

Н.А. Нідялкова, О.В. Мацелюх, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154,  
Київ ДСП, Д03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 23 39,  
e-mail: Nidialkova@gmail.com

## СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ПЕПТИДАЗИ 2 *BACILLUS THURINGIENSIS* IMB B-7324

**Мета.** Вивчення субстратної специфічності очищеної пептидази 2 *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324. **Методи.** Для вивчення субстратної специфічності пептидази 2 використовували білки: еластин, фібрин, фібриноген, колаген і казеїн. Визначення оптимальних співвідношень ензим-субстрат проводили за допомогою повного двофакторного дослідження. Спорідненість (константу Міхаеліса,  $K_m$ ) до субстратів пептидази 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 визначали за методом подвійних обернених величин в координатах Лайнуївера-Берка ( $1/v_0 - 1/[S]$ ). Для обчислення та графічного представлення результатів повного двофакторного експерименту використовували метод стрімкого сходження (метод Бокса-Уілсона) та комп'ютерну систему аналізу даних STATISTICA 8.0. **Результати.** Дослідження гідролізу нативних білкових субстратів пептидазою 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 показало, що ензим здатний розщеплювати фібрин, фібриноген, казеїн і колаген. Для ефективного гідролізу білків за результатами повного двофакторного дослідження було встановлено оптимальні співвідношення концентрацій ензиму і субстратів: 1 мг пептидази 2 здатен розщеплювати 54 мг фібрину, 67 мг фібриногену, 25 мг казеїну і 49 мг колагену. Показано, що досліджуваний ензим виявляє вищу спорідненість до фібрину і казеїну, для яких значення константи Міхаеліса  $K_m$  становить 1,1 і 1,2 мг, відповідно. **Висновки.** Пептидаза 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 характеризується вищою специфічністю щодо фібрину і фібриногену, ніж до казеїну і колагену, проте більшою спорідненістю до фібрину і казеїну.

**Ключові слова:** субстратна специфічність, пептидаза, константа Міхаеліса  $K_m$ .

Основною функцією мікробних позаклітинних пептидаз є розщеплення білків, які містяться в навколишньому середовищі, і перетворення їх у форму, яка здатна легко проникати в клітину. Вивчення пептидаз, що гідролізують такі важкорозчинні білкові субстрати як фібрин, еластин і колаген, є на сьогодні актуальною проблемою наукових досліджень, оскільки такі ензими можуть знайти застосування для видалення рубцевої тканини, у складі косметичних препаратів, у мийних засобах для



видалення білкових плям, у фармацевтичній промисловості як інгредієнти ліків, особливо тромболітичних, а також у шкіряній промисловості для зневоложування і зм'якшення шкіри, поліпшуючи її якість, зберігаючи товщину готової шкіри і використовуючи відщеплену щетину як вторинну сировину. Участь пептидаз в таких різних процесах зумовлена їх специфічністю, збереженням каталітичної активності в широких межах рН і температур. Раніше нами було показано [2, 3], що *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 у стаціонарній фазі на 48 год культивування синтезує метало-пептидазу (24 кДа) з фібринолітичною активністю, яка здатна зберігати активність в інтервалі значень рН від 6,0 до 11,0 і температури від 20 до 50 °С протягом 1 год. Тому метою даної роботи було вивчення субстратної специфічності очищеної пептидази 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження була пептидаза 2, виділена з *B. thuringiensis* ІМВ В-7324. Культивування штаму, виділення і очистку досліджуваного ензиму проводили як описано в роботах [2, 3].

Субстратну специфічність пептидази 2 оцінювали, використовуючи різні субстрати: еластин, фібрин, фібриноген, колаген і казеїн.

Загальну казеїнолітичну (пептидазну) активність визначали за методом Ансона в модифікації Петрової [4], який базується на кількісному визначенні тирозину, що утворюються при гідролізі казеїну під дією досліджуваного ензиму. За одиницю активності приймали здатність ензиму перетворювати за 1 хв при температурі 37 °С казеїн в неосаджений ТХО стан в кількості, яка відповідає 1 мкмоль тирозину.

Визначення фібринолітичної активності проводили за методом Masada [12], використовуючи як субстрат фібрин, отриманий з плазми крові людини на станції переливання крові. Утворення продуктів розщеплення фібрину реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібринолітичної активності приймали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв в умовах досліду.

