

*Л.Д. Варбанець¹, О.В. Мацелюх¹, О.В. Гудзенко¹, Н.А. Нідялкова¹,
П.П. Зелена², Ю.В. Юмина², Л.Г. Степура², В.В. Шепелевич², С.І. Войчук¹*

*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*

СКРИНІНГ ПРОДУЦЕНТІВ α -L-РАМНОЗИДАЗ І ПЕПТИДАЗ СЕРЕД ПРЕДСТАВНИКІВ АКТИНОБАКТЕРІЙ ТА БАЦИЛ

***Мета.** Провести скринінг продуцентів пептидаз, а також α -L-рамнозидаз серед актинобактерій та бацил. **Методи.** Були використані біохімічні методи визначення α -L-рамнозидазної, еластазної, казеїнолітичної, фібринолітичної та колагеназної активностей. **Результати.** Внаслідок скринінгу, проведеного серед 31 штаму актинобактерій та 24 штамів бацил, не виявлено жодного штаму актинобактерій, здатного синтезувати ензим з еластазною активністю, але деякі актинобактерії виявилися активними продуцентами колагеназ. Що стосується бацил, то еластолітична активність була виявлена тільки в п'яти досліджених штаммах, але її рівень не представляє інтересу до подальших досліджень, у той час як фібринолітична активність двох штамів *Bacillus subtilis* 121 і 108 була досить високою (0,100 од/мг і 0,092 од/мг білка відповідно). **Висновки.** Найбільш ефективними продуцентами колагенази і α -L-рамнозидази є штаму актинобактерій 6/5, виділений з ризосфери кропиви, а пептидази з фібринолітичною активністю - *B. subtilis* 121 і 108. Ці штаму можна вважати перспективними для подальших досліджень.*

К л ю ч о в і с л о в а : актинобактерії, бацили, α -L-рамнозидаза, протеази.

В останні роки у різних галузях промисловості і медицини все більш широке застосування знаходять ферменти протеолітичної і гліколітичної дії. Але на даний момент в Україні не існує налагоджених ліній виробництва цих ферментів, немає промислових штамів-продуцентів, а потреби в них задовольняються, в основному, за рахунок імпорту ферментних препаратів. Так, італійські та іспанські протеолітичні ферментні препарати широкої субстратної специфічності застосовуються на стадії пом'якшення голини, у той час як препаратів для зневолошення голини, які б мали високу кератинолітичну активність, поки що не існує. Що стосується α -L-рамнозидаз, то в Україні їх продуценти взагалі відсутні, а висока вартість комерційних ензимних препаратів іноземного виробництва суттєво гальмує їх використання в промислових технологіях нашої держави. Тому актуальним є пошук вітчизняних потенційних продуцентів α -L-рамнозидаз і протеаз. У цьому відношенні мікроорганізми є перспективним об'єктом дослідження, оскільки біотехнологічні процеси з їх участю мають ряд переваг перед використанням для цієї мети рослинної або тваринної сировини. Це обумовлено необмеженістю джерел мікробних продуцентів, великою швидкістю їх розмноження і контрольованими умовами синтезу, що створює умови для отримання речовин з передбаченими властивостями і специфічністю дії.

Раніше [3, 9] у відділі біохімії мікроорганізмів ІМВ НАНУ в результаті скринінгу було знайдено активні продуценти протеаз і α -L-рамнозидаз серед стрептоміцетів, а також мікроміцетів відповідно. Досліджено деякі фізико-хімічні властивості очищених ферментних препаратів, субстратну специфічність [2, 8]. Але існуючі ферментні препарати характеризуються рядом недоліків: у біотехнологічних процесах, в яких використовуються дані ферменти, дуже важливими є такі їх властивості, як висока активність та стабільність при підвищених температурах у концентрованих розчинах субстрату і продукту реакції.

