$

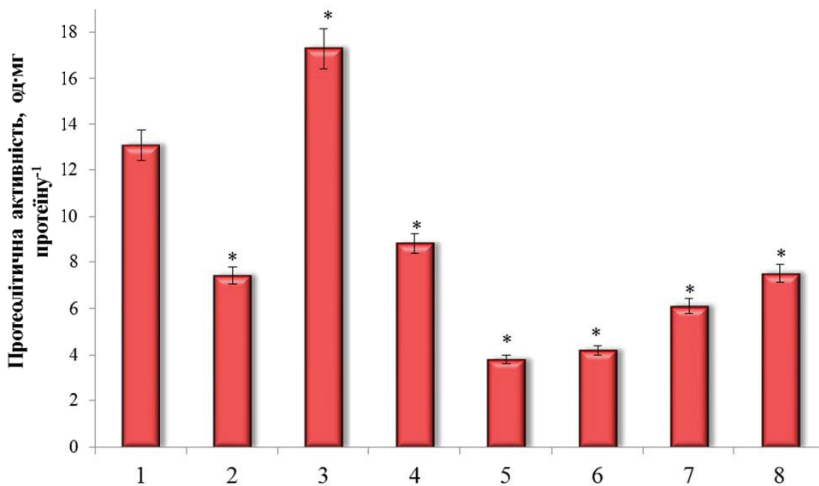


Рис. 2. Рівень протеолітичної активності супернатанту культуральної рідини *Streptomyces* sp. 12 за умов використання різних джерел нітрогену

Примітка: 1 – контроль, 2 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 г/л), 3 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 г/л), 4 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4 г/л), 5 – сечовина (1 г/л), 6 – NaNO_3 (2,5 г/л), 7 – NH_4Cl (1,6 г/л), 8 – $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (1,44 г/л), * – статистично достовірні зміни при $p < 0,05$

Відомо [13, 14], що іони металів в поживному середовищі є важливим фактором, тому що вони можуть служити індукторами синтезу ензимів, зокрема і протеаз. Так, найбільшу роль відіграють іони Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , які беруть участь в підвищенні активності, стабілізації молекули ензиму, захищають її від термічної денатурації, підтримуючи активну конформацію. Для вивчення впливу різних джерел мінерального живлення використовували середовище, яке містило кукурудзяне борошно і $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ як джерела карбону та нітрогену відповідно. В якості джерел мінерального живлення були обрані наступні сполуки на заміну тим, які містились в

вихідному середовищі: Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , Na_2SO_3 , CaCl_2 , MgCO_3 , K_2CO_3 , KHSO_4 , FeCl_2 . Встановлено (рис. 3), що обрані сполуки, крім Na_2CO_3 і MgCO_3 , збільшували питому протеолітичну активність *Streptomyces* sp. 12 на 8,0-41,8 од·мг протеїна⁻¹. Максимальний рівень активності (54,86 од·мг протеїна⁻¹) в 4,2 рази вищий порівняно з контролем, відмічався в присутності CaCl_2 , тому далі він використовувався в складі середовища як джерело мінерального живлення.

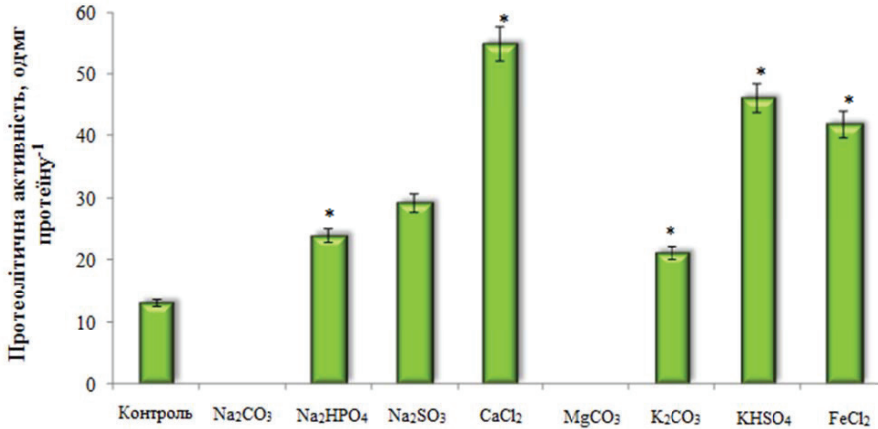


Рис. 3. Рівень протеолітичної активності супернатанту культуральної рідини *Streptomyces* sp. 12 за умов використання різних джерел мінерального живлення

