

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.152.34:577.151.5

ОЧИЩЕННЯ І ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПЕПТИДАЗИ *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 З ЕЛАСТАЗНОЮ І ФІБРИНОЛІТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ

О. В. МАЦЕЛЮХ, Н. А. НІДЯЛКОВА, Л. Д. ВАРБАНЕЦЬ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;
e-mail: oivanko@yahoo.com

Розроблено схему виділення і очищення пептидази *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324, яка включає осадження сульфатом амонію та хроматографію на нейтральних і заряджених ТСК-гелях. Встановлено, що ензим виявляє специфічність щодо еластину і фібрину. Молекулярна маса його – 26 кДа. Показано, що ензим є сериноюю лужною пептидазою, оптимуми рН гідролізу еластину і фібрину становлять 9,0 і 10,0 відповідно. Температурний оптимум гідролізу еластину – при 40 °С, а фібрину – 50 °С. Показано високу стабільність очищеного препарату в діапазонах рН і температур. Встановлено стабілізуючий вплив на активність пептидази катіонів цинку в концентрації 1 мМ і інгібуючий вплив майже всіх досліджених катіонів двовалентних металів. Досліджувані аніони на активність ензиму практично не впливають, за винятком хлоридів і ацетатів, які знижують її в середньому на 20%, і фосфат-аніонів, що на 15–30% підвищують його активність.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, позаклітинна пептидаза, очищення, еластазна активність, фібринолітична активність, фізико-хімічні властивості пептидаз.

Еластолітичні ензими (еластази) об'єднують низку ендопептидаз, які належать до різних каталітичних типів протеїназ: серинових, цистеїнових і металопептидаз [1, 2]. Найбільш вивчено панкреатичну і лейкоцитарну еластази вищих тварин (3.4.21.36, 3.4.21.37), які належать до серинових пептидаз і специфічні до пептидних зв'язків, які утворені карбоксильними групами аланіну, валіну, лейцину, ізолейцину, а також залишками інших гідрофобних амінокислот. Найдослідженішим фібринолітичним ензимом є плазмін (3.4.21.7), що належить до пептидаз серинового типу. На сьогодні в світовій літературі є відомості про синтез мікроорганізмами пептидаз з еластолітичною і фібринолітичною активністю. Так, описано окремі пептидази, продуцентами яких є представники як еукаріотичних (*Aspergillus*), так і прокаріотичних (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* та ін.) мікроорганізмів. Відомо [3], що еластази *P. aeruginosa* (3.4.24.26) є цинквмісними металопептидазами, в той час як еластаза, виділена з морського штаму *Bacillus pumilus* [4] є лужною сериноюю ендопептидазою з оптимумом рН 8,0–9,0.

Здатність синтезувати протеолітичні ензими з еластолітичною активністю знайдено і в представників стрептоміцетів, зокрема, у *Streptomyces griseus*, з якого одержано препарат «проназу» [5]. Під цією назвою об'єднано не менше десяти ензимів, з яких п'ять – серинового типу, дві – цинквмісні металопептидази, одна – цинквмісна карбоксипептидаза та дві Zn^{2+} -лейцин амінопептидази, які здатні гідролізувати еластин. Із протеолітичного комплексу *Streptomyces sp.* 1349 [6] виділено і охарактеризовано три пептидази, дві з яких є метало-, а одна – серинопептидазою. Всі три ензими здатні з високою ефективністю гідролізувати еластин. Найрозповсюдженішими продуцентами фібринолітичних пептидаз є бацили, виділені із ґрунту, прісної й морської води, а також із рослин. Більшість з цих ензимів є лужними сериновими пептидазами з оптимальними умовами дії за рН 8,0–10,0 і температурою 30–60 °С [7].

Зацікавленість в дослідженні пептидаз з еластолітичною і фібринолітичною активністю пов'язана з їх участю в розвитку різноманітних захворювань запального генезу. Еластази людини відіграють певну роль

при емфіземі легень, цистозному фіброзі та ін. Еластази патогенних мікроорганізмів у складі протеолітичних комплексів, які секретуються у зовнішнє середовище, беруть участь у розвитку інфекційного процесу. Фізіологічна роль ензимів з еластолітичною і фібринолітичною дією в непатогенних мікроорганізмів до сьогодні точно невідома.

Раніше [8, 9] було показано, що *B. thuringiensis* IMB В-7324 – представник виду бактерій-продуцентів ентомоцидних кристалічних токсинів – синтезує складний позаклітинний пептидазний комплекс, який виявляє, зокрема, еластолітичну і фібринолітичну дію. Також встановлено, що максимум синтезу пептидази з еластолітичною активністю припадає на експоненційну фазу росту культури. Враховуючи перспективність практичного застосування подібних пептидаз як у медицині, так і в деяких галузях промисловості (харчова, косметична), метою роботи було виділення і очищення цих ензимів із культуральної рідини штаму-продуцента, а також вивчення їхніх фізико-хімічних властивостей.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам *Bacillus thuringiensis*, одержаний за допомогою хімічного мутагенезу [8] і задепонований в Українській колекції мікроорганізмів за номером IMB В-7324. Предмет дослідження – позаклітинна пептидаза з еластолітичною дією.

Для накопичення ензиму в культуральній рідині штам *B. thuringiensis* IMB В-7324 вирощували на рідкому поживному середовищі, оптимізованому нами раніше [9] для синтезу еластази, (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; арабіноза – 1,5; желатин – 10,0; дріжджовий автолізат – 0,15; рН – 6,5–6,7. Штам інкубували протягом 18 год в колбах на качалках (150 мл середовища, 42 °С, 200 об./хв). Інокулюм отримували на тому самому середовищі протягом 18 год і засівали в колби в кількості 10^5 – 10^6 КУО (колонієутворюючих одиниць).

Клітини відділяли від культуральної рідини шляхом центрифугування при 5000 г протягом 30 хв. До супернатанта культуральної рідини додавали суху сіль сульфату амонію до кінцевої концентрації 90%. Суміш витримували 24 год при 4 °С, центрифугували при 5000 г 30 хв і збирали осад, розчиняли в 1,5 об'ємах 0,01 М трис-НСІ буфера, рН 7,5 і наносили на колонку (1,8×40 см) з нейтральним TSK-гелем – Toyopearl HW-55 (Toyosoda,

Японія). Елюцію зразка проводили тим самим буфером. Фракції з еластазною активністю об'єднували і наносили на колонку (2,5×40 см) з Toyopearl DEAE-650(M) (Toyosoda, Японія). Вміст протеїну на всіх стадіях очищення реестрували на СФ-26 при 280 нм. Гомогенність і молекулярну масу очищеного протеїнового препарату визначали як в нативних умовах на колонці із Sepharose 6В (1,5×23 см), так і в денатуруючих – за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу. Калібрувальний графік для розрахунку молекулярної маси будували за допомогою протеїнів-маркерів фірми (Pharmacia, Швеція): α -лактальбуміну (14,4 кДа), інгібітора трипсину із сої (20,0 кДа), карбоангідрази (30,0 кДа), овальбуміну (43,0 кДа) та бичачого сироваткового альбуміну (67,0 кДа). Препарати ензимів для електрофоретичного розділення розчиняли в 0,5 М трис-НСІ буфері (рН 8,8) з 0,25% β -меркаптоетанолу, 10% додецилсульфату натрію, 20% гліцеролу та 0,001% бромфенолового синього, кип'ятили протягом 1 хв, після чого наносили на гель (50–100 мкг протеїну на лунку). Електрофорез проводили у 5%-му концентруючому та 12%-му розділяючому акриламідних гелях за постійної сили струму 30 мА. Досліджувані препарати визначали в гелі після фарбування кумасі G-250 [10].

