

КЕРАТИНОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ АНТАРКТИЧНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ

К.В. Авдіюк¹, Л.Д. Варбанець¹, А.Є. Березкіна^{2,3}, А.Ю. Утєвський^{2,3}

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

²ДУ Національний антарктичний науковий центр МОН України,
бульв. Тараса Шевченка, 16, Київ, 01601, Україна

³Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,
майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна
e-mail: varbanets_imv@ukr.net

Щорічно в оточуюче середовище як побічний продукт агропромислової переробки потрапляють мільйони тонн кератинвмісної сировини у вигляді пір'я, вовни, волосся та ін., яка важко розщеплюється звичайними протеазами, такими як пепсин, трипсин і папаїн. Тому пошук ефективних продуцентів кератинолітичних ензимів, які змогли б розщепити ці важкодоступні білки, є актуальною темою досліджень. **Мета.** Дослідити здатність бактеріальних ізолятів, які були виділені з м'яких тканин і кишкової трубки молюсків *Nacella concinna*, відібраних поблизу Української антарктичної станції "Академік Вернадський", виявити казеїнолітичну і кератинолітичну активності. **Методи.** Об'єктами досліджень були 21 бактеріальний ізолят. Культури вирощували на 4 рідких поживних середовищах, які відрізнялись за джерелом вуглецю і азоту, а також наявністю або відсутністю NaCl. Ензиматичні активності визначали у супернатанті культуральної рідини. Для визначення кератинолітичної і казеїнолітичної активності як субстрату використовували знежирене пір'я та казеїн відповідно. **Результати.** Показано, що найвищий рівень казеїнолітичної активності демонстрували бактеріальні ізоляти 13c/6 та 15c/1, виділені з кишкової трубки молюсків за температури не лише 19° С (0,082 Од/мл і 0,027 Од/мл відповідно), а і 28° С (0,074 Од/мл і 0,064 Од/мл відповідно). Найвищий рівень кератинолітичної активності за температури 19° С виявляли культури 16b/2, 17b/1 і 10b/2 (15 Од/мл, 14 Од/мл і 8 Од/мл), виділені з м'яких тканин, і культури 9c/3, 5c/1 (14 Од/мл, 7 Од/мл відповідно), виділені з кишкової трубки молюсків. За температури 28° С найвищу кератинолітичну активність проявляли бактеріальні ізоляти 6c/1 і 2b/5 (9 Од/мл і 8 Од/мл відповідно), виділені з кишкової трубки і м'яких тканин молюсків. Найчастіше кератинолітична активність була виявлена у культур, виділених з молюсків, які були відібрані з протоки *Skua Creek* (13c/6, 15c/1, 16b/2 і 17b/1) і каналу *Meek* (2b/5, 5c/1, 6c/1, 9c/3). **Висновки.** За температури 28° С більша кількість культур синтезує ферменти з кератинолітичною активністю (від 1 до 9 Од/мл), однак за температури 19° С рівень цієї активності значно вищий (від 1 до 15 Од/мл). Показано, що лише 5 бактеріальних ізолятів при вирощуванні за температури 28° С виявляли казеїнолітичну активність на рівні від 0,011 до 0,074 Од/мл, в той час, як за температури 19° С значно більша кількість (10) культур її проявляла (від 0,01 до 0,082 Од/мл).

Ключові слова: бактеріальні ізоляти, молюски (*Nacella concinna*), Антарктика, кератинолітична активність, казеїнолітична активність.

Мікроорганізми – найдавніші живі істоти на Землі, які з'явилися майже 3–4 млрд років тому. Вони є найчисельнішою і найрізноманітнішою частиною біосфери. Мікроорганізми можна виявити всюди: в краплині навіть самої чистої джерельної води, в крупинках ґрунту, в повітрі, на скелях, в пісках пустель, на дні океану і навіть у видобутій з великих глибин нафті. Вони

живуть в гарячих джерелах, температура яких сягає +85 – +122° С (*Methanopyrus kandleri*), і в льодах Антарктики за температури –83° С [1–3].