Примітка: * - статистично достовірні зміни при $p < 0,05$

Синтез протеаз залежить також від інших умов культивування, зокрема таких як температура та рН поживного середовища. Зазвичай стрептоміцети вирощують при $t = 28^\circ\text{C}$ та $\text{pH} = 7,2-7,4$. Відповідно до цього було взято декілька різних температур (28°C і 38°C) та значень рН (6,0-9,0) середовища. Показано (табл. 1), що за умов вирощування продуценту при температурі 28°C необхідно використовувати поживне середовище з початковим значенням рН 9,0, а при температурі 38°C – 6,0 або 7,0.

Таблиця 1
Вплив рН і температури вирощування на протеолітичну активність супернатанту культуральної рідини *Streptomyces* sp. 12

Температура, °C	рН	Питома протеолітична активність, од·мг протеїну ⁻¹
28	6	$33,4 \pm 1,67$
	7	$39,6 \pm 1,98$
	8	$45,5 \pm 2,28$
	9	$61,0 \pm 3,05$
38	6	$55,5 \pm 2,78$
	7	$62,7 \pm 3,14$
	8	$37,0 \pm 1,85$
	9	$43,0 \pm 2,15$

Таким чином, для біосинтезу протеази *Streptomyces* sp. 12 найбільш сприятливим виявилось поживне середовище наступного складу (г/л):

K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,0; $NaCl$ – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; $CaCl_2$ – 2,0; кукурудзяне борошно – 3,5, за умов культивування штаму при температурі 38 °C і рН 7,0 в умовах качалки при 220 об/хв. Подібними до наших є результати досліджень протеаз іншого представника актиноміцетів *Saccharomonospora viridis* SJ-21 [15]. Але вони дещо відрізняються від даних, отриманих іншими авторами щодо оптимальних значень рН і температури вирощування *Streptomyces* для накопичення протеаз. Так, в роботах Jain R. і Al-Askara A. A. [16, 17] зазначено, що максимальний синтез протеаз *S. exfoliates* CFS 1068, *S. griseorubens* E44G відбувається при рН 7,0 і температурі 30°C.

При виділенні протеази *Streptomyces* sp. 12 використовували комплексний ензимний препарат, отриманий при осадженні сульфатом амонію (90% насичення) до супернатанту культуральної рідини. Розділенням на TSK Toyopearl HW-55 комплексного препарату було отримано одну фракцію (№3), яка проявляла протеолітичну активність (рис. 4). Решта фракцій не проявляли активності.

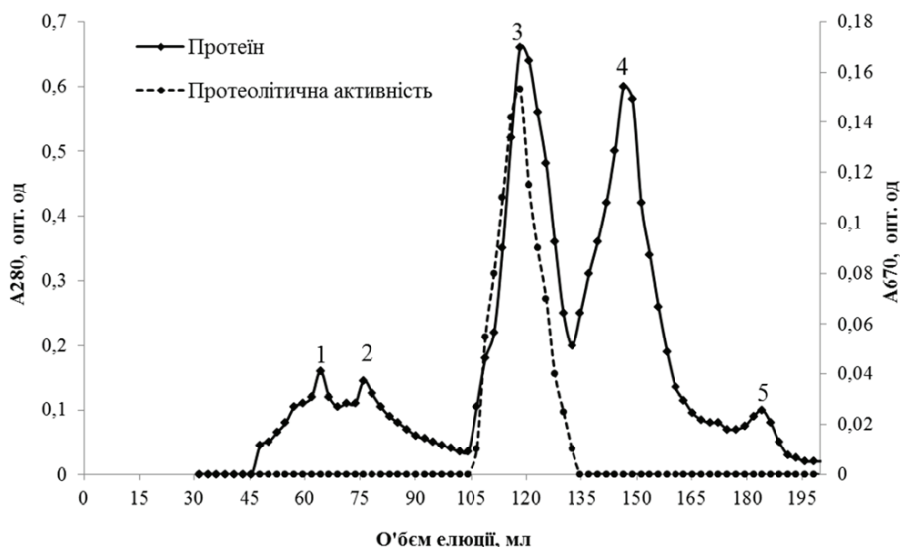


Рис. 4. Профіль елюції на TSK Toyopearl HW-55 комплексного ензимного препарату *Streptomyces* sp. 12

Етапи виділення і очищення протеази *Streptomyces* sp. 12 подано в табл. 2. Показано, що внаслідок гель-фільтрації комплексного ензимного препарату була отримана фракція, протеолітична активність якої в 2,0 рази перевищувала активність супернатанту культуральної рідини.