Для вивчення дії катіонів, аніонів і хімічних реагентів, а також рН і температури на активність ензимів використовували очищений препарат пептидази з концентрацією протеїну 1 мг/мл. Для інгібіторного аналізу застосовували такі специфічні хімічні реагенти: фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ), дитіотреїтол, 1-етил-3-[3-диметиламінопропіл] карбодіїмід (ЕДК), N-етилmaleїмід (НЕМ), етилендіамінтетраацетат натрію (ЕДТА). Ензим із реагентом (в кінцевій концентрації 10^{-2} – 10^{-3} М) інкубували протягом 60 хв при температурі 15–20 °С. Визначення впливу рН та температури середовища на активність пептидази проводили в інтервалі температур від 4 до 90 °С та рН від 2,0 до 12,0, останній створювали 0,05 М універсальним фосфатним буфером. Катіони використовували у вигляді хлоридів або ацетатів, аніони – солей калію або натрію в кінцевій концентрації 1 мМ. Після вичерпання часу дії на ензими відповідного фактора відбирали аліквоти і визначали активність як описано нижче.

Ензиматичну активність та вміст протеїну визначали в супернатанті культуральної рідини і в препаратах після кожної стадії очищення; протеїну – за методом Лоурі [11], еластазну активність – колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину конго

червоним при ензиматичному гідролізі еластину [12]. За одиницю активності приймали кількість ензиму, яка каталізує гідроліз 1 мг субстрату за 1 хв в стандартних умовах. Для визначення фібринолітичної активності як субстрат використовували фібрин, одержаний із плазми крові людини на станції переливання крові [13, 14]. В дослідну пробу додавали 1 мг фібрину, 1,8 мл трис-НСІ буфера (рН 7,5) і 0,2 мл досліджуваного препарату. Інкубацію проводили протягом 30–45 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 10%-ї трихлороцтової кислоти (ТХО). У контрольну пробу ТХО додавали одразу. Зразки витримували при кімнатній температурі 20 хв, потім центрифугували при 10 000g 10 хв для видалення осадженого протеїну. Поглинання вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 275 нм. За одиницю активності приймали кількість ензиму, яка підвищує абсорбцію на 0,01 за 1 хв в умовах експерименту. Казеїнолітичну (загальну пептидазну) активність встановлювали методом Ансона в модифікації Петрової [15], який базується на кількісному визначенні тирозину, що утворюється за ензиматичного гідролізу казеїну під дією досліджуваних ензимів. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз протеїну зі швидкістю 1 мкмоль тирозину за 1 хв в умовах

експерименту до продуктів, що не осаджуються трихлороцтовою кислотою.

Усі досліди проводили в трьох повторюваннях, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за алгоритмом, описаним у роботі [16]. Відмінності середніх показників вважали вірогідними на рівні значущості $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Раніше [9] було показано, що *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 синтезує еластазу в максимальній кількості вже на 18 год культивування в глибинних умовах. Тому, відповідно до умов максимального синтезу, шляхом фракціонування сульфатом амонію супернатанта культуральної рідини було отримано комплексний ензимний препарат, який потім розділяли методом гель-фільтрації на колонці з нейтральним гелем Тоуорепарл НВ-55, використовуючи 0,01 М трис-НСІ буфер, рН 7,5. Показано, що фракція з еластазною активністю виходить окремим одиничним піком (рис. 1), що дає змогу ефективно виділяти її з комплексного препарату. Встановлено, що зібрана фракція, поряд з еластазною, виявляє незначну фібринолітичну активність (рис. 2), що заслуговує на увагу в зв'язку з розширенням області застосування цього ензиму. Тому на наступних етапах