Тому метою даної роботи було провести скринінг продуцентів протеаз, а також α -L-рамнозидаз серед актинобактерій та бацил.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були: 31 штам актинобактерій та 24 штами бацил з колекції культур кафедри мікробіології та загальної імунології Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Актинобактерії були виділені із ризосфери різних рослин: ожини (штами 1, 2, 4), кропиви (штами 6/5, 9, 11–16, 18, 19), звіробоя (штами 20, 25, 27, 31–36, 39, 41), чистотілу (штами 42, 50), хвоща (штами 54, 59, 60, 62, 64). Досліджувані бацили були представниками двох видів: *Bacillus subtilis* (штами 80, 102, 103–108, 110, 111, 113–116, 118–122) і *Bacillus cereus* (штами 197, 201, 202, 211, 212). При дослідженнях α -L-рамнозидазної активності актинобактерії вирощували у пробірках на рідкому середовищі такого складу, г/л: рамноза – 5; K_2HPO_4 – 0,5; NaCl – 0,5; CaCl_2 – 0,01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; соєве борошно – 8,0; рН 5,0. При визначенні казеїнолітичної (загальної протеолітичної), колагеназної та еластазної активності актинобактерії вирощували на рідкому поживному середовищі наступного складу (г/л): мальтоза – 20; K_2HPO_4 – 0,5; NaCl – 0,5; CaCl_2 – 0,01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; соєве борошно – 8,0; рН 7,5. Культивування актинобактерій проводили у пробірках протягом 3 діб в умовах качалок при 220 об/хв та температурі 28 °С.

Досліджувані штами бацил вирощували у пробірках з 10 мл поживного середовища наступного складу (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; рН – 6,5–6,7 в умовах качалки при 220 об/хв, при 42 °С протягом 72 год [5].

Ферментативні активності досліджували в супернатантах культуральних рідин, отриманих шляхом осадження клітин центрифугуванням при 10 000 г протягом 20 хв.

Вміст білка визначали за методом Lowry та ін. [10]. Інтенсивність забарвлення проб вимірювали при довжині хвилі 750 нм. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Для визначення α -L-рамнозидазної активності до 0,1 мл розчину ензиму додавали 0,2 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буферу (ФЦБ) рН 5,2 та 0,1 мл 0,01 М розчину субстрату (*n*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозид) у ФЦБ. Реакційну суміш інкубували протягом 10 хв при температурі 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 1 М розчину бікарбонату натрію. До контролю додавали ті ж компоненти, але у зворотному порядку. Кількість *n*-нітрофенолу, який було відщеплено у результаті гідролізу, визначали колориметричним методом на спектрофотометрі СФ-26 за поглинанням при

400 нм [14]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв в умовах досліду.

Загальну казеїнолітичну активність визначали за методом [7], який базується на кількісному визначенні тирозину, що утворюється при гідролізі казеїну під дією досліджуваних ензимів. У 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 протягом 30 хв, після чого в дослідну пробірку вносили 2 мл 4 % розчину ТХО, витримували 20 хв при кімнатній температурі та центрифугували при 10000 g протягом 5 хв. До 0,5 мл супернатанту додавали 2,5 мл 0,5 М 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 у неосаджений трихлороцтовою кислотою стан у кількості, що відповідає 1 мкмоль тирозину.

Еластолітичну активність визначали колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ензиматичному гідролізі еластину, забарвленого конго червоним [16]. Інкубаційна суміш містила 2 мл 0,01 М Трис-НСІ буфера (рН 7,5), 5 мг еластину, забарвленого 0,002 % розчином конго червоним та 1 мл розчину ензиму. Суміш витримували протягом 3 год при 37 °С. Реакцію зупиняли, витримуючи пробірки з реакційною сумішшю на льодяній бані протягом 30 хв. Негідролізований еластин відділяли центрифугуванням при 10000 g, 5 хв. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 515 нм.

При вивченні колагеназної активності [11] інкубаційну суміш, яка містила 10 мг колагену, 2 мл 0,01 Трис-НСІ буфера (рН 7,5) і 1 мл досліджуваного препарату, витримували на водяній бані 5 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 0,2 М 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. За одиницю колагеназної активності приймали кількість мкмолей вивільненого лейцину згідно зі стандартною кривою, побудованою за лейцином.

Визначення фібринолітичної активності проводили за методом Masada [12], у якості субстрату використовуючи фібрин, який був отриманий з плазми крові людини. У дослідну пробірку додавали 1 мг фібрину, 1,8 мл 0,01 М Трис-НСІ буфера (рН 7,5) і 0,2 мл досліджуваного препарату. Реакційну суміш інкубували на водяній бані при 37 °С протягом 30–45 хв. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 10 % розчину ТХО. У контрольну пробірку ТХО додавали одразу. Зразки витримували при кімнатній температурі 20 хв, центрифугували при 10000 g протягом 5 хв. В супернатанті вимірювали утворення продуктів розщеплення фібрину на спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібринолітичної активності брали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв.