Досліджувану фракцію, яка проявила протеолітичну активність, піддавали подальшій іонообмінній хроматографії зі ступеневим градієнтом від 0 до 1M $NaCl$ на колонці з аніонообмінником TSK Toyopearl DEAE 650(M). Показано (рис. 5), що ензим виходить окремою фракцією (2) до початку виходу градієнта хлориду натрію, що може бути пов'язано з позитивним сумарним зарядом молекули. Було досягнуто ступінь очищення в 4,9 рази.

Стадії очищення петидази *Streptomyces* sp. 12

Стадія очищення	Об'єм, мл	Загальний вміст протеїна, мг	Протеолітична активність, од	Питома протеолітична активність, од·мг ⁻¹ протеїну ⁻¹	Вихід, %	Ступінь очищення, рази
Супернатант культуральної рідини	1000	2780	174306	62,7	100	1
Осадження сульфатом амонію (90% насичення)	27	1909	159037,5	83,3	91,2	1,3
Гель-фільтрація на TSK HW-55	25,8	904,5	113471	125,5	65,1	2,0
Іонообмінна хрома-тографія	21	265	82055,8	309,6	47,1	4,9
Гель-фільтрація на Sepharose 6B	10,5	116	62400	538	35,8	8,6

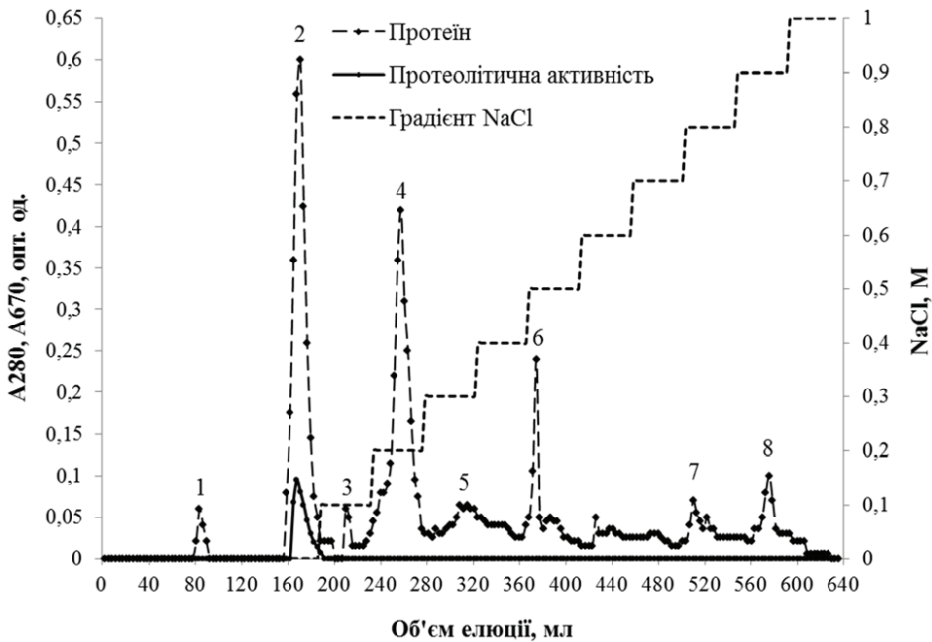


Рис. 5. Профіль елюції фракції 3, одержаної після гель-фільтрації комплексного препарату протеази *Streptomyces* sp. 12, на TSK Toyopearl DEAE 650 (M) зі ступеневим градієнтом від 0 до 1 M NaCl

Подальше очищення фракції 2 на Sepharose 6B призвело до підвищення питомої протеолітичної активності ензиму в 8,6 разів порівняно з вихідною (рис. 6). Підібрана нами схема очищення дозволяє за декілька етапів позбавити протеазу *Streptomyces* sp. 12 від решти протеїнових домішків та досягти значення виходу ензиму 35,8 %.