Еластолітичну активність визначали колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ензиматичному гідролізі еластину, забарвленого конго червоним [15]. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 515 нм. За одиницю активності ензиму приймають здатність ферменту гідролізувати 1 мг еластину за даних умов (37 °С, 5 год).

Для визначення фібриногенолітичної активності в дослідну пробірку додавали фібриноген, 0,01 М Трис-НСІ буфера (рН 7,5) і досліджуваний препарат. Реакційну суміш інкубували на водяній бані при 37 °С протягом 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 10% ТХО. В контрольну пробірку ТХО додавали до початку інкубації. Зразки витримували при кімнатній температурі 20 хв, центрифугували при 10000g протягом 5 хв. В супернатанті вимірювали утворення продуктів розщеплення фібриногену на



спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібриногенолітичної активності брали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв в умовах досліду.

Для визначення колагеназної активності використовували колаген (з бичачого сухожилля). Продукти розщеплення визначали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 600 нм. Одиниця колагеназної активності еквівалентна кількості мкмолей лейцину, знайдених зі стандартної кривої [11].

Питому активність досліджуваної пептидази по відношенню до кожного субстрату виражали числом одиниць ензиматичної активності на 1 мг білка. Кількість білка визначали за методом Lowry [10]. Інтенсивність забарвлення проб вимірювали при довжині хвилі 750 нм. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Для визначення оптимальних співвідношень ензим-субстрат для ефективного гідролізу останнього був проведений повний двофакторний дослід (ПФД). Спорідненість (константу Міхаеліса,  $K_m$ ) до кожного субстрату пептидази 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 визначали за графіком, побудованим за методом подвійних обернених величин в координатах Лайнуївера-Берка ( $1/v_0 - 1/[S]$ ).

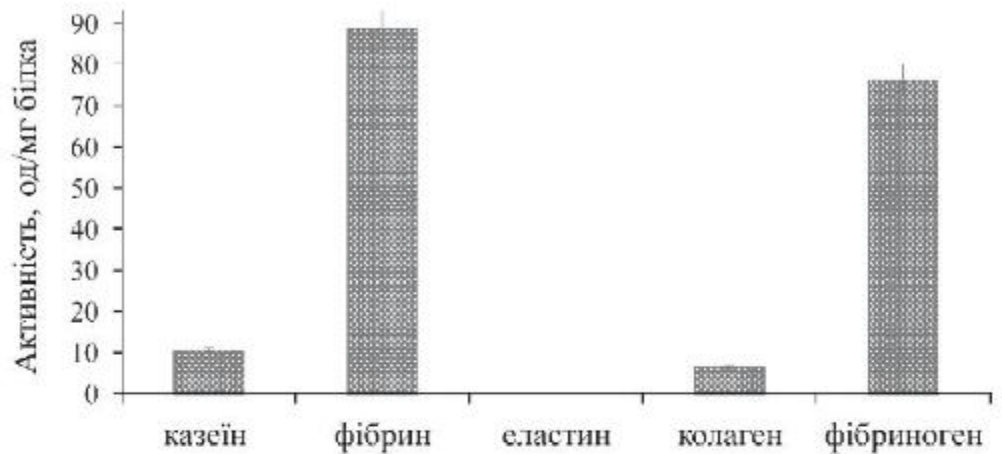
Обчислення та графічне представлення результатів повного двофакторного експерименту було проведено за методом стрімкого сходження (метод Бокса-Уілсона) за допомогою комп'ютерної системи аналізу даних STATISTICA 8.0. На рисунках наведено середні арифметичні значення за результатами п'яти повторностей, відхилення від середнього значення не перевищувало 5% [1].

### Результати та їх обговорення

Початок дослідження субстратної специфічності пептидази 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 щодо широкого спектру білкових субстратів показало (рис. 1), що ензим гідролізує фібрин, фібриноген, казеїн і колаген, але не здатен розщеплювати еластин. Найвища питома активність виявлена до фібрину і фібриногену (88,75 і 76,25 од/мг білка, відповідно).