Антарктика – це п'ятий за величиною континент, 99% площі якого вкрито льодом і лише 1% займають області, вільні від льодовика, в яких зустрічається більшість представників

рослинного і тваринного світів [4–6]. Весь інший простір Антарктики заселяють мікроорганізми, які навіть за таких екстремальних кліматичних умов як поєднання низької температури і сухості, сильних та тривалих вітрів, високої сонячної радіації здатні не тільки вижити, але й синтезувати холодоактивні ферменти з високою питомою активністю як стратегію виживання за низьких температур [7]. Унікальні властивості, які виявляють адаптовані до холоду ферменти бактерій, роблять їх ідеальними моделями як для фундаментальних досліджень, так і для розробки нових біотехнологій їх використання в промислових великомасштабних процесах, таких як виготовлення мийних засобів, продуктів харчування, реактивів для молекулярної біології, антибіотиків, косметики та ін. [2, 8–10]. Тому дослідження, пов'язані з вивченням мікросвіту Антарктики та вивченням особливостей їх пристосування до несприятливих умов оточуючого середовища, є актуальними питаннями сьогодення, які привертають до себе увагу багатьох вчених.

Метою даної роботи було вивчити здатність мікроорганізмів, які були виділені з моллюсків *Nacella concinna*, **синтезувати протеолітичні ферменти з казеїнолітичною і кератинолітичною активностями.**

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були бактеріальні ізоляти (21 шт.), виділені з м'яких тканин та кишкової трубки червоногих моллюсків *Nacella concinna* (*Nacellidae*). Моллюски були зібрані в березні 2019 року під час підводних досліджень в акваторії Української антарктичної станції “Академік Вернадський” (Argentine Islands, Graham Land) на глибинах від 1 м до 10 м. Температура води становила від -1° до $+1^{\circ}$ C (в залежності від глибини), солоність – 32.5 ‰.

Мікроорганізми з моллюсків *Nacella concinna* виділяли наступним чином: у боксі біля пальника розтирали у стерильній ступці м'які тканини моллюска (або кишкову трубку моллюска, що була попередньо стерильно відпрепарована) у стерильному сольовому розчині, який є сольовою частиною середовища Marine Agar наступного складу (г/л): NaCl – 19.45, MgCl₂ – 8.8, Na₂SO₄ – 3.24, CaCl₂ – 1.8, KCl – 0.55, NaHCO₃ – 0.16. Методом серійних розведень було здійснено посів суспензії мікроорганізмів (з м'яких тканин моллюска, їх кишкових

трубок) на модифіковане поживне середовище Marine Agar наступного складу (г/л): пептон – 5.0, дріжджовий екстракт – 1.0, FeC₆H₅O₇ – 0.1, NaCl – 19.45, MgCl₂ – 8.8, Na₂SO₄ – 3.24, CaCl₂ – 1.8, KCl – 0.55, NaHCO₃ – 0.16, KBr – 0.08, H₃BO₃ – 0.022, K₂HPO₄ – 0.08, NH₄NO₃ – 0.016, SrCl₂ – 0.034, агар-агар – 15.0, pH середовища 7,5 (стерилізація середовища при 0,5 атм), яке використовується для виділення та культивування широкого спектру морських гетеротрофних бактерій. У методі серійних розведень також використовували сольову частину середовища Marine Agar.

Мікроорганізми вирощували за кімнатної температури (у діапазоні від $+18^{\circ}$ до $+22^{\circ}$ C).

З усіх зразків на середовищі Marine Agar були виділені мікроорганізми у кількості в середньому 10^5 КУО/г. Чисті культури бактерій з різною морфологією колоній та клітин були виділені для подальших досліджень.

Об'єктами досліджень були ізоляти бактерій, виділені з моллюсків, які відбирали на різній глибині (табл. 1).

Для вивчення протеолітичної активності культури мікроорганізмів вирощували у великих пробірках (V=50 мл) на качалці зі швидкістю обертання 220 об/хв за температури 19° C і 28° C протягом 3–6 діб на рідких середовищах наступного складу (г/л): ПС 1: мальтоза – 1.0, желатин харчовий – 10.0, KH₂PO₄ – 1.6, MgSO₄ × 7H₂O – 0.75, ZnSO₄ × 7H₂O – 0.25, (NH₄)₂SO₄ – 0.5, дріжджовий автолізат – 0.15, дистильована вода – до 1л, pH 7,0–7,2; ПС 2: NaCl – 0.5, KH₂PO₄ – 0.7, K₂HPO₄ – 1.4, MgSO₄ × 7H₂O – 0.1, знежирене куряче пір'я – 10.0, дистильована вода – до 1л, pH 7,0–7,2; ПС 3: ПС 1 + 19,45 г/л солі; ПС 4: ПС 2 + 19,45 г/л солі. Культуральну рідину центрифугували при 7000 г протягом 10 хв, отриману надосадову рідину (супернатант культуральної рідини, СКР) використовували для подальших досліджень.