Із застосуванням протеїнів-маркерів було показано (рис. 7), що молекулярна маса досліджуваної протеази становить близько 35,6 кДа, що ко-

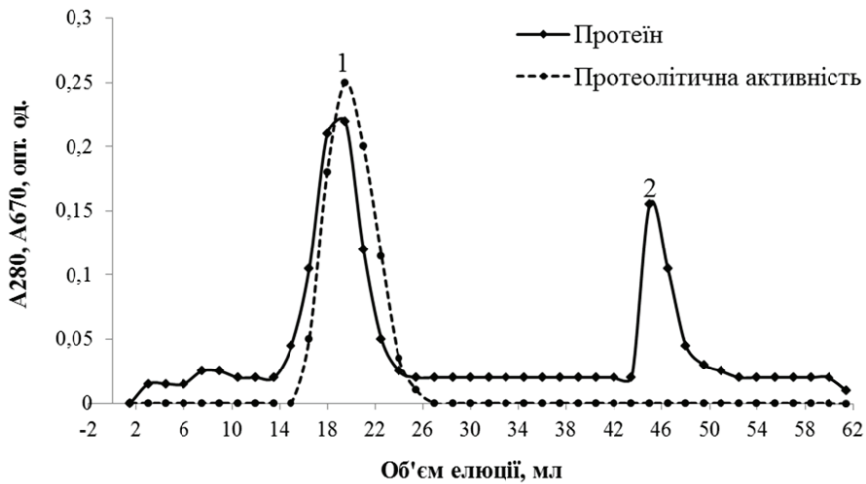


Рис. 6. Профіль елюції фракції 2, одержаної після іонообмінної хроматографії препарату протеази *Streptomyces* sp. 12, на Sepharose 6B

релює з молекулярною масою протеаз з *S. griseorubens* E44G [17]. Проте, як зазначено в роботах багатьох дослідників [16, 18, 19], позаклітинні протеази стрептоміцетів характеризуються молекулярною масою від 14 до 70 кДа.

Важливою характеристикою ензимів, в тому числі і протеаз, є їх субстратна специфічність. Встановлено (рис. 8), що серед взятих в дослід важкорозчинних протеїнів ензим *Streptomyces* sp. 12 проявляє високу специфічність ($100 \text{ од} \cdot \text{мг протеїна}^{-1}$) тільки до колагену. Це може бути обумовлено спорідненістю протеази до амінокислотних залишків Gly і/або Pro, які переважають в структурі молекули колагену. Більш низьку (від 45 до $71 \text{ од} \cdot \text{мг протеїна}^{-1}$) активність проявив ензим *Streptomyces* sp. 12 до

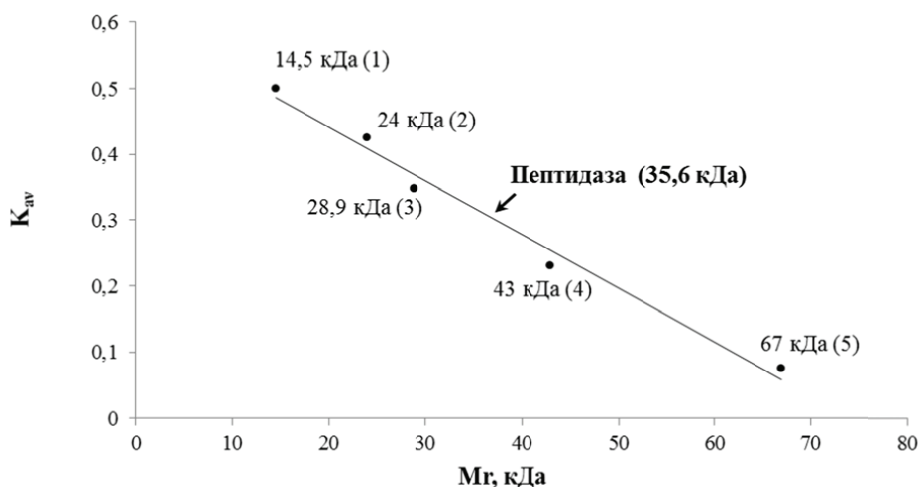


Рис. 7. Визначення молекулярної маси протеази *Streptomyces* sp. 12 в нативних умовах (калібрувальний графік): K_{av} – коефіцієнт розподілення; білки-маркери: лізоцим (1), трипсин (2), протеїназа К (3), пероксидаза (4), бичачий сироватковий альбумін (5)