Порівняння субстратної специфічності досліджуваного ензиму з пептидазами інших представників групи *B. cereus*, до якої відноситься *B. thuringiensis*, дало змогу виявити, що отримана нами металопептидаза подібна за субстратною специфічністю до металопептидаз, виділених з *B. cereus* і *B. anthracis*. Так, у одного зі штамів *B. anthracis* [6] виділено дві нейтральні металопептидази з молекулярними масами 36 і 46 кДа, які здатні розщеплювати різні нативні субстрати: казеїн, еластин і желатин. Отримана з *B. cereus* DSM 14729 нейтральна металопептидаза камелізін [7] проявляє специфічність щодо таких білкових субстратів, як колаген типу I, фібрин і фібриноген. Здатність розщеплювати ці субстрати зумовлює участь цього ензиму у взаємодії між хазяїном і патогеном.



Рис. 1. Гідроліз білкових субстратів пептидазою 2 *B. thuringiensis* IMV B-7324Fig. 1. Hydrolysis of protein substrates by peptidase 2 *B. thuringiensis* IMV B-7324

Відомо [5, 14, 16], що мікробні пептидази здатні гідролізувати різні білкові субстрати, зокрема, і важкорозчинні. Так [16], пептидаза *B. subtilis* DC33 здатна розщеплювати фібрин, фібриноген і казеїн, але майже не розщеплює сироватковий альбумін. Інший ензим, виділений з *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075, проявляє високу активність щодо фібрину, азоказеїну і колагену [14]. Колагеназа *B. licheniformis* F11.4 з високою швидкістю гідролізує колаген і казеїн, але з меншою — фібрин і желатин [5].

Для застосування протеолітичних ензимів в різних галузях промисловості необхідно знати не тільки їх субстратну специфічність щодо різних білків, але й оптимальні співвідношення концентрацій ензиму і субстратів для ефективного гідролізу останніх. Тому нами був проведений пошук оптимальних співвідношень концентрацій пептидази 2 *B. thuringiensis* IMV B-7324 і білків-субстратів. На основі отриманих даних двофакторного дослідження було побудовано тривимірне зображення поверхні відгуку для визначення оптимального співвідношення концентрацій субстратів (фібрин, фібриноген, казеїн і колаген) і досліджуваної пептидази, при яких досягається максимальна ензиматична активність в реакційній суміші. Так, при дії ензиму було виявлено підвищення активності при збільшенні концентрацій субстрату і самого ензиму (рис. 2). За таких умов було визначено оптимальне співвідношення пептидази 2 і білкових субстратів.

Показано (табл. 1), що 1 мг пептидази 2 здатен розщеплювати більшу кількість молекул фібрину (67 мг) і фібриногену (54 мг), ніж колагену (49 мг) і казеїну (25 мг).