Казеїнолітичну (загальну протеолітичну) активність визначали методом Ансона в модифікації Петрової [11], який базується на кількісному визначенні тирозину, що утворюється при ензиматичному гідролізі казеїну під дією досліджуваних ферментів. У дослідну пробірку додавали 0,5 мл СКР і 0,5 мл 1% казеїну. Контрольна пробірка містила 0,5 мл СКР і 2 мл 4% трихлороцтової кислоти (ТХО). Інкубування проводили на водяній бані при 37° C 30 хв, після чого в дослідну пробірку вносили 2 мл 4% ТХО,

Таблиця 1

Місця відбору і виділення бактеріальних ізолятів

Місце відбору молюсків	Місце виділення бактеріальних ізолятів	Глибина, м	Номер бактеріального ізоляту
I. Канал Мек (Meek Channel, о. Гротто)	кишкова трубка молюска	h=1 м	6c/1
		h=5 м	5c/1, 5c/2
		h=8 м	9c/3
	м'які тканини молюска	h=8 м	2b/3, 2b/5, 8b/2, 8b/3
		h=10 м	6b/2
II. Протока Skua Creek (Аргентинські острови)	кишкова трубка молюска	h=3 м	15c/1, 15c/4
		h=6 м	13c/6
	м'які тканини молюска	h=3 м	17b/1
		h=5 м	16b/2
		h=6 м	12b/2
III. Протока Stella Creek	кишкова трубка молюска	h=1 м	16c/1, 16c/2
	м'які тканини молюска	h=1 м	13b/1
IV. Акваторії мису Marina Point	кишкова трубка молюска	h=10 м	10c/1
		h=5 м	10b/2
	м'які тканини молюска	h=10 м	7b/1

витримували 20 хв за кімнатної температури і центрифугували при 10000 g протягом 5 хв. До 0,5 мл СКР додавали 2,5 мл 0,5 М Na_2CO_3 і 0,5 мл розведеного реактиву Фоліна (1:3), витримували 20 хв за кімнатної температури. Продукти розщеплення визначали на спектрофотометрі СФ-26 за довжини хвилі 670 нм (кювета 10 мм). Активність виражали в одиницях, які відповідали кількості мкмоль тирозину, що вивільнився з казеїну при ферментативному гідролізі за 1 хв в умовах досліду.

Кератиназну активність (КерА) визначали за поглинанням в УФ при 280 нм продуктів гідролізу кератинвмісної сировини. Реакційну суміш, що складалася з 10 мг подрібненого знежиреного пір'я, 2,5 мл 0,05 М борно-боратного буфера (рН 9.2) і 1 мл культуральної рідини, витримували в термостаті при 37° С протягом 3 год, після чого її фільтрували. При визначенні КерА використовували два контролі: 10 мг подрібненого знежиреного пір'я, 2,5 мл 0,05 М борно-боратного буфера (рН 9.2) і 1 мл дистильованої води (1); 2,5 мл 0,05 М борно-боратного буфера (рН 9.2) і 1 мл культуральної рідини (2). Зі значень A_{280} , одержаних при вимірюванні оптичної густини фільтратів, віднімали суму двох контролів. Збільшення абсорбції при 280 нм фільтрату досліджуваного зразка відносно контролів було прийнято як ступінь вивільнення білка [12]. За одиницю кератиназної (1 Од/мл = 0.01) активності приймали кількість ферменту, що викликає збільшення абсорбції на 0.01 за 3 год інкубування.

Усі досліди проводили у 3–5 повторностях. Аналіз одержаних результатів проводився шляхом їх статистичної обробки з використанням *t*-критерію Стьюдента. Результати, що подані графічно, отримували за допомогою програми Microsoft Excel 2016.

Результати. На сьогодні є значна кількість робіт, присвячених дослідженню антарктичних бактерій, які були виділені з різних екологічних ніш, включаючи ґрунт, повітря, гірські породи, осад, воду озер, океанів, пір'я пінгвінів [2, 8, 10, 13]. Джерелами виділення 21 бактеріального ізоляту, які досліджувались в цій роботі, були кишкова трубка молюска *Nacella concinna* (ізоляти 9c/3, 10c/1, 5c/2, 13c/6, 15c/4, 15c/1, 5c/1, 6c/1, 16c/1, 16c/2) та м'які тканини молюска *Nacella concinna* (ізоляти 12b/2, 10b/2, 17b/1, 2b/5, 13b/1, 6b/2, 8b/3, 16b/2, 2b/3, 8b/2, 7b/1).