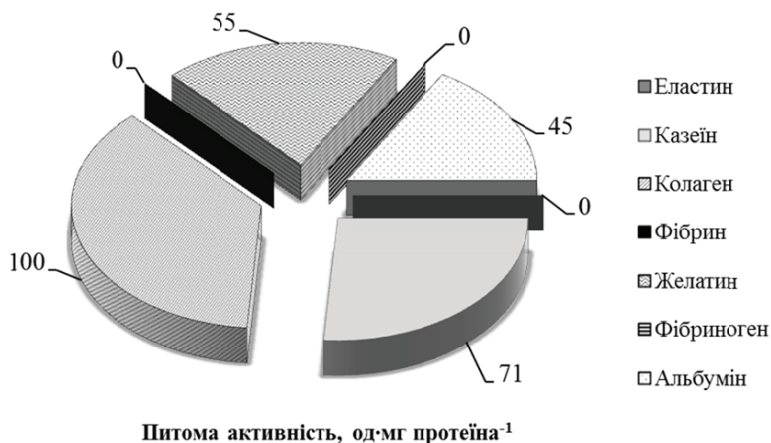


Рис. 8. Активність протеази *Streptomyces* sp. 12 по відношенню до розчинних і нерозчинних протеїнових субстратів

легкорозчинних субстратів – казеїну, желатину і альбуміну. Разом з тим, такі субстрати як еластин, фібриноген і фібрин досліджувану протеаза зовсім не гідролізувала.

Відомо [20], що колагенази мікробного походження застосовують як в харчовій промисловості в процесах дозрівання м'яса, так і для створення фармацевтичних композицій для загоєння та очищення раньових, опікових та інших пошкоджень шкіри. Зважаючи на високу активність протеази *Streptomyces* sp. 12 до колагену, подальші дослідження були спрямовані на вивчення колагеназної активності.

Температура і рН реакційного середовища є обмежувальними факторами для ензиматичної активності. Дослідження впливу температури (20–80 °С) на колагеназну активність протеази *Streptomyces* sp. 12 свідчить, що температура 50°С є оптимальною. Визначення рН-оптимуму дії протеази показало (рис. 9, а), що ензим активно гідролізує колаген в лужній зоні рН з оптимумом при 8,0. Такий рН-оптимум також характерний для колагеназ *Streptomyces exfoliates* CFS 1068, *Streptomyces* sp. 1349, що описано в роботах Jain R. et al. [16], Іванко О.В. [21] та інш.

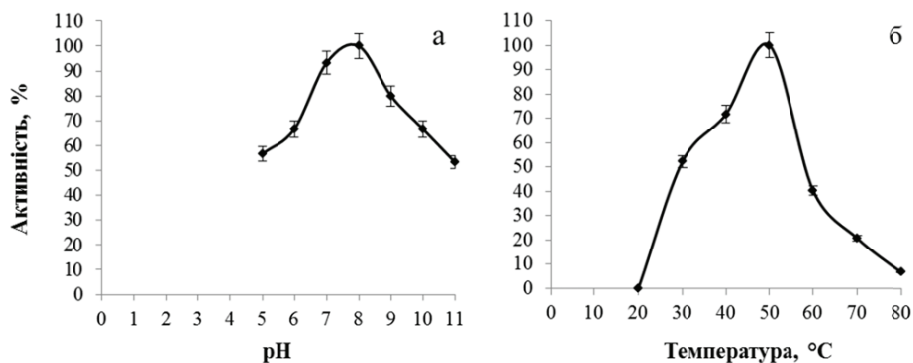


Рис. 9. Залежність колагеназної активності протеази *Streptomyces* sp. 12 від рН (а) і температури (б) реакційного середовища

З літератури відомо [22], що колагеназні протеази поділяються на дві основні групи: металоколагенази та серинові колагенази. Серед бактеріальних продуцентів металопротеази є найбільш розповсюдженими, в той час як серинові та інші протеази рідко зустрічаються.

Проведені нами дослідження впливу групоспецифічних хімічних реагентів (0,01М) показали (рис. 10), що колагеназна активність очищеної протеази *Streptomyces* sp. 12 не пригнічувалась інгібіторами серинових і аспарагінових протеаз, але повністю інгібувалась хелаторами – інгібіторами металопротеаз: о-фенантроліном і ЕДТА. Інкубування дослідженої протеази з *p*-ХМБ також приводило до пригнічення колагеназної активності, що може свідчити про наявність на поверхні молекули ензиму SH-груп, які беруть участь у зв'язуванні та гідролізі високомолекулярних нерозчинних протеїнових субстратів. Таким чином, показано, що протеаза *Streptomyces* sp. 12 належить до групи металопептидаз. Ця властивість також характерна для колагеназних протеаз штамів *S. parvulus* subsp. *citrinus* (IFO 14435), *S. exfoliates* CFS 106, як зазначено в роботах Sakurai Y. [20], Jain R. [23].