Для статистичної обробки експериментальних даних використовували параметричні критерії нормального розподілу, враховуючи середнє арифметичне ($X_{\text{ср}}$), середню квадратичну похибку ($S_{\text{ср}}$), при рівнях значимості 0,05, визначали критерій Ст'юдента t і, згідно таблиці для малих виборок, знаходили рівні значимості (P) різниці або відносин середніх величин. Результати статистичної обробки представляли у вигляді довірчих інтервалів або $X_{\text{ср}} \pm S_{\text{ср}}$. Відносну похибку середніх значень одержували в результаті обробки 5 повторів [6].

Результати та обговорення. Особливу увагу дослідників в останні роки привертають такі ферменти, як α -L-рамнозидази, що гідролітично відщеплюють термінальні невідновлені α -1,2, α -1,4 та α -1,6-зв'язані залишки L-рамнози в α -L-рамнозидах. Характерною особливістю цієї групи ферментів є абсолютна специфічність щодо конфігурації зв'язків, які вони можуть розщеплювати. Такі властивості ферментів дають можливість використовувати їх у різних галузях харчової промисловості для підсилення аромату вин та зняття гіркоти цитрусових соків, особливо грейпфрутових [13], а також у медицині – для створення лікарських засобів.

Відсутність вітчизняних препаратів α -L-рамнозидази поставила перед нами завдання пошуку продуценту даного ферменту. Раніше [9] нами в супернатантах культуральної рідини мікроорганізмів різних таксономічних груп (бактерій, дріжджів та мікроміцетів – усього 692 штами) α -L-рамнозидазна активність була виявлена у 35,7 % досліджених культур і складала від 0,02 до 0,20 од/мг білка. Але актинобактерії як продуценти α -L-рамнозидази досі не вивчались. Тому нами був проведений скринінг продуцентів α -L-рамнозидаз серед 31 штаму актинобактерій, які вирощували на середовищі, що містило потенційний індуктор ензиму – L-рамнозу. Встановлено, що в супернатанті культуральної рідини 14 штамів виявлено α -L-рамнозидазну активність (табл. 1). Найбільш перспективним виявився штам 6/5, який проявляв активність 0,20 од/мг білка. Дещо поступалися штамми 34 (0,15 од/мг), 64 (0,13 од/мг),

Таблиця 1
Скринінг продуцентів α -L-рамнозидази серед актинобактерій

№ штаму	Активність, од/ мг білка	№ штаму	Активність, од/ мг білка
1	0	31	0
2	0	32	0
4	0	33	0
6/5	0,20±0,01	34	0,15±0,0075
9	0,03±0,0015	35	0,07±0,0035
11	0	36	0,08±0,004
12	0	39	0,05±0,0025
13	0,03±0,0015	41	0
14	0	42	0
15	0	50	0
16	0,12±0,0016	54	0,03±0,0015
18	0	59	0
19	0,02±0,001	60	0,03±0,0015
20	0,10±0,005	62	0
25	0	64	0,13±0,0065
27	0,05±0,0025		

16 (0,12 од/мг), 20 (0,10 од/мг). Штами 9, 13, 19, 27, 35, 36, 39, 54, 60 проявляли незначну активність від 0,02 до 0,08 од/мг білка. Всі інші штами взагалі не проявляли α -L-рамнозидазної активності.

Отже, відсоток активних продуцентів α -L-рамнозидаз серед досліджуваних штамів актинобактерій виявився досить значним і складав 45,1 %.

Порівняльний аналіз α -L-рамнозидазної активності досліджуваних штамів у залежності від джерела, з якого вони були виділені, показав, що найбільш активні штами були виділені з ризосфери кропиви (6/5 і 10), хвоща (64) та звіробоя (34, 20). Жодного активного штаму не було виділено з ризосфери ожини або чистотіла.