Фарбування за Грамом показало, що більшість досліджених культур були грамнегативними паличками (12b/2, 10c/1, 2b/5, 13c/6, 6b/2, 8b/3, 2b/3, 8b/2, 5c/1, 6c/1, 16c/1, 16c/2) та коками (9c/3, 5c/2, 17b/1, 15c/4, 16b/2) і лише чотири з них – грампозитивними коками (10b/2, 13b/1, 15c/1, 7b/1).

Вирощування досліджуваних бактеріальних ізолятів проводили на різних видах рідкого середовища за двох температур: 19° С і 28° С. За температури 28° С більша кількість культур (17) синтезувала ферменти з кератинолітичною активністю, ніж за температури 19° С (рис. 1).

Так, на середовищі ПС 1 продукування ензимів з кератинолітичною активністю спостерігалось у 13 культур. Більш високий рівень кератинолітичної активності на ПС 1 був характерним для ізолятів: 6с/1 (9 Од/мл), 2b/5 (8 Од/мл), 2b/3 (5,5 Од/мл), 13b/1 (5 Од/мл). Одночасно культури 5с/2, 7b/1, 9с/3, 10b/2, 10с/1, 12b/2, 15с/1, 16с/2, 17b/1 виявляли активність в межах 1–3 Од/мл (рис.1). Внесення ж солі у дане поживне середовище 1 (ПС 3) спричинило синтез ензимів або з більш високою (у 1,5–2 рази) кератинолітичною активністю порівняно з ПС 1, як у випадку культур 8b/2 (1 Од/мл), 12b/2 (2 Од/мл), 15с/1 (3 Од/мл) і 16с/2 (3 Од/мл), або ж активність не змінювалась (17b/1).

На поживному середовищі 2 (ПС 2), яке, окрім мінеральних солей, містило лише куряче пір'я як єдине джерело вуглецю і азоту, а також як індуктор синтезу кератиназ, рівень активності у 8 культур (2b/5, 9с/3, 10b/2, 12b/2, 13b/1, 15с/4, 16с/1, 16с/2) складав від 1 до 4 Од/мл. Модифікація середовища ПС 2 шляхом додавання солі (ПС 4) позитивно вплинула на рівень кератинолітичної активності бактеріальних ізолятів. Так, у культурі 2b/5 її рівень зріс на 5 Од/мл порівняно з активністю на ПС 2, а у культур 5с/1, 6с/1, 10с/1 і 15с/1 – від 0 Од/мл на ПС 2 до 3, 6, 3 і 1 Од/мл – на ПС 4 відповідно (рис. 1).

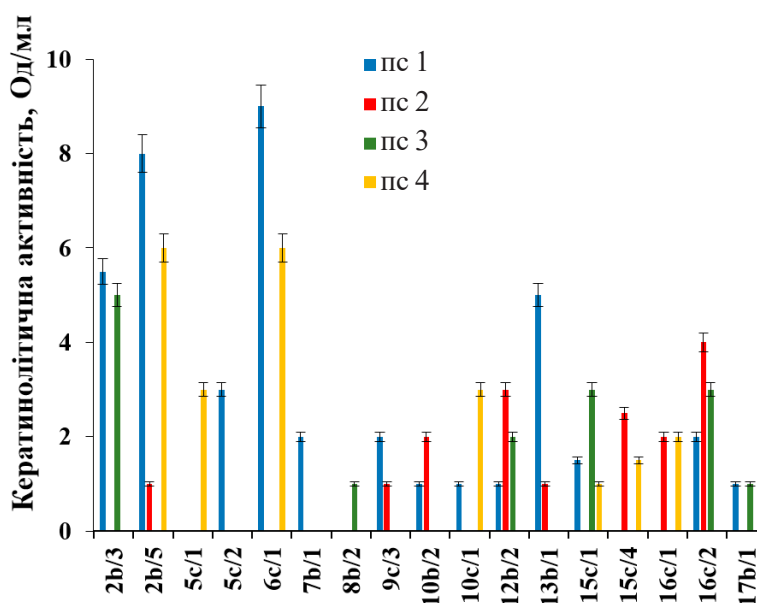


Рис. 1. Кератинолітична активність бактеріальних ізолятів при вирощуванні на різних поживних середовищах при температурі культивування 28° С

При вирощуванні бактеріальних ізолятів на чотирьох поживних середовищах за температури 19° С було показано, що лише 11 культур синтезували ензими з кератинолітичною активністю (рис. 2), однак її рівень був вищим, ніж за температури 28° С. Так, культура 16b/2 на ПС 4 продукувала фермент з кератинолітичною активністю на рівні 15 Од/мл, культури 9с/3 на ПС 1 і 17b/1 на ПС 2 – на рівні 14 Од/мл, культури 10b/2 і 5с/1 на ПС 2 – на рівні 8 і 7 Од/мл відповідно. Інші 6 культур синтезували ензими з активністю на рівні від 1 до 4 Од/мл.