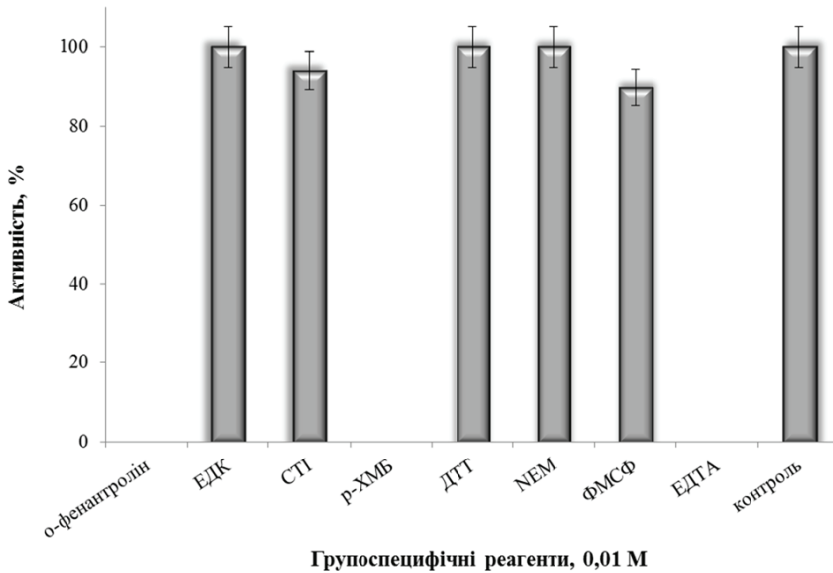


Рис. 10. Вплив групоспецифічних реагентів на активність протеази *Streptomyces* sp. 12

Таким чином, за результатами проведених досліджень можна зробити наступні висновки:

1. Культивування при оптимізованих умовах: вирощування на поживному середовищі наступного складу (г/л): K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,0; NaCl – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; $CaCl_2$ – 2,0; кукурудзяне борошно – 3,5; рН – 7,0, при температурі 38°C дозволили в 4,8 рази підвищити (в порівнянні з контролем, середовище №2) питому протеолітичну активність *Streptomyces* sp. 12, яка складала 62,7 од·мг протеїну⁻¹.

2. Питома протеолітична активність протеази *Streptomyces* sp. 12 після її виділення та очищення складає 538 од·мг протеїну⁻¹, що в 8,6 разів перевищує активність супернатанта культуральної рідини.

3. Вперше показано, що протеаза *Streptomyces* sp. 12 характеризується широкою субстратною специфічністю і гідролізує як легкокорозивні

протеїни казеїн, альбумін і желатин, так і важкорозчинний – колаген, по відношенню до якого ензим проявляє найбільшу активність. Встановлено, що досліджувана протеаза є металопептидазою з молекулярною масою ~35,6 кДа. Оптимальними умовами її дії на колаген є рН 8,0 і температура 50°C.

**Н.А. Нидялкова¹, Л.Д. Варбанец¹, В.В. Шепелевич², П.П. Зеленая²,
Ю.М. Юмина², Е.Г. Гаркавая³, Л.О. Трошина³**

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
НАН Украины, ул. Акад. Д.К. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина;

²Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка,
ул. Владимирская, 60, Киев, 01033, Украина;

³Национальный авиационный университет,
пр-т Космонавта Комарова, 1, Киев, 03680, Украина