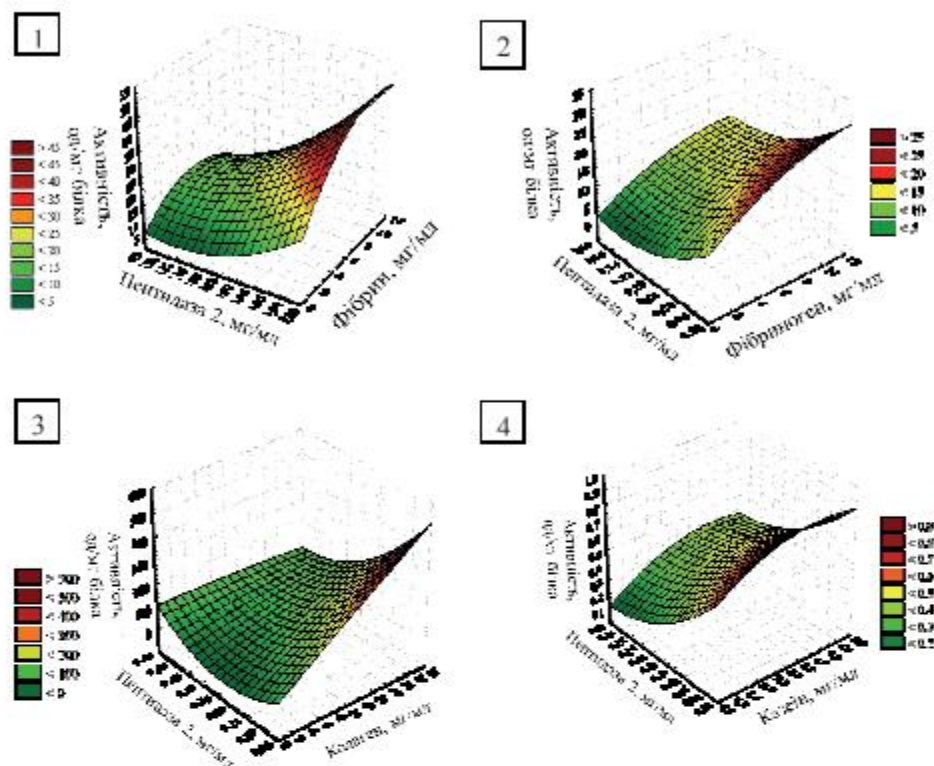


Рис. 2. Поверхня відгуку для визначення оптимальних концентрацій ензиму і субстратів

1 — фібрин, 2 — фібриноген, 3 — колаген, 4 — казеїн

Fig. 2. The response surface for determination of the optimal enzyme and substrate concentrations

1 — fibrin, 2 — fibrinogen, 3 — collagen, 4 — casein

Для практичного використання протеази 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 і можливості порівняння з аналогами необхідно вивчити її кінетичні характеристики.

Таблиця 1  
Оптимальне співвідношення ензим : субстрат (E : S) для реакції гідролізу

Table 1

The optimal ratio of enzyme : substrate (E : S) for hydrolysis

Субстрати	E : S, (мг : мг)
Еластин	-
Фібрин	1 : 54
Фібриноген	1 : 67
Казеїн	1 : 25
Колаген	1 : 49



Основним показником каталітичної активності ензимів є константа Міхаеліса ( $K_m$ ), яка свідчить про міру спорідненості ензиму до субстрату. Тому наступним етапом було встановлення параметру  $K_m$ , який визначався для таких концентрацій субстратів, за яких швидкість гідролізу збільшувалася лінійно. Для цього використовували обернені координати Лайнуївера-Берка. Визначення константи Міхаеліса досліджуваної пептидази показало, що вона має найбільшу спорідненість до фібрину і казеїну, на що вказує найменше значення  $K_m$ , яке становить 1,1 та 1,2 мг, відповідно.

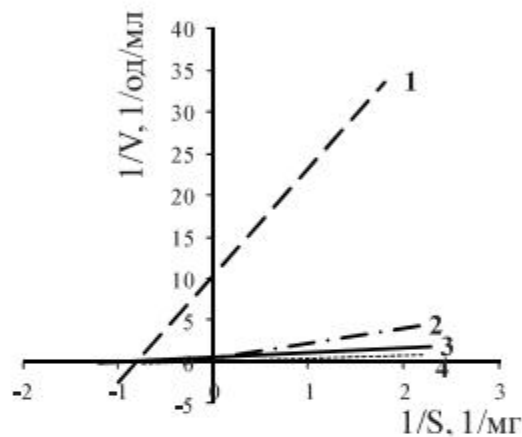


Рис. 3. Графік Лайнуївера-Берка для визначення константи Міхаеліса  $K_m$  при гідролізі пептидазою 2 *B. thuringiensis* IMV B-7324 субстратів  
1 — казеїн, 2 — фібриноген, 3 — фібрин, 4 — колаген

Fig. 3. Lineweaver-Burk plots for *B. thuringiensis* IMV B-7324 peptidase 2 indicating the  $K_m$  values using various substrates  
1 — casein, 2 — fibrinogen, 3 — fibrin, 4 — collagen

Порівняння  $K_m$  пептидаз різних мікроорганізмів щодо досліджуваних білків показало (табл. 2), що пептидаза 2 *B. thuringiensis* IMV B-7324 характеризувалася більшою спорідненістю по відношенню до фібрину, ніж пептидаза *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 ( $K_m$  1,1 і 5,0, відповідно) [14].

Що стосується гідролізу казеїну, то  $K_m$  пептидази 2 *B. thuringiensis* IMV B-7324 значно менша, ніж для пептидаз *B. licheniformis* B18 і *Aspergillus tubingensis* NIISS 08155 (1,2; 3,1 і 45,0, відповідно) [8, 13]. Проте, при розщепленні колагену значення  $K_m$  досліджуваного ензиму більше, ніж для пептидаз, виділених з *B. cereus* MBL13 і *B. licheniformis* F11.4 [5, 9]. На жаль, в літературі відсутня інформація щодо  $K_m$  різних пептидаз відносно фібриногену, тому провести порівняльний аналіз нам не вдалося.