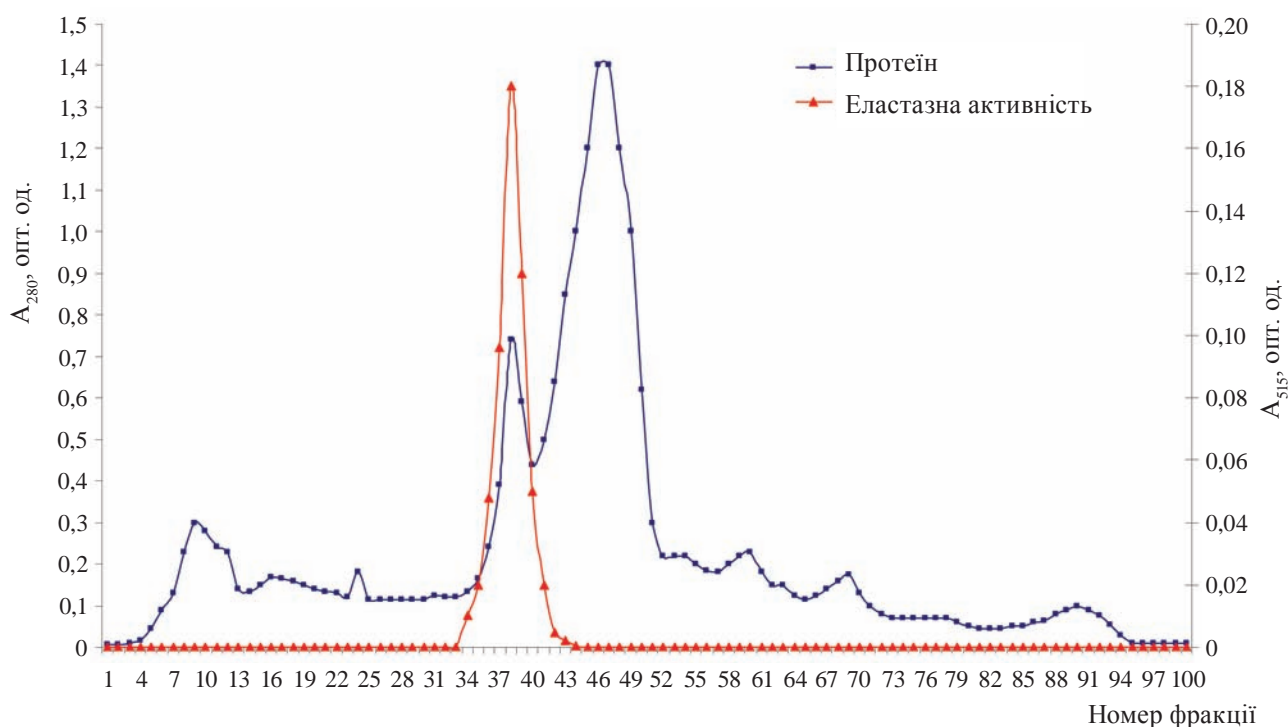


Рис. 1. Профіль елюції комплексного ензимного препарату на TSK Тоуорепарл НВ-55

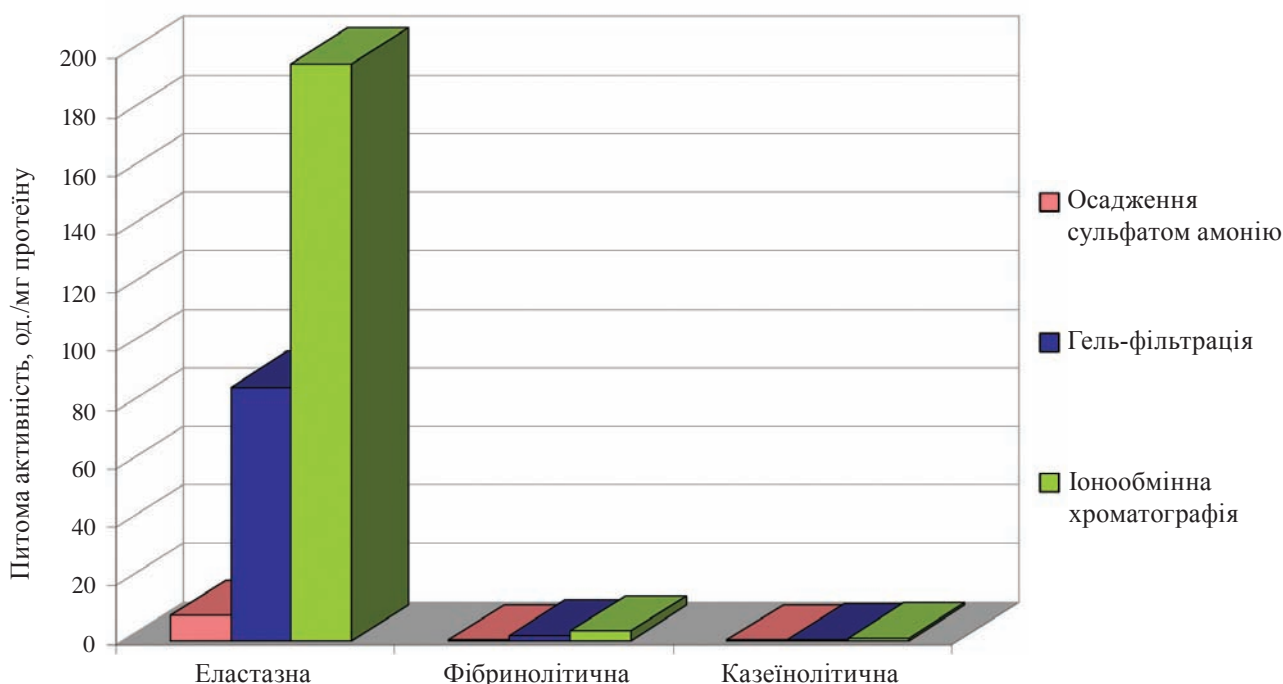


Рис. 2. Спектр активності пептидази різного ступеня очищення

очищення, а також під час вивчення фізико-хімічних властивостей, поряд з еластазою, нами було досліджено ще й фібринолітичну активність цієї пептидази.

На другому етапі очищення препарат пептидази піддавали іонообмінній хроматографії на зарядженому TSK-гелі Тоуорепарл DEAE 650(M). Умови розділення підбирали так, щоб з іонообмінником зв'язувалися лише баластні протеїни (рис. 3). Показано, що в умовах використання 0,01 М трис-НСІ буфера з рН 7,5 еластаза виходить до початку виходу градієнта солі, що пов'язано з позитивним сумарним зарядом молекули ензиму за цих умов. Таким чином препарат вдалося позбавити від частини протеїнових домішок, при цьому еластазна активність одержаного ензиму збільшилась в 22,9 раза, проте в очищеному препараті зберігалася незначна фібринолітична активність (рис. 2).

Отже, із супернатанта культуральної рідини *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 було виділено пептидазу з еластолітичною активністю. Вихід цього ензиму внаслідок двостадійного очищення становив 37% (табл.), питома еластазна активність складала 197,3 од./мг протеїну. Препарат також характеризується фібринолітичною (3,33 од./мг протеїну) і казеїнолітичною (1,0 од./мг протеїну) активністю. У складі

одержаної пептидази визначено незначну (1,7%) кількість вуглеводів.

Відомо, що представники роду *Bacillus*, головним чином, синтезують пептидази із молекулярною масою від 15 до 100 кДа. Еластази бацил мають молекулярну масу від 20 до 30 кДа. Так, з алкаліфільної бактерії *Bacillus sp.* Ya-B виділено еластазу, молекулярна маса якої становить 25 кДа [17]. Таку саму молекулярну масу має й лужна еластаза, виділена із *Bacillus sp.* 6644 [18]. Основними методами визначення молекулярної маси протеїнів є фізико-хімічні методи – гравіметричні, осмометричні, віскозиметричні, електрофоретичні, оптичні та інші. На практиці частіше використовують такі методи, як гель-хроматографія та гель-електрофорез в нативних і денатуруючих умовах. Ці методи дозволяють точно встановити не тільки молекулярну масу протеїну, але й встановити наявність або відсутність субодиничної структури молекули ензиму.

Препарат еластази *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 (2 мг протеїну/мл) наносили на колонку із Sepharose 6В (рис. 4, А), яку попередньо було калібровано за протеїнами-маркерами визначеної молекулярної маси. Таким чином, за допомогою методу гель-фільтрації в нативних умовах було встановлено молекулярну масу очищеного ензимного препарату – 26 кДа.

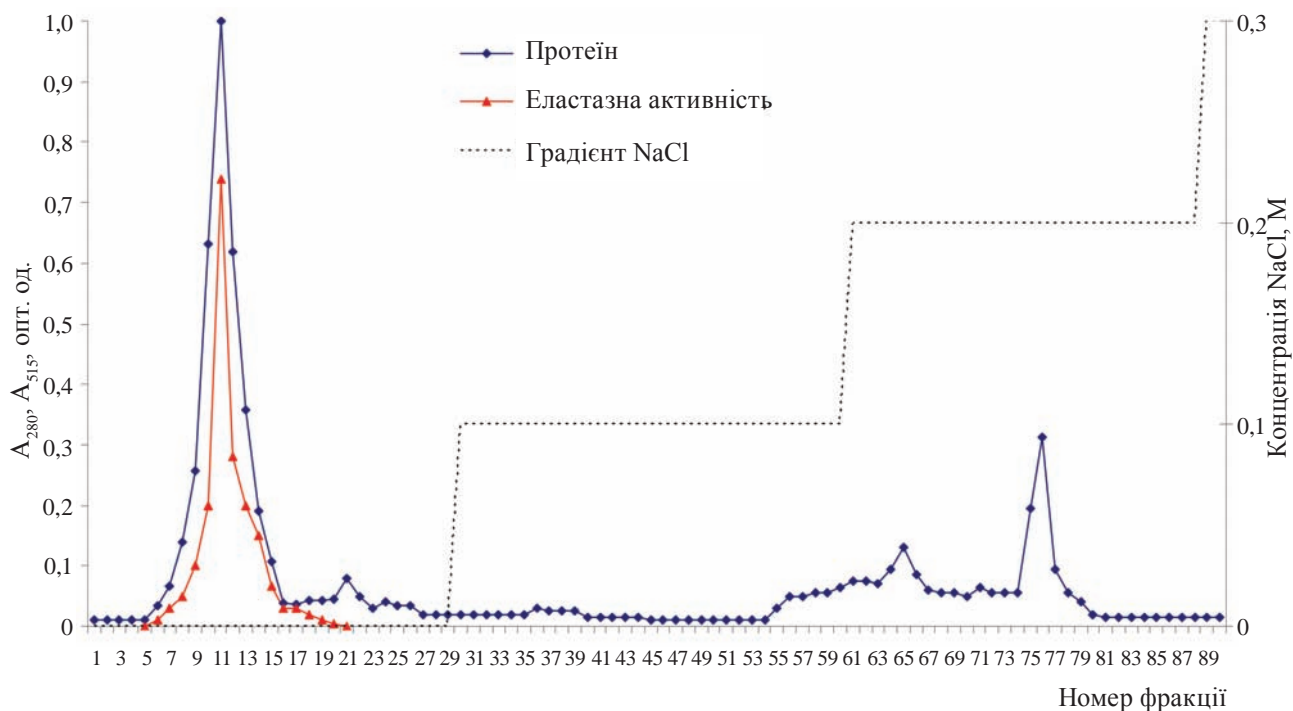


Рис. 3. Профіль елюції препарату еластази на TSK Toyopearl DEAE 650(M)

Підсумок очищення еластази *V. thuringiensis* IMB B-7324

Стадія очищення	Загальний вміст протеїну, мг	Загальний вміст вуглеводів, % до сухої маси препарату	ЕА, од.	Вихід ЕА, %	ЕА, од./мг протеїну	Очищення, кількість разів
Супернатант культуральної рідини	2036	—	17550	100	8,62	—
Комплексний ензимний препарат	1227	30	11389	65	9,28	1,1
Гель-фільтрація	77,4	3,5	6720	38,3	86,8	10,1
Іонообмінна хроматографія	32,9	1,7	6498	37	197,3	22,9

За результатами електрофорезу в системі ДСН-ПААГ (рис. 4, Б) пептидаза виходила однією лінією близько 26 кДа, що збігається з результатами визначення молекулярної маси в нативних умовах і може свідчити про мономерну структуру і гомогенність одержаного очищеного препарату.