Отже, за температури 28° С більша кількість культур синтезує ферменти з кератинолітичною активністю, однак за температури 19° С рівень цієї активності значно вищий.

Дослідження казеїнолітичної активності показало, що лише 5 бактеріальних ізолятів виявляли значний рівень казеїнолітичної активності (2b/5, 12b/2, 13с/6, 15с/1, 16с/1) – від 0,011 до 0,074 Од/мл при вирощуванні за температури 28° С (рис. 3). Значно більша кількість (10) бактеріальних культур синтезувала ензими з казеїнолітичною активністю (від 0,01 до 0,082 Од/мл) за температури 19° С (рис. 4).

Як свідчать результати досліджень, не завжди високий рівень загальної протеолітичної (казеїнолітичної) активності співпадає зі значним рівнем кератинолітичної активності. Так, бактеріальна культура 13с/6 при вирощуванні на ПС 3 за температури 28° С проявляла казеїнолітичну активність на рівні 0,074 Од/мл і

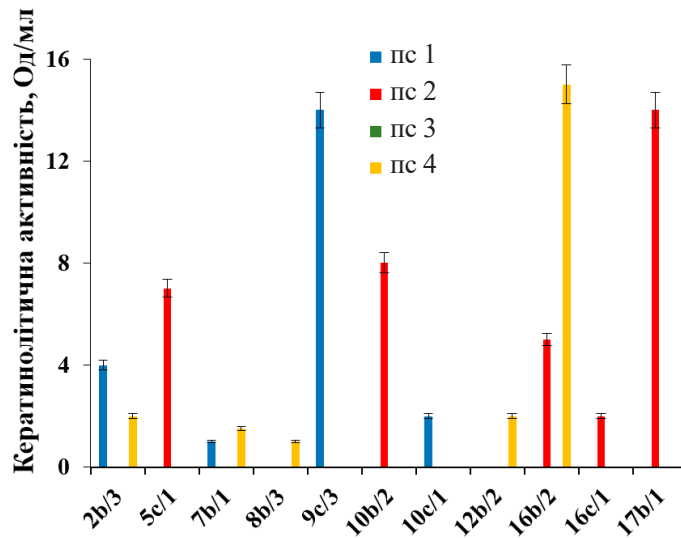


Рис. 2. Кератинолітична активність бактеріальних ізолятів при вирощуванні на різних поживних середовищах при температурі культивування 19° С

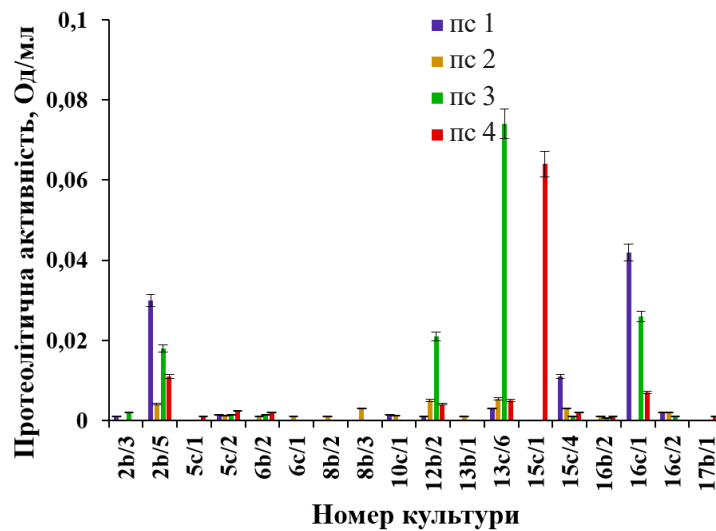


Рис. 3. Загальна протеолітична активність бактеріальних ізолятів при вирощуванні на різних поживних середовищах при температурі культивування 28° С