Не менш цікаві результати одержані при скринінгу досліджених штамів актинобактерій на пептидази, що гідролізують пептидні зв'язки в білках і пептидах. Дослідження пептидаз мають значення як з теоретичної точки зору – для розуміння структури білків і пептидів, механізму ензиматичного каталізу, так і з практичної – для застосування у різних галузях промисловості, а також у медицині. Серед пептидаз мікроорганізмів особливе місце посідають ензими, які здатні розщеплювати важкорозчинні білки – еластин, фібрин, колаген, структура яких, завдяки утворенню міжмолекулярних зшивок, є міцною та резистентною до протеолізу. Еластин є складовою еластинових волокон сполучної тканини, а фібрин – кров'яних згустків судин. Пептидази з еластолітичною і фібринолітичною активністю можуть бути використані в створенні медичних препаратів для лікування трофічних виразок, гнійних ран, опіків і для розчинення фібринових згустків, у м'ясопереробній галузі – у процесах дозрівання м'яса, а також у складі миючих засобів для видалення нерозчинних білкових забруднень. Використання колагенази дає можливість досягти високого рівня виробництва і якості готової продукції у такій галузі промисловості як шкіряна, зокрема для поліпшення якості голини, гідролізу кісткових тканин, хрящів і стінок кровоносних судин, а також їх застосовують на стадії утилізації відходів виробництва. Завдяки використанню колагеназ вдалося вирішити цілий ряд проблем у практичній медицині, а також у косметології – для поліпшення якості кремів та масок. Кількість мікробних продуцентів пептидаз вкрай обмежена, і на сьогодні найбільш відомими є наттокіназа *B. subtilis* [17], виділена з ферментованих соєвих продуктів традиційної азіатської їжі, еластаза *Pseudomonas aeruginosa* [15], колагеназа *Clostridium histolyticum* [1], а також пептидаза з еластолітичною активністю *B. subtilis* 316М [4].

У супернатанті культуральних рідин, отриманих при вирощуванні актинобактерій на рідкому середовищі, загальна протеолітична (казеїнолітична) активність практично була відсутньою у досліджених штамів, і тільки деякі із них – 9, 12, 16, 31, 32, 39 та 64 – проявляли незначну активність (табл. 2). Що стосується колагеназної активності, то найбільшу активність (від 26,42 до 52,38 од/мг білка) виявили штами, виділені з ризосфери кропиви (6/5, 12), звіробою (20) та хвоща (64). Помірну активність (від 6,41 до 14,06 од/мг білка) виявили штами, виділені відповідно з ожини (2), звіробою (31, 39) і чистотілу (42). Не виявлено жодного штаму, здатного синтезувати ензим з еластазною активністю.

Таким чином, деякі з досліджених штамів актинобактерій можна вважати ефективними продуцентами колагеназ.

Скринінг продуцентів протеаз серед актинобактерій

№ штаму	Казеїнолітична (загальна протеолітична) активність, од/мг білка	Колагеназна активність, од/мг білка
1	0	0,02 ± 0,001
2	0	6,41 ± 0,32
4	0	0,09 ± 0,005
6/5	0	52,38 ± 2,62
9	0,067 ± 0,030	0,08 ± 0,004
11	0	0,06 ± 0,003
12	0,02 ± 0,001	23,33 ± 1,17
13	0	0
14	0	0
15	0	0,08 ± 0,004
16	0,043 ± 0,002	0
18	0	0,06 ± 0,003
19	0	0
20	0	31,25 ± 1,56
25	0	0,18 ± 0,01
27	0	0,16 ± 0,008
31	0,002 ± 0,0001	8,33 ± 0,42
32	0,002 ± 0,0001	0
33	0	0
34	0	0,21 ± 0,011
35	0	0,04 ± 0,002
36	0	0
39	0,006 ± 0,0003	9,43 ± 0,47
41	0	0
42	0	14,06 ± 0,7
50	0	0,18 ± 0,01
54	0	0,38 ± 0,019
59	0	0,09 ± 0,005
60	0	0,12 ± 0,006
62	0	0
64	0,006 ± 0,0003	26,42 ± 1,32

Скринінг продуцентів пептидаз серед досліджених штамів бацил (табл. 3) свідчить, що на відміну від актинобактерій, усі досліджені штамми проявляли протеолітичну активність щодо казеїну, причому деякі з них, наприклад, штам 202, проявляв досить високу активність. Що стосується фібринолітичної активності, то тільки 7 із 24 штамів її проявляли, деякі з них, зокрема штам 121 (0,100 од/мг білка) і штам 108 (0,092 од/мг

білка) були найбільш активними. Еластолітична активність була виявлена лише в 5-ти досліджених штаммах і її рівень не становить інтересу до подальших досліджень.

Цікавим виявився факт, що тільки 4 штами бацил проявили колагеназну активність і хоча у порівнянні з колагеназною активністю, виявленою у актинобактерій, вона значно нижча, її наявність може слугувати додатковою біологічною характеристикою цих штамів бацил.