Важливою характеристикою будь-яких ензимних препаратів є оптимальні умови їх дії, які, в першу чергу, визначаються залежністю активності і стабільності ензимів від рН і температури. Показано, що очищений ензимний

препарат активний в інтервалі значень рН від 5,0 до 12,0 (рис. 5), але оптимум рН гідролізу нативного еластину знаходиться при рН 9,0, а фібрину – при рН 10,0. Це свідчить про те, що одержана пептидаза належить до лужних ензимів. Так само дещо відрізняються і оптимальні температури гідролізу субстратів пептидазою. Ензим активний в діапазоні температурних значень від 4 до 60 °С, але при цьому температурний оптимум гідролізу еластину знаходиться при 40 °С, а фібрину – при 50 °С (рис. 6). Така різниця в оптимальних умовах

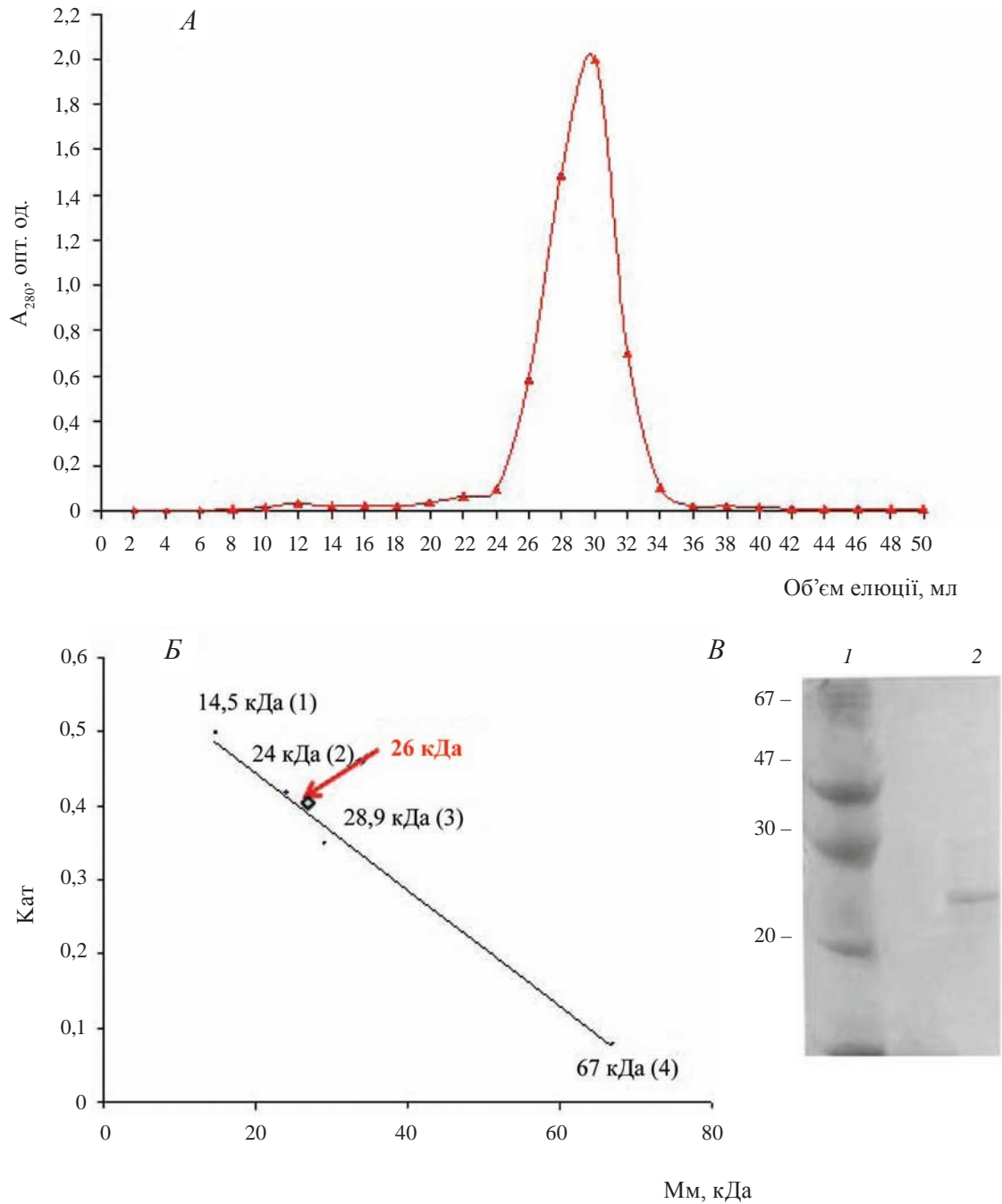


Рис. 4. Встановлення молекулярної маси очищеного ензимного препарату в нативних і денатуруючих умовах: А – профіль елюції препарату на колонці із Sepharose 6В; Б – калібрування протеїнами-маркерами колонки із Sepharose 6В; В – електрофореграма (1 – протеїни-маркери, 2 – еластаза)

дії для різних субстратів зумовлена, передусім, різницею в механізмах зв'язування ензиму із субстратами, а також змінами в конформації молекули протеїну як ензиму, так і субстратів під впливом температури.

Препарат характеризується досить високою стабільністю в дослідженому діапазоні як рН, так і температур. При цьому дані щодо

стабільності пептидази за дії на різні субстрати практично збігаються. За значень рН 6,0–7,5 зберігається до 90–100% від вихідної еластазної активності в умовах інкубації препарату при 37 °С протягом двох годин (рис. 7). В діапазоні рН від 8,0 до 9,5 за 60 хв залишається 70–40% від вихідної активності відповідно. Препарат пептидази стабільний в діапазоні температур