ПРОТЕАЗА *STREPTOMYCES* SP. 12: ОЧИСТКА И СВОЙСТВА

Резюме

Цель. Оптимизировать условия культивирования *Streptomyces* sp. 12 для обеспечения максимального синтеза протеаз, получить очищенный препарат протеазы, исследовать её субстратную специфичность, физико-химические свойства и функциональные группы активного центра. **Методы.** Оптимизацию условий культивирования с помощью однофакторных экспериментов проводили на базовой среде следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1; NaCl – 1; $(NH_4)_2SO_4$ – 2; $CaCO_3$ – 2; крахмал – 10; раствор солей микроэлементов ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 1, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1) – 1 мл. Общую казеинолитическую (протеолитическую) активность определяли количественно по тирозину, который образуется при гидролизе казеина под действием исследуемого фермента. Для выделения и очистки фермента использовали осаждение $(NH_4)_2SO_4$ 90% насыщения, хроматографию на нейтральных и заряженных TSK-гелях. **Результаты.** Установлено, что оптимальными источниками углерода, азота и минерального питания в среде культивирования является кукурузная мука, $(NH_4)_2SO_4$ и $CaCl_2$ соответственно. При выращивании *Streptomyces* sp. 12 в глубоких условиях в течение трёх суток в 200 мл оптимизированной питательной среды при начальном значении рН 7,0, температуре 37°C, скорости оборотов качалки 220 об/мин удельная протеолитическая активность составляла 62,7 ед·мг протеина⁻¹, что в 4,8 раз выше по сравнению с контролем (базовая среда). Фракционированием сульфатом аммония, гель-фильтрационной и ионообменной хроматографией на TSK-гелях – Toyopearl HW-55, DEAE 650(M) и Sepharose 6B была получена протеаза *Streptomyces* sp. 12 с удельной активностью 538 ед·мг протеина⁻¹ и выходом 35,8%. Молекулярная масса протеазы *Streptomyces* sp. 12 составляла ~35,6 кДа. Показано, что фермент проявляет самую высокую активность к коллагену и меньшую – к казеину, альбумину и желатину. Ингибирование группоспецифическими реагентами выявило, что исследованная протеаза является металлопротеазой с оптимальными условиями действия на коллаген при рН 8,0 и температуре 50°C. **Выводы.** Получена протеаза *Streptomyces* sp. 12 с удельной протеолитической активностью 538 ед·мг протеина⁻¹, что в 8,6 раз выше, чем активность в супернатанте культуральной жидкости.

Ключевые слова: протеаза, *Streptomyces*, оптимизация питательной среды, культивирование, очистка, молекулярная масса

**N.A. Nidialkova¹, L.D. Varbanets¹, V.V. Schepelevich², P.P. Zelena²,
Yu.M. Yumina², E.G. Garkavaya³, L.O. Troshina³**

¹*Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Science of Ukraine,
154 Acad. D.K. Zabolotnogo Str., Kyiv, 03143, Ukraine;*

²*Taras Shevchenko Kyiv National University, 60 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine;*

³*National Aviation University, 1 Kosmonavta Komarova, Kyiv, 03058, Ukraine*

STREPTOMYCES SP. 12 PROTEASE: PURIFICATION AND PROPERTIES

Summary

Aim. To optimize the cultivation conditions of *Streptomyces* sp. 12 for providing a maximum synthesis of proteases, to obtain a purified preparation of the protease, to investigate its substrate specificity, physico-chemical properties and functional groups of the active site. **Methods.** Optimization of cultivation conditions using single-factor experiments were carried out on the base medium of the following composition (g/l): K_2HPO_4 – 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1; NaCl – 1; $(NH_4)_2SO_4$ – 2; $CaCO_3$ – 2; starch – 10; microelements salt solution ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 1, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1) – 1 ml. Total caseinolytic (proteolytic) activity was quantitatively determined on tyrosine, which is formed by hydrolysis of casein under the action of the investigated enzyme. To isolate and purify the enzyme it is used precipitation by $(NH_4)_2SO_4$ (90% saturation), chromatography on neutral and charged TSK-gels. **Results.** It is established that optimal sources of carbon, nitrogen and minerals in the nutritious medium are corn meal, $(NH_4)_2SO_4$ and $CaCl_2$ respectively. The growth of *Streptomyces* sp. 12 was carried out in submerged conditions during 3 days in 200 ml of the optimized nutritious medium at initial value of pH 7.0, temperature 37°C, 220 rpm. The specific proteolytic activity was 62.7 U·mg of protein⁻¹, which is 4.8-fold higher than in the control (base medium). Using fractionation by sulphate ammonium, gel-filtration and ion-exchange chromatography on TSK-gels – Toyopearl HW-55, DEAE 650(M) and Sepharose 6B, *Streptomyces* sp. 12 protease with specific activity 538 U·mg of protein⁻¹ and yields 35.8 % was obtained. Mr of *Streptomyces* sp. 12 protease is ~35.6 кДа. It is shown that enzyme displays highest activity toward collagen and less activity toward casein, albumin and gelatin. Inhibition by group-specific reagents revealed that the tested protease is metalloprotease with optimal conditions of action on collagen at pH 8.0 and temperature 50°C. **Conclusions.** The obtained *Streptomyces* sp. 12 protease was characterized by specific proteolytic activity 538 U·mg of protein⁻¹ that 4.8-fold higher than activity in the supernatant of culture liquid.

Key words: protease, *Streptomyces*, optimization of nutrient medium, cultivation, purification, molecular weight.