Таблиця 3

Скринінг продуцентів пептидаз серед представників бацил

Штам:	ПА, од/мг білка	ФА, од/мг білка	ЕА, од/мг білка	КА, од/мг білка
<i>Bacillus subtilis</i>				
80	0,033 ± 0,002	-	-	-
102	0,002 ± 0,0001	-	-	-
103	0,030 ± 0,0015	0,033 ± 0,002	0,006 ± 0,0003	-
104	0,036 ± 0,0018	-	-	-
105	0,016 ± 0,0008	-	-	-
106	0,054 ± 0,0027	-	-	-
107	0,004 ± 0,0002	-	-	-
108	0,095 ± 0,005	0,092 ± 0,005	0,016 ± 0,0008	0,33 ± 0,017
110	0,003 ± 0,00015	-	-	-
111	0,097 ± 0,005	0,072 ± 0,004	0,013 ± 0,0007	-
113	0,011 ± 0,0006	-	-	-
114	0,001 ± 0,00005	-	-	-
115	0,033 ± 0,002	-	-	1,49 ± 0,075
116	0,023 ± 0,001	-	-	1,09 ± 0,055
118	0,001 ± 0,00005	-	-	-
119	0,008 ± 0,0004	-	-	-
120	0,009 ± 0,0005	-	-	1,35 ± 0,068
121	0,113 ± 0,0057	0,100 ± 0,005	0,009 ± 0,0005	-
122	0,004 ± 0,0002	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>				
197	0,056 ± 0,028	0,025 ± 0,001	-	-
201	0,002 ± 0,0001	-	-	-
202	0,419 ± 0,021	0,061 ± 0,003	0,006 ± 0,0003	-
211	0,005 ± 0,0003	-	-	-
212	0,041 ± 0,021	0,044 ± 0,002	-	-

Примітка: "-" – активності немає

ПА – казеїнолітична (загальна протеолітична) активність, КА – колагеназна активність, ФА – фібринолітична активність, ЕА – еластазна активність

Виявлення штаму актинобактерій з досить високою колагеназною активністю (зокрема, 6/5) представляє інтерес для подальших досліджень як з теоретичної, так і практичної точки зору. Відомо [1], що колагенази, виділені із різних джерел (тканин хребетних, крабів, личинок мух, а також із культуральних рідин або клітин мікроорганізмів - бактерій, грибів, актинобактерій), мають декілька загальних структурних особливостей, зо-

крема в області субстрат-зв'язуючої ділянки молекули ензиму. Але всі ці ферменти відрізняються структурою, специфічністю дії на колагенові волокна та використовуються для різних наукових і прикладних цілей. Виділення колагеназ з тканин тварин представляє собою дуже трудомісткий процес, який є економічно не вигідним внаслідок малого вмісту цих ензимів у тканинах у порівнянні з іншими білками. Також варто зазначити, що тільки мікробні колагенази і колагенази амфібій здатні гідролізувати колагени до їх повного розчинення. Колагенолітичні ензими мікроорганізмів унікальні за своєю здатністю за різних умов оточуючого середовища (рН, температура, іонна сила) вибірково гідролізувати потрібну спіраль молекули нативного нерозчинного білка колагену, який є компонентом матрикса сполученої тканини (шкіра, сухожилля, кістки, хрящі) вищих тварин. Колагени відносяться до фібрилярних білків групи склеропротеїнів.

Хоча деякі з колагеназ, одержаних як електрофоретично гомогенні препарати, охарактеризовані за молекулярною масою, ізоелектричною точкою, чутливістю до інгібіторів, специфічністю дії, а також класифіковані за складом активних центрів – у цілому питання синтезу колагеназ мікроорганізмами, їх властивостей, можливостей використання на сьогодні все ще недостатньо досліджені і розкриті. Колагенази на сьогодні знайдені лише у незначній кількості мікроорганізмів і тому викликають інтерес у дослідників для подальшого пошуку та вивчення.

Таким чином, внаслідок скринінгу, проведеного серед 31 штаму актинобактерій та 24 штамів бацил не виявлено жодного штаму актинобактерій, здатного синтезувати ензим з еластазною активністю, але деякі актинобактерії виявилися активними продуцентами колагеназ. Зокрема, штам актинобактерій 6/5, виділений з ризосфери кропиви, виявився найбільш ефективним продуцентом колагенази і α -L-рамнозидази. Що стосується бацил, то еластолітична активність була виявлена тільки у п'яти досліджених штаммах, але її рівень не представляє інтересу до подальших досліджень, у той час як фібринолітична активність двох штамів *Bacillus subtilis* 121 і 108 була досить високою (0,100 і 0,092 од/мг білка відповідно). Ці штами можна вважати перспективними для подальших досліджень.

**Л.Д. Варбанец¹, Е.В. Мацелюх¹