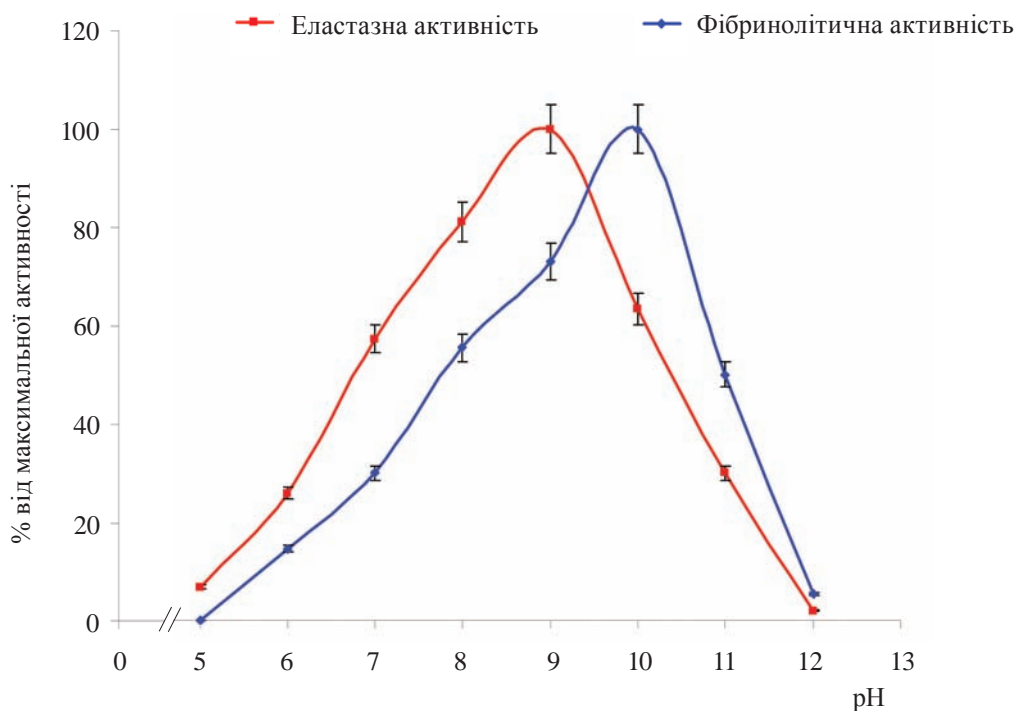


Рис. 5. Вплив рН на еластазну і фібринолітичну активність пептидази *B. thuringiensis* IMB B-7324

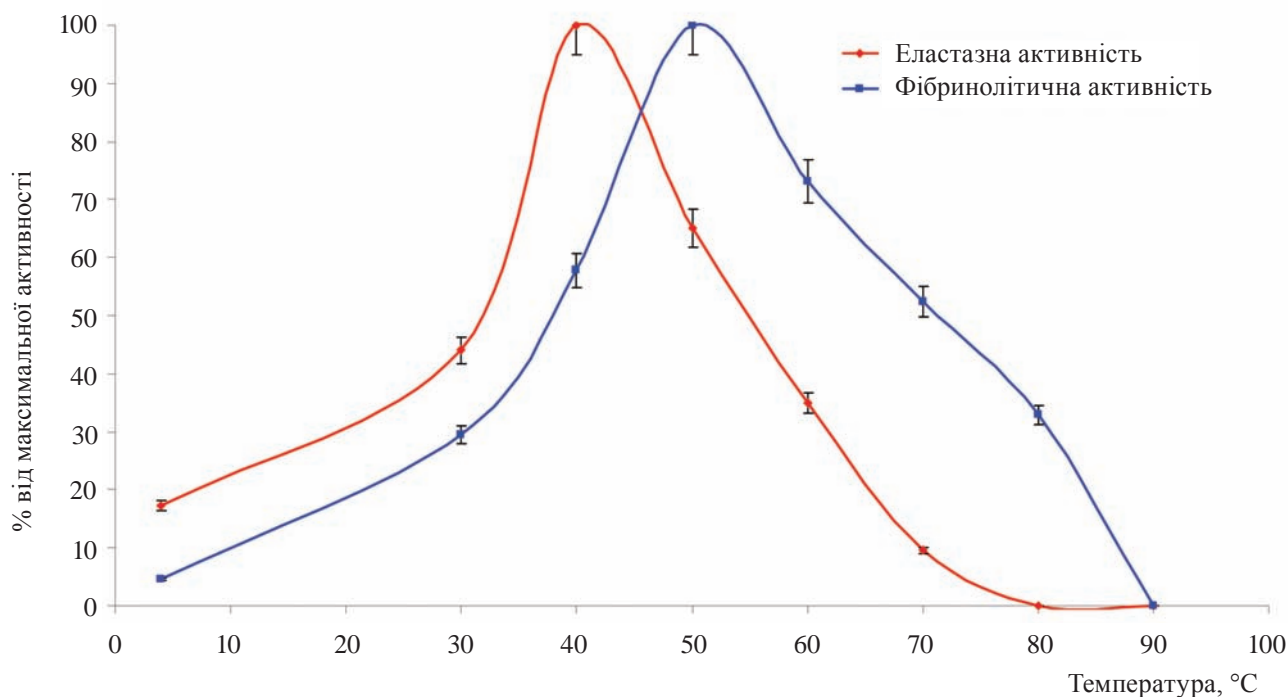


Рис. 6. Вплив температури на еластазну і фібринолітичну активність пептидази *B. thuringiensis* IMB B-7324

від 4 до 40 °C (рис. 8). Під час інкубації ензиму при 50 °C протягом 40 хв зберігається до 75% активності. За підвищення температури до 60 °C протягом перших 10 хв активність

знижується на 40%, а після години інкубації за таких умов залишається лише 10% від вихідної активності. Дані щодо досить високої стабільності одержаного препарату при темпе-

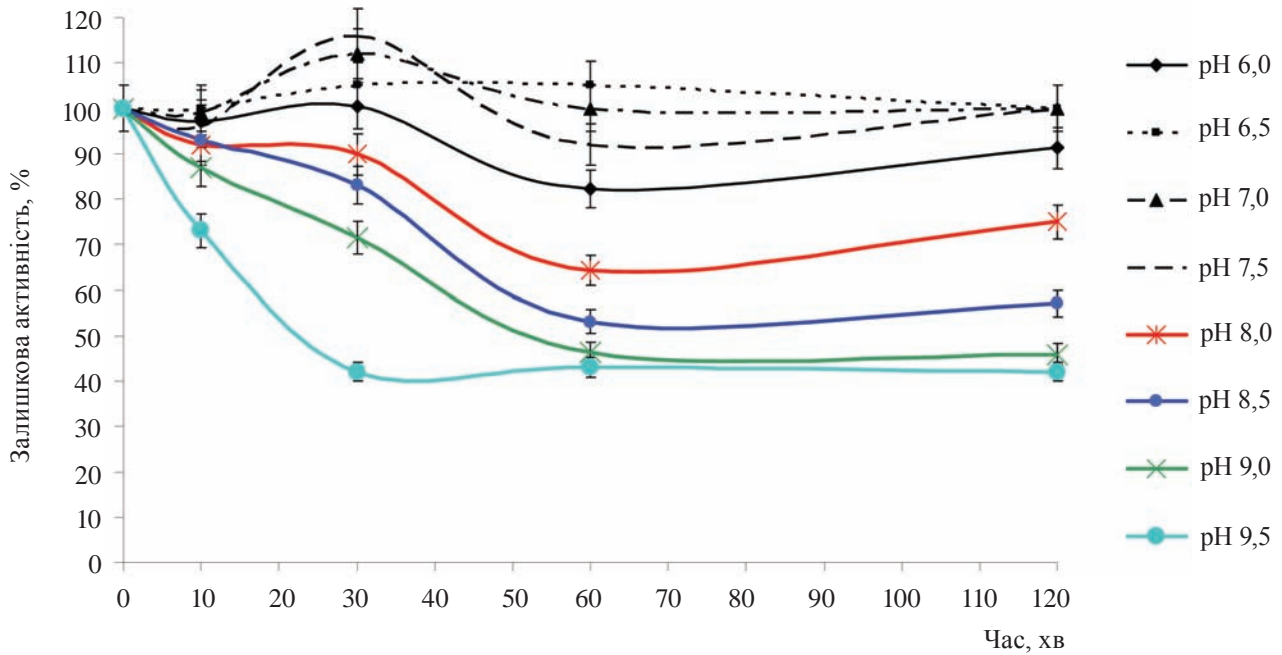


Рис. 7. рН-стабільність ензимного препарату еластази *B. thuringiensis* IMB B-7324