1. Varbanets LD, Matseliukh EV. Peptidases of microorganisms and methods of their investigations. Kyiv: Naukova Dumka; 2014. Russian.
2. Hosseini SV, Saffari Z, Farhanghi A, Atyabi SM, Norouzi D. Kinetics of alkaline protease production by *Streptomyces griseoflavus* PTCC1130. Iran J Microbiol. 2016; 8(1):8-13.
3. Varbanets LD, Matseliukh EV, Gudzenko OV, Nidialkova NA, Zelena PP, Yumina YuV, et al. [Screening of α -L-rhamnosidases and peptidases among actinobacterium and bacilli]. Mikrobiol. Z. 2016; 38(3):26-35. Ukrainian.
4. Koltukova NV, Vaskivniuk VT. [Selection of methods for the isolation of the proteolytic complex from *Bacillus mesentericus* 316m at deep cultivation]. Mikrobiol. Z. 1980; 42(2):245-248. Russian.

5. Zhukova RA, Kommunar'skaya AD, Pronina MI, Tereshin IM, Zhuravleva NP, Shabas MN. Selection Methods of producers of antibiotics and enzymes. Leningrad: Meditsina. 1978. Russian.
6. Lowry OH, Rosebrough HJ, Faar AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193(1):265-275.
7. Petrova IS, Vintsyunaite MN. [Determination of the proteolytic activity of the enzyme preparations of microbial origin]. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 1966; 2(1):322-327. Russian.
8. Mandl I. Collagenase. Science. 1970; 169(3951):1234-1238.
9. Lakin GF. Biometrics. Moscow: Vysshaya Shkola; 1990. Russian.
10. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statistical methods in medical and biological research with the use of «Excel». Kyiv: Morion; 2001. Russian.
11. Silva GMM, Bezerra RP, Teixeira JA, Porto TS, Lima-Filho JL, Porto ALF. Fibrinolytic protease production by new *Streptomyces* sp. DPUA 1576 from Amazon lichens. Electronic J. Biotech. 2015; 18(1):16-19.
12. Kabadjova P, Vlahov S. Regulation of Extracellular Collagenase Production in *Streptomyces candidus* 91. Biotech. Biotechnol. Equip. 1997; 11(1-2):39-46.
13. Sevinc N, Demirkan E. Production of Protease by *Bacillus* sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties. J. Biol. Environ. Sci. 2011; 5(14):95-103.
14. Jisha VN, Smitha RB, Pradeep S, Sreedevi S, Unni KN, Sajith S, et al. Versatility of microbial proteases. Advances in Enzyme Research. 2013; 1(3):39-51.
15. Jani SA, Chudasama CJ, Patel DB, Bhatt PS, Patel HN. Optimization of Extracellular Protease Production from Alkali Thermo Tolerant Actinomycetes: *Saccharomonospora viridis* SJ-21. Bull. Environ. Pharmacol. 2012; 1(6):84-92.
16. Jain R, Jain PC. Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliates* CFS 1068 using poultry feather. J. Exp. Bio. 2010; 48:174-178.
17. Al-Askara AA, Rashadb YM, Hafezc EE, Abdulkhaird WM, Bakae ZA, Ghoneemf KM. Characterization of alkaline protease produced by *Streptomyces griseorubens* E44G and its possibility for controlling *Rhizoctonia* root rot disease of corn. Biotech. Biotechnol. Equip. 2015; 29(3):457-462.
18. Sakurai Y, Inoue H, Nishii W, Takahashi T, Iino Y, Yamamoto M., et al. Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces parvulus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009; 73(1):21-28.
19. Mitra P, Chakrabartty PK. An extracellular protease with depilation activity from *Streptomyces nogalator*. J. Sci. Ind. Res. 2005; 64:978-983.
20. Pal GK, Suresh PV. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. RSC Adv. 2016; 6:33763-33780.
21. Ivanko OV, Varbanets LD, Valagurova OV. [Collagenase activity of *Streptomyces* sp. 1349]. Mikrobiol. Z. 2002; 64(6):21-27. Ukrainian.
22. Abdel-Fattah AM. Production and partial characterization of collagenase from marine *Nocardiosis dassonvillei* NRC2aza using chitin wastes. Egypt. Pharm. J. 2013; 12(2):109-114.
23. UmaMaheswari T, Hemalatha T, Sankaranarayanan P, Puvanakrishnan R. Enzyme therapy: current perspectives. Ind. J. Exp. Biol. 2016; 54:7-16.

Отримано 02.09.2016