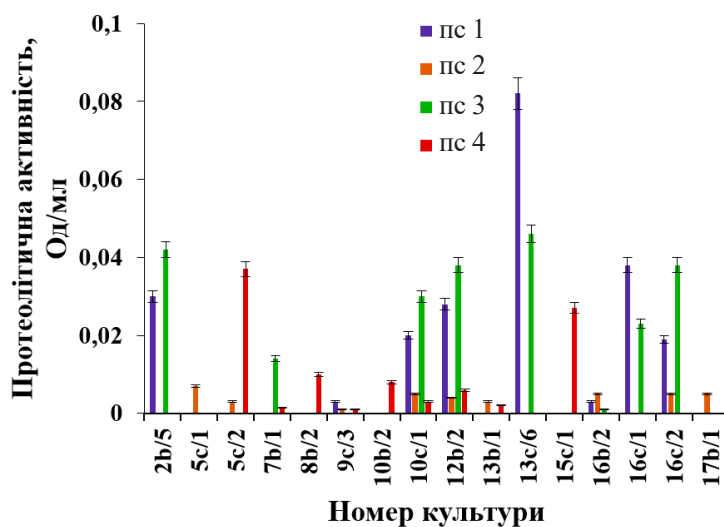


Рис. 4. Загальна протеолітична активність бактеріальних ізолятів при вирощуванні на різних поживних середовищах при температурі культивування 19° С

водночас не здатна була синтезувати ензими з кератинолітичною активністю (рис. 1, 3).

Таким чином, показано, що найвищий рівень казеїнолітичної активності демонстрували бактеріальні ізоляти 13с/6 та 15с/1, виділені з кишкової трубки молюсків за температури не лише 19° С (0,082 Од/мл і 0,027 Од/мл відповідно), а і 28° С (0,074 Од/мл і 0,064 Од/мл відповідно). Найвищий рівень кератинолітичної активності за температури 19° С виявляли культури 16b/2, 17b/1 і 10b/2 (15 Од/мл, 14 Од/мл і 8 Од/мл відповідно), виділені з м'яких тканин, і культури 9с/3, 5с/1 (14 Од/мл, 7 Од/мл відповідно), виділені з кишкової трубки молюсків. За температури 28° С бактеріальні ізоляти 6с/1 і 2b/5, виділені з кишкової трубки і м'яких тканин молюсків, проявляли кератинолітичну активність на рівні 9 Од/мл і 8 Од/мл відповідно. Отже, не було встановлено якоїсь залежності між джерелом виділення (кишкова трубка або м'які тканини молюсків) і рівнем активності культур. Також показано, що найчастіше кератинолітична активність була виявлена у культур, виділених з молюсків, які були відібрані з протоки Skua Creek (13с/6, 15с/1, 16b/2 і 17b/1) і каналу Meek (2b/5, 5с/1, 6с/1, 9с/3). Крім того, здатність до синтезу ферментів з певною активністю пов'язана з особливостями самих культур.

Обговорення. Антарктика, відкриття якої відбулось 200 років тому (в січні 1820 р.) – одне з найбільш екстремальних середовищ для живих істот. Однак у прибережних регіонах існують вільні від льоду райони, які є оазисами для живих істот [14]. Тому в антарктичних озерах, розташованих у таких незамерзаючих районах, температура води влітку може підвищуватися до 10° С, що сприяє інтенсивному розвитку адаптованої до холоду мікробіоти. Вона відіграє фундаментальну роль у геохімічних процесах трансформації органічної речовини, яка знаходиться в таких озерах, за рахунок синтезу позаклітинних гідролаз, зокрема протеаз. Здатність синтезувати набір протеаз, активних в широкому діапазоні температур, є перевагою бактеріальної мікробіоти, розвиток якої пов'язаний з епізодичними змінами температури та запасів їжі.

Але на сьогодні різноманітність антарктичних протеолітичних мікроорганізмів описана недостатньо. Так, автори [15] з трьох прісноводних озер Антарктики виділили 71 штам мікроорганізмів, що проявляли протеолітичну активність за 4° С. Їх класифікували як бакте-