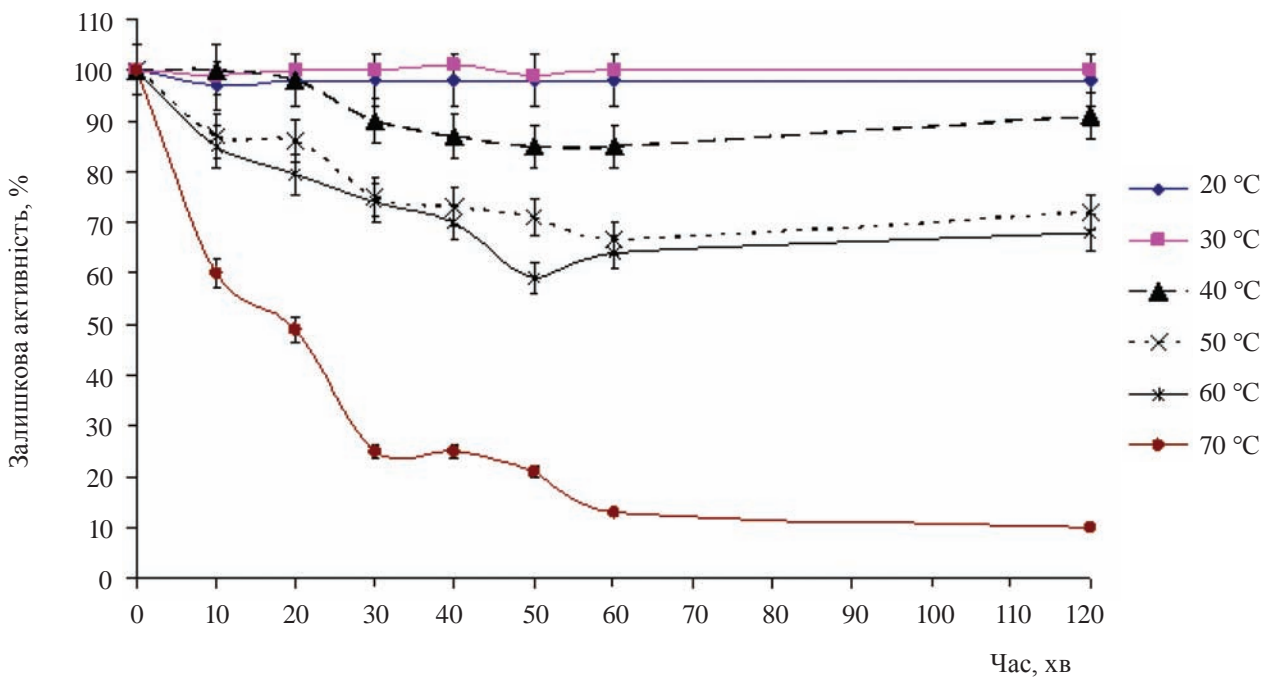


Рис. 8. Термостабільність ензимного препарату еластази *B. thuringiensis* IMB B-7324

ратурах від 4 до 50 °С, а також за нейтральних і слабо кислих значень рН є вагомими щодо подальшого перспективного застосування препарату в медицині.

На ензим можуть впливати не тільки рН і температура, але й іонний склад навколишнього середовища. У разі, коли іони металів

не входять до складу активного центру ензиму, вони можуть впливати на взаємодію його з негативно зарядженими ділянками молекул субстрату, формувати каталітично активну конформацію структури ензиму. За даними літератури встановлений інгібуєчий вплив Cu^{2+} на пептидази з *Bacillus sp.* пов. SK006,

B. amyloliquefaciens CH51 і *B. subtilis* Natto B-12 [19–22]. Катіони Ва і Са найчастіше виступають в ролі стабілізаторів активності, наприклад, як показано для фібринолітичних пептидаз *B. amyloliquefaciens* CH51 і *B. subtilis* K42 [21, 23]. Вивчення впливу катіонів металів, а також деяких аніонів на еластазну і фібринолітичну активність ензимного препарату *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 свідчить (рис. 9), що одновалентні катіони калію, натрію і срібла не впливають на еластазну активність пептидази, а фібринолітичну – катіони Ag^+ збільшують майже в 2 рази. Інгібують активність ензиму і катіони амонію – еластазну на 60%, а фібринолітичну на 10%. Майже всі досліджені катіони двовалентних металів в концентрації 1 мМ після інкубації з ними ензиму протягом години необернено інгібують еластазну активність, за винятком цинку, який збільшує її на 32%. Під час дослідження впливу цих катіонів на фібринолітичну активність пептидази було показано незначне інгібування ними активності (на 10–28%), а у разі з барієм, магнієм і міддю навіть збільшення її (на 44, 70 і 78% відповідно). Вивчення впливу аніонів проводили, витримуючи ензим протягом 1 год у розчинах аніонів в концентрації 1 мМ

(рис. 10). На активність ензиму досліджувані аніони практично не впливають, за винятком хлоридів, які в обох досліджуваних концентраціях знижують активність ензиму в середньому на 20%, і ацетатів, що впливають лише на еластазну активність, знижуючи її також на 20%. Слід зазначити дію іодидів, фторидів, сульфатів, арсенатів і фосфатів, які підвищують фібринолітичну активність на 10–60%.

Передусім такий вплив катіонів і аніонів пояснюється механізмом зв'язування ензиму з нативними субстратами – еластином і фібрином. Імовірно, що пептидаза *B. thuringiensis* є металактивованою сериною протеїназою і присутність металу в структурі молекули є необхідною, в першу чергу, для зв'язування високомолекулярних нативних субстратів. Крім того, катіони металів можуть зв'язуватися із субстратом і унеможливити подальшу адсорбцію і зв'язування ензиму із субстратом.

Відомо [18], що мікроорганізми роду *Bacillus* синтезують дві групи протеїназ: серинові і металопротеази. Крім того, серед протеїназ бацил виявляють і такі, які містять залишок серину в активному центрі і при