Таблиця 2

 $K_m$  різних пептидаз мікробного походження

Table 2

 $K_m$  of different microbial peptidases

Субстрат	Джерело пептидази	$K_m$ , мг
Фібрин	<i>B. thuringiensis</i> ІМВ В-7324	1,1
	<i>Candida guilliermondii</i> NRRL Y-2075 [14]	5,0
Фібриноген	<i>B. thuringiensis</i> ІМВ В-7324	3,3
Колаген	<i>B. thuringiensis</i> ІМВ В-7324	11,1
	<i>B. cereus</i> MBL13 [9]	1,3
	<i>B. licheniformis</i> F11.4 [5]	0,3
Казеїн	<i>B. thuringiensis</i> ІМВ В-7324	1,2
	<i>B. licheniformis</i> B18 [8]	3,1
	<i>Aspergillus tubingensis</i> NIICC 08155 [13]	45,0

Таким чином, пептидаза 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 характеризується більшою специфічністю щодо фібрину і фібриногену, ніж до казеїну і колагену, проте більшою спорідненістю щодо фібрину і казеїну.

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

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154,  
 Киев ГСП, Д03680, Украина, тел.: +38 (044) 526 23 39,  
 e-mail: Nidialkova@gmail.com

## СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЕПТИДАЗЫ 2 *BACILLUS THURINGIENSIS* ИМВ В-7324

### Реферат

**Цель.** Исследование субстратной специфичности очищенной пептидазы 2 *Bacillus thuringiensis* ИМВ В-7324. **Методы.** Для изучения субстратной специфичности пептидазы 2 использовали белки: эластин, фибрин, фибриноген, коллаген и казеин. Определение оптимальных соотношений фермент-субстрат проводили с помощью полного двухфакторного опыта (ПФО). Средство (константу Михаэлиса,  $K_m$ ) к субстратам пептидазы 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 определяли по



методу двойных обратных величин в координатах Лайнуивера-Бэрка ( $1/v_0 - 1/[S]$ ). Для вычисления и графического представления результатов полного двухфакторного опыта использовали метод стремительного восхождения (метод Бокса-Уилсона) и компьютерную систему анализа данных STATISTICA 8.0. **Результаты.** Исследование гидролиза нативных белковых субстратов пептидазой 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 показало, что фермент расщепляет фибрин, фибриноген, казеин и коллаген. Для эффективного гидролиза белков по результатам полного двухфакторного опыта (ПФО) были установлены оптимальные соотношения концентраций фермента и субстратов: 1 мг пептидазы 2 может расщепить 54 мг фибрина, 67 мг фибриногена, 25 мг казеина и 49 мг коллагена. Показано, что исследуемый фермент проявляет большее сродство к фибрину и казеину, для которых значения константы Михаэлиса  $K_m$  составляет 1,1 и 1,2 мг, соответственно. **Выводы.** Пептидаза 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 характеризуется более высокой специфичностью к фибрину и фибриногену, чем к казеину и коллагену, но большим сродством к фибрину и казеину.

**Ключевые слова:** субстратная специфичность, пептидаза, константа Михаэлиса  $K_m$ .

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

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,  
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, GSP, D03680, Ukraine,  
tel.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: Nidialkova@gmail.com

## SUBSTRATE SPECIFICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IMV B-7324 PEPTIDASE 2

### Summary

**Aim.** Investigation of substrate specificity of the purified peptidase 2 from *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324. **Methods.** To study the substrate specificity of the peptidase 2 we used protein: elastin, fibrin, fibrinogen, collagen and casein. Determination of the optimal ratio of the enzyme-substrate was carried out a two-level factorial design. Substrate affinity (Michaelis constant,  $K_m$ ) of enzyme was established by the double reciprocal coordinates in the Lineweaver-Burk ( $1/v_0 - 1/[S]$ ). For calculation and graphic presentation of the results obtained by two factorial experiments there were used Box-Wilson method and computer program STATISTICA 8.0. **Results.** The study of hydrolysis of native protein substrates by *B. thuringiensis* IMV B-7324 peptidase 2 showed that the enzyme is able to cleave the fibrin, fibrinogen, casein and collagen. For effective hydrolysis of proteins according to the results of full two-way experience (CFE) was determined the optimal correlation of enzyme concentration and substrates