рії (63 ізоляти) та еукаріоти (8 ізолятів). Ізоляти бактерій були віднесені до родів *Flavobacterium* (28 ізолятів), *Pseudomonas* (14 ізолятів), *Arthrobacter* (10 ізолятів), *Psychrobacter* (7 ізолятів), *Cryobacterium* (2 ізоляти), *Hymenobacter* (1 ізолят) і *Polaromonas* (1 ізолят). П'ять ізолятів *Flavobacterium* та один *Hymenobacter*, як виявилось, належать до нових видів. Половина штамів були психрофільними і не росли за температури вище 25° С. Оскільки всі 21 культура, взяті нами для дослідів, росли як за 19° С, так і за 28° С, вважаємо, що вони належать до психротрофних мікроорганізмів. На користь цього припущення свідчить те, що досліджені нами бактеріальні ізоляти здатні були синтезувати ферменти з кератинолітичною і казеїнолітичною активністю за обох температур. Хоча за температури 28° С більша кількість культур синтезує ферменти з кератинолітичною активністю, однак за температури 19° С рівень цієї активності значно вищий. Так, найвищий рівень кератинолітичної активності за температури 19° С виявляли культури 16b/2, 17b/1 і 10b/2 (15 Од/мл, 14 Од/мл і 8 Од/мл відповідно), виділені з м'яких тканин, а також культури 9с/3, 5с/1 (14 Од/мл, 7 Од/мл відповідно), виділені з кишкової трубки молюсків. Лише 5 бактеріальних ізолятів при вирощуванні за температури 28° С виявляли казеїнолітичну активність на рівні від 0,011 до 0,074 Од/мл, в той час як за температури 19° С 10 ізолятів її проявляли.

Зі зразків води, відібраних біля Уругвайської антарктичної бази на острові Кінг-Джордж (Південні Шетландські острови), автори [16] ізолювали 45 штамів бактерій, які були ідентифіковані як представники родів *Pseudomonas* і *Flavobacterium*. Культури росли в діапазоні температур від 4 до 30° С і від 4 до 18° С відповідно. У всіх випадках продукування позаклітинної протеази спостерігалось у стаціонарній фазі росту при 18° С і 4° С, але не виявлялося за 30° С. Аналогічні дані були отримані дослідниками [17], які показали високий рівень синтезу деяких ферментів, зокрема α -амілази та β -галактозидази, арктичними та антарктичними штамми при температурах росту від 4 до 10° С та майже повну його відсутність при більш високих температурах (20–30° С).

Отже, отримані нами результати дозволили розширити наші знання щодо деградації білків протеазами мікроорганізмів, що були ізолювані з молюсків, відібраних в акваторії Української антарктичної станції "Академік Вернадський"

(Argentine Islands, Graham Land). Вони будуть корисними для подальших досліджень як нових властивостей протеаз антарктичних штамів, так і можливостей їх промислового застосування. Використання у промисловості адаптованих до холоду мікроорганізмів, до яких належать психрофіли та психротрофи, дозволяє не лише знизити температуру ферментативного проце-

KERATINOLYTIC ACTIVITY OF ANTARCTIC BACTERIAL STRAINS

*K.V. Avdiyuk¹, L.D. Varbanets¹,
A.E. Berezkina^{2,3}, A.Yu. Utevsky^{2,3}*

¹*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
NAS of Ukraine,*

154 Acad. Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine

²*National Antarctic Scientific Center, Ministry
of Education and Science of Ukraine,*

16 Taras Shevchenko Blvd., Kyiv, 01601, Ukraine

³*V.N. Karazin Kharkiv National University,
Svobody Square, 4, Kharkiv, 61022, Ukraine*

Summary

Every year, millions of tons of keratin-containing raw materials, such as feathers, wool, hair, etc., are released into the environment as a by-product of agro-processing, which are difficult to degrade by conventional proteases such as pepsin, trypsin and papain. Therefore, the search for effective producers of keratinolytic enzymes that can cleave these inaccessible proteins is a relevant topic of research. **Aim.** To investigate caseinolytic and keratinolytic activity of bacterial isolates obtained from soft tissues and intestinal tube of *Nacella concinna* gastropod mollusks, selected near the Ukrainian Antarctic Akademik Vernadsky station. **Methods.** The objects of study were 21 bacterial isolates. The cultures were grown on 4 types of liquid nutrient media, which were different in carbon and nitrogen sources, as well as the presence or absence of NaCl. Enzymatic activity was determined in the liquid culture supernatant. Fat free feathers and casein were used as substrates to determine the keratinolytic and caseinolytic activity. **Results.** The highest level of caseinolytic activity were demonstrated by 13c/6 and 15c/1 bacterial isolates obtained from the intestinal tube of mollusks at a temperature of not only 19° C (0.082 U/ml and 0.027 U/ml respectively), but also at 28° C (0.074 U/ml and 0.064 U/ml respectively). The highest levels of keratinolytic activity at 19° C were found in 16b/2, 17b/1 and 10b/2 cultures (15 U/ml,

а й скоротити час обробки сировини, що, у свою чергу, призводить до суттєвої економії у споживанні електроенергії. Це є дуже важливо, оскільки деякі промислові процеси можуть відбуватися за кімнатної температури або температури водопровідної води. Тому адаптовані до холоду бактерії і синтезовані ними ферменти є перспективними об'єктами біотехнології.