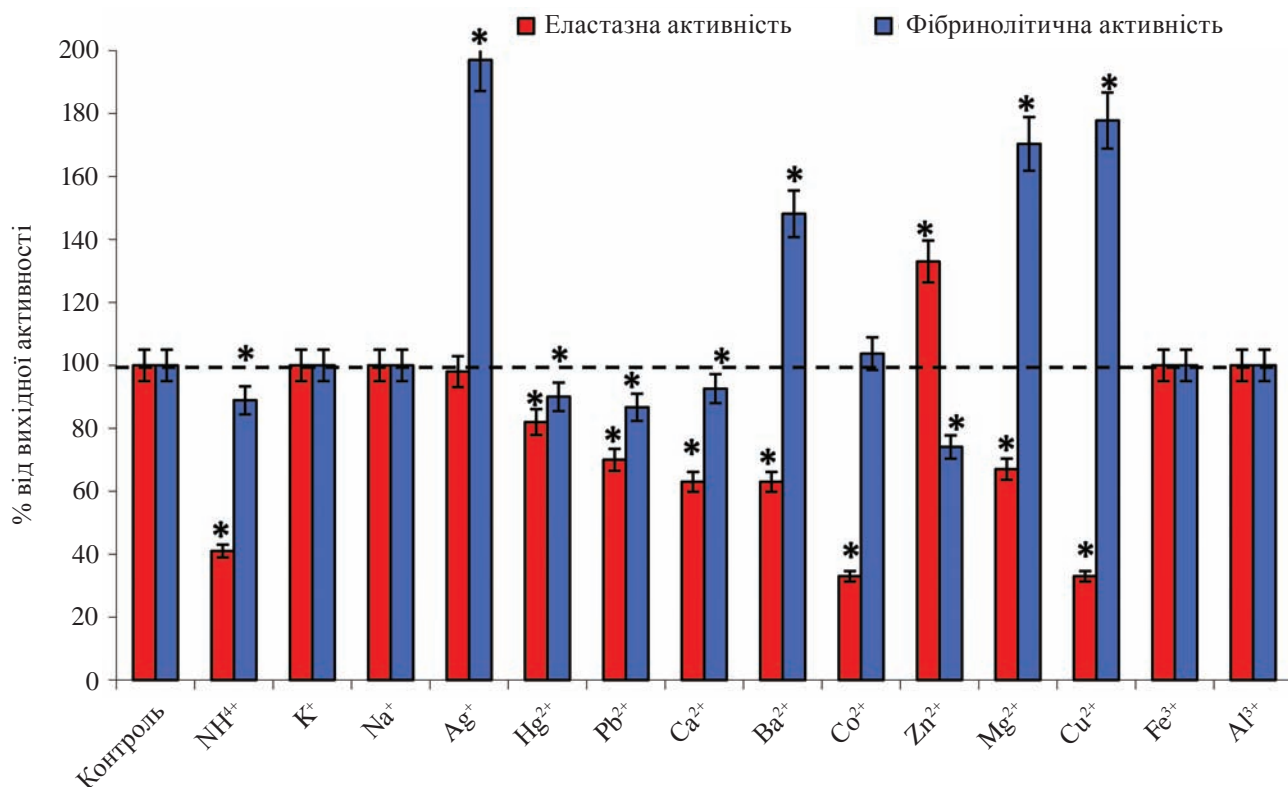


Рис. 9. Вплив катіонів на активність пептидази *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 (* $P \leq 0,05$ порівняно з контролем, $n = 5$)

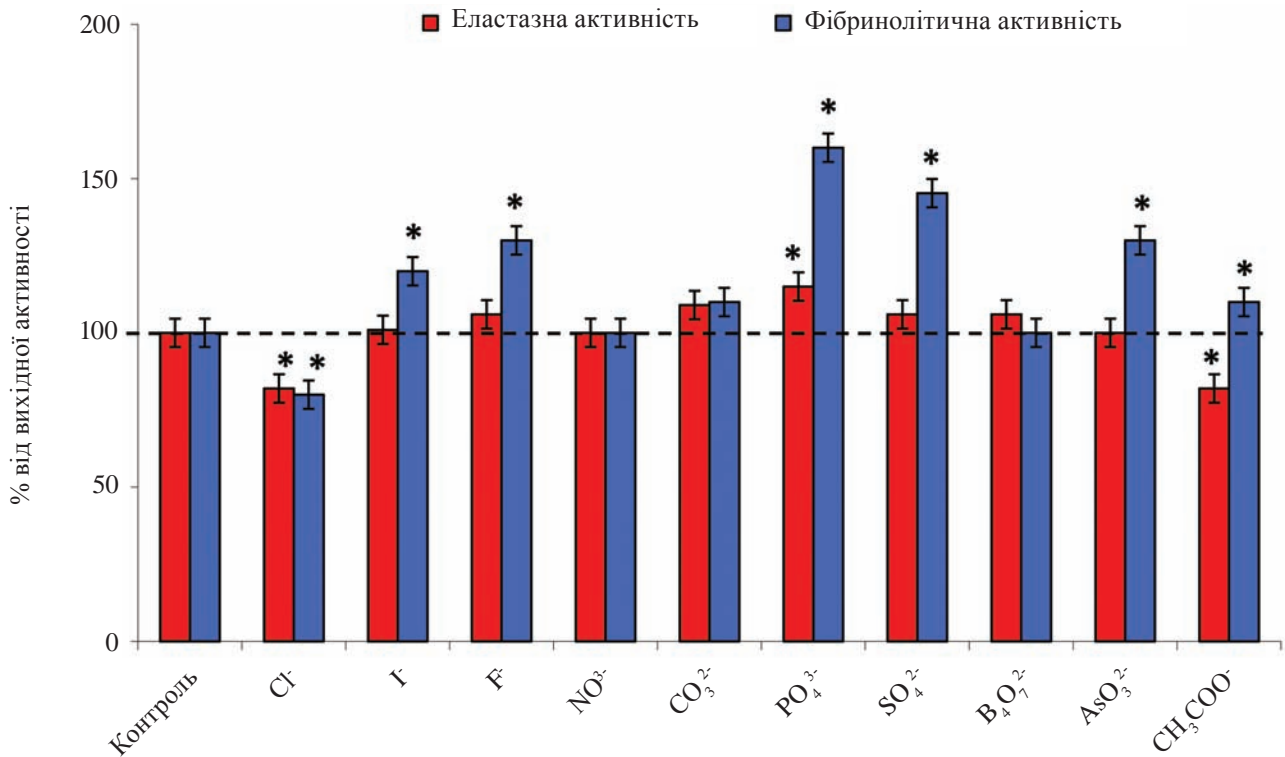


Рис. 10. Вплив аніонів на активність пептидази *B. thuringiensis* IMB B-7324 (* $P \leq 0,05$ порівняно з контролем, $n = 5$)

цьому для стабілізації молекули і виявлення каталітичних властивостей потребують іони металів. Проведені нами дослідження впливу групспецифічних хімічних реагентів показали (рис. 11), що активність пептидази на 100% необернено інгібує фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) протягом 60 хв під час гідролізу нативного еластину і фібрину. Оскільки ФМСФ є інгібітором практично всіх серинових протеїназ із трипсиноподібною специфічністю і ковалентно зв'язується з гістидином або серином активного центру, то логічно було б припустити, що досліджувана протеїназа належить до групи протеїназ серинового типу. Також активність ензиму необернено інгібується 1-етил-3-[3-диметиламінопропіл] карбодімідом (ЕДК), який здатний зв'язувати каталітично активні карбоксильні групи ензимів, найчастіше це карбоксильні групи аспаргінової або глутамінової кислот. Вивчення дії на активність пептидази сильного відновлюючого реагенту дитіотреїтолу, який здатний відновлювати внутрішньомолекулярні і міжмолекулярні дисульфідні зв'язки між залишками цистеїну, показало його незначну інгібуючу дію (на 10–20%) як на еластазу, так і на фібринолітичну активність. Оскільки

в умовах досліду (pH 7,5, відсутність денатуруючих чинників) ми могли дослідити лише наявність дисульфідних зв'язків на поверхні протеїнової молекули, то можна зробити висновок, що на поверхні молекули цієї пептидази є певна кількість тіолових груп, утворення дисульфідних зв'язків між якими призводить до зміни конформації молекули, що робить менш доступним каталітичний центр ензиму. Лише конформаційну, а не каталітичну роль поверхневих тіолових груп підтверджує і відсутність інгібуючої дії на пептидазу N-етилmaleїмиду (HEM), здатного блокувати вільні каталітично активні SH-групи ензиму. Також встановлено, що активність пептидази на 40–65% інгібує ЕДТА. Ця взаємодія має обернений характер, тобто після 2 год експозиції активність поступово відновлюється, а, отже, можна зробити висновок, що іони металів не входять до складу активного центру пептидази, а скоріше необхідні для підтримання певної конформації молекули, або ж для зв'язування субстрату.