concentration. So 1 mg of peptidase 2 is able to cleave 54 mg of fibrin, 67 mg of fibrinogen, 25 mg of casein and 49 mg of collagen. It was shown that the examine enzyme is more affinity to the fibrin and casein for that the Michaelis constant  $K_m$  is 1.1 and 1.2 mg, respectively. **Conclusions.** The peptidase 2 of *B. thuringiensis* IMV B-7324 is characterized by higher specificity to the fibrin and fibrinogen than to casein and collagen, but more affinity to fibrin and casein.

**Key words:** substrate specificity, peptidase, Michaelis constant  $K_m$ .

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Лакин Г.Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. Школа, 1990. — 352 с.
2. *Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д.* Виділення фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 // Мікробіол. журн. — 2012. — 74, № 5. — С. 9–15.
3. *Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д.* Оптимізація середовища для синтезу фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 // Біотехнологія. — 2012. — 5, № 4. — С. 74–81.
4. *Петрова И.С., Винцюнайте М.Н.* Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохимия и микробиология. — 1966. — 2, № 1. — С. 322–327.
5. *Baehaki A., Suhartono M.T., Sukarno, Syah D., Sitanggang A.B., Setyahadi S., Meinhardt F.* Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4 // Afr. J. Microbiol. Res. — 2012. — 6, N 10. — P. 2373–2379.
6. *Chung M.C., Popova T.G., Millis B.A., Mukherjee D.V., Zhou W., Liotta L.A., Petricoin E.F., Chandhoke V., Bailey C., Popov S.G.* Secreted Neutral Metalloproteases of *Bacillus anthracis* as Candidate Pathogenic Factors // J. Biol. Chem. — 2006. — 281, N 42. — P. 31408–31418.
7. *Grass G., Schierhorn A., Sorkau E., Møller H., Rьcknagel P., Nies D.H., Fricke B.* Camelysin is a novel surface metalloproteinase from *Bacillus cereus* // Infect. Immun. — 2004. — 72, N 1. — P. 219–228.
8. *Kumari B.L., Rani M.R.* Characterization studies on caseinolytic extracellular alkaline protease from a mutant *Bacillus licheniformis* // Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res. — 2013. — 2, № 1. — P. 284–289.
9. *Liu L., Ma M., Cai Z., Yang X., Wang W.* Purification and Properties of a Collagenolytic Protease Produced by *Bacillus cereus* MBL13 Strain // Food Technol. Biotechnol. — 2010. — 48, N 2. — P. 151–160.
10. *Lowry O.H., Rosebrough H.J., Faar A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 193, N 1. — P. 265–275.
11. *Mandl I.* Collagenase // Science. — 1970. — 169, N 3951. — P. 1234–1238.



12. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // Food style. — 2004. — 8, N 1. — P. 92–95.

13. Morya V.K., Yadav D. Production and partial characterization of neutral protease by an indigenously isolated strain of *Aspergillus tubingensis* NIICC-08155 [Електронний ресурс] // The Internet J. Microbiol. — 2010. — 8, N 1. — Режим доступу до журн.: <http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume-8-number-1/production-and-partial-characterization-of-neutral-protease-by-an-indigenously-isolated-strain-of-aspergillus-tubingensis-niicc-08155-2.html#sthash.EZ06gHeY.dpbs>.

14. Rashad M.M., Mahmoud A.E., Al-Kashef A.S., Nooman M.U. Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme by *Candida guilliermondii* Grown on Sunflower Oil Cake // J. Appl. Sci. Res. — 2012. — 8, N 2. — P. 635–645.

15. Trombridg G.O. Purification of human elastase / G.O. Trombridg, H.D. Moon // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1972. — 141, 3. — P. 928–931.

16. Wang C. T., Ji B. P., Li B., Nout R., Li P.L., Ji H., Chen L.F. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2006. — 33, N 9. — P. 750–758.

Стаття надійшла до редакції 19.03.2013 р.