14 U/ml and 8 U/ml respectively) isolated from soft tissues, and 9c/3 and 5c/1 (14 U/ml, 7 U/ml respectively) cultures isolated from the intestinal tube of mollusks. At 28° C, 6c/1 and 2b/5 bacterial isolates obtained from the intestinal tube and soft mollusk tissues had keratinolytic activity at 9 U/ml and 8 U/ml, respectively. Most often keratinolytic activity was detected in cultures isolated from mollusks inhabiting Skua Creek Strait (13c/6, 15c/1, 16b/2 and 17b/1) and Meek Channel (2b/5, 5c/1, 6c/1, 9c/3). **Conclusions.** Most cultures synthesized enzymes with keratinolytic activity at 28° C (from 1 to 9 U/ml), but at 19° C the level of this activity was higher (from 1 to 15 U/ml). It is shown that only 5 bacterial isolates, when grown at 28° C, showed caseinolytic activity at the level from 0.011 to 0.074 U/ml, while a large number of cultures (10) had this activity at 19° C (from 0.01 to 0.082 U/ml).

Keywords: bacterial isolates, mollusks (*Nacella concinna*), Antarctica, keratinolytic activity, caseinolytic activity.

1. Merino N, Aronson HS, Bojanova DP, Feyhl-Buska J, Wong ML, Zhang S, Giovannelli D. Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Front Microbiol.* 2019; 10:1785.
2. Joshi S, Satyanarayana TM. Biotechnology of Cold-Active Proteases. *Biology.* 2013; 2(2): 755–783.
3. Feller G. Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. *Scientifica (Cairo).* 2013; 2013:512840.
4. Martínez-Rosales C, Castro-Sowinski S. Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar Res.* 2011; 30(1):7123.
5. Ferrés I, Amarelle V, Noya F, Fabiano E. Identification of Antarctic culturable bacteria

- able to produce diverse enzymes of potential biotechnological interest. *Advances in Polar Science*. 2015; 26(1):71–79.
6. Convey P, Gibson JA, Hillenbrand CD, Hodgson DA, Pugh PJ, Smellie JL, Stevens MI. Antarctic terrestrial life--challenging the history of the frozen continent? *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2008; 83(2):103–117.
 7. Singh P, Singh SM, Dhakephalkar P. Diversity, cold active enzymes and adaptation strategies of bacteria inhabiting glacier cryoconite holes of High Arctic. *Extremophiles*. 2014; 18(2):229–242.
 8. Kuddus M. Cold-active enzymes in food biotechnology: An updated mini review. *J Appl Biol Biotechnol*. 2018; 6(3):58–63.
 9. Mangiagalli M, Brocca S, Orlando M, Lotti M. The “cold revolution”. Present and future applications of cold-active enzymes and ice-binding proteins. *New Biotechnol*. 2020; 55:5–11.
 10. Furhan J, Sharma DrS. Cold-active alkophilic proteases from various microbial sources: benefits and applications. *Int J Acad Res Dev*. 2018; 3(1):340–345.
 11. Varbanets LD, Matseliukh EV. Peptidases of microorganisms and methods of their investigations. Kyiv: Naukova Dumka; 2014.
 12. Nickerson WJ, Noval JJ, Robison RS. Keratinase. I. Properties of the enzyme conjugate elaborated by *Streptomyces fradiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1963; 77(1):73–86.
 13. Pereira JQ, Lopes FC, Petry MV, da Costa Medina LF, Brandelli A. Isolation of three novel Antarctic psychrotolerant feather-degrading bacteria and partial purification of keratinolytic enzyme from *Lysobacter* sp. A03. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2014; 88:1–7.
 14. Michaud L, Caruso C, Mangano S, Interdonato F, Bruni V, Lo Giudice A. Predominance of *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, and *Polaromonas* within the prokaryotic community of freshwater shallow lakes in the northern Victoria Land, East Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012; 82(2):391–404.
 15. Matsui M, Kawamata A, Kosugi M, Imura S, Kurosawa N. Diversity of proteolytic microbes isolated from Antarctic freshwater lakes and characteristics of their cold-active proteases. *Polar Sci*. 2017; 13:82–90.
 16. Martínez-Rosales C, Castro-Sowinski S. Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *J Polar Res*. 2011; 30(1):1–17.
 17. Groudieva T, Kambourova M, Yusef H, Royter M, Grote R, Trinks H, Antranikian G. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. *Extremophiles*. 2004; 8:475–488.

Отримано 17.01.2020