Таким чином, показано, що штам *B. thuringiensis* IMB B-7324 синтезує пептидазу, яка виявляє як еластазу, так і фібринолітичну активність. Визначення молекулярної маси одержаного очищеного ензимного препара-

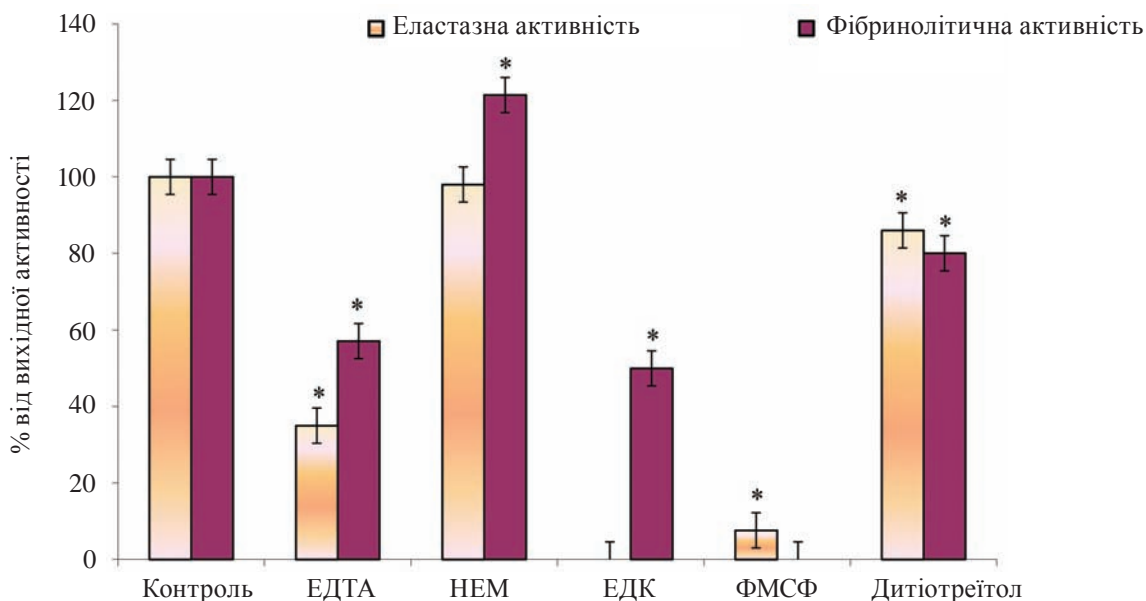


Рис. 11. Вплив групспецифічних інгібіторів на активність пептидази *B. thuringiensis* IMV B-7324 (* $P \leq 0,05$ порівняно з контролем, $n = 5$)

ту показало, що його маса складає 26 кДа. Встановлено, що пептидаза з еластолітичною і фібринолітичною активністю *B. thuringiensis* IMV B-7324 є сериною лужною пептидазою. Визначено температурний і рН-оптимум гідролізу нативних еластину і фібрину. Показано високу стабільність очищеного препарату.

ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДАЗЫ *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 С ЭЛАСТАЗНОЙ И ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Е. В. Мацелюх, Н. А. Нидялкова,
Л. Д. Варбанець

Институт микробиологии и вирусологии им.
Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев;
e-mail: oivanko@yahoo.com

Разработана схема выделения и очистки пептидазы *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324, включающая осаждение сульфатом аммония и хроматографию на нейтральных и заряженных TSK-гелях. Установлено, что энзим проявляет специфичность в отношении эластина и фибрина. Молекулярная масса его – 26 кДа. Показано, что энзим является сериновой щелочной пептидазой с оптимумом рН гидролиза эластина и фибрина – 9,0 и 10,0 соответственно. Температурный оптимум гидролиза эластина – 40 °С, а фибрина – 50 °С. Показана высокая стабильность очищенного препарата

в исследуемых диапазонах рН и температур. Установлено стабилизирующее влияние на активность пептидазы катионов цинка в концентрации 1 мМ и ингибирующее влияние практически всех исследуемых катионов двухвалентных металлов. Исследуемые анионы на активность энзима практически не влияют, за исключением хлоридов и ацетатов, снижающих ее в среднем на 20%, и фосфатов, которые на 15–30% повышают его активность.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, внеклеточная пептидаза, очистка, эластазная активность, фибринолитическая активность, физико-химические свойства пептидаз.

PURIFICATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 PEPTIDASE WITH ELASTOLYTIC AND FIBRINOLYTIC ACTIVITY

O. V. Matselyukh, N. A. Nidialkova,
L. D. Varbanets

Institute of Microbiology and Virology, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: oivanko@yahoo.com

Summary

The scheme of isolation and purification of *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 peptidase has been developed. This scheme includes ammonium sulfate precipitation and chromatography on neu-

tral and charged TSK-gels. It was found that the enzyme hydrolyzes elastin and fibrin. The molecular weight is 26 kDa. It was shown that the enzyme is an alkaline serine peptidase. The optimal pH of hydrolysis of elastin and fibrin were 9.0 and 10.0, respectively. The optimal temperature of elastin and fibrin hydrolysis are 40 and 50 °C, respectively. The high stability of the purified preparation in the studied range of pH and temperature was shown. The stabilizing effect of zinc at a concentration of 1 mM on the elastase activity, and the inhibitory effect of other divalent cations under study have been established. The investigated chloride and acetate anions reduced activity by 20%, while phosphate anions increased activity by 15–30%.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, extracellular peptidase, purification, elastolytic activity, fibrinolytic activity, physico-chemical properties of peptidases.

1. Häse C. C., Finkelstein R. A. // Microbiol Rev. – 1993. – 57, N 4. – P. 823–837.
2. Bieth J. G. // J. Soc. Biol. – 2001. – 195, N 2. – P. 173–179.
3. Galloway D. R. // Mol. Microbiol. – 1991. – 5, N 10. – P. 2315 – 2321.
4. Еляков Г. Б., Стоник В. А., Кузнецова Т. А., Михайлов В. В. // Вестник РАН. – 1993. – 63, № 9. – С. 797–802.
5. Sweeney P. J., Walker J. M. // Methods Mol. Biol. – 1993. – 16. – P. 271–276.
6. Іванко О. В. Колагеназа і кератиназа стрептоміцетів. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2003. – 20 с.
7. Варбанець Л. Д., Мацелюх О. В. Протеолітичні ферменти мікроорганізмів та методи їх дослідження. – Київ, 2008. – 108 с.
8. Мацелюх О. В. // Біотехнологія. – 2010. – 3, № 2. – С. 42–47.
9. Мацелюх О. В., Нідялкова Н. А., Варбанець Л. Д. // Там само. – 2011. – 4, № 3. – С. 43–50.
10. Laemmli U. K. // Nature. – 1970. – 227. – P. 680–685.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N 1. – P. 265–275.
12. Trombridg G. O., Moon H. D. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1972. – 141, N 3. – P. 928–931.
13. Masada M. // Food style. – 2004. – 8, N 1. – P. 92–95.
14. Cohn E. J., Oncley J. L., Strong L. E. et al. // J. Clin. Invest. – 1944. – 23. – P. 417–432
15. Петрова И. С., Винцюнайте М. Н. // Прикл. биохим. и микробиол. – 1966. – 2, № 1. – С. 322–327.
16. Лакін Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
17. Tsai Y., Juang R., Lin S. et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – 54, N 12. – P. 3156–3161.
18. Durham D. R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1993. – 194, N 3. – P. 1365–1370.
19. Балабан Н. П., Шарипова М. Р. // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2011. – 153, кн. 2. – С. 29–40.
20. Hua Y., Jiang B., Mine Y. et al. // J. Agric. Food Chem. – 2008. – 56, N 4. – P. 1451–1457.
21. Kim G. M., Lee A. R., Lee K. W. et al. // J. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – 19, N 9. – P. 997–1004.
22. Wang C., Du M., Zheng D. et al. // J. Agric. Food Chem. – 2009. – 57. – P. 9722–9729.
23. Hassanein W. A., Kotb E., Awany N. M. et al. // J. Biosci. – 2011. – 36, N 5. – P. 773–779.

Отримано 21.05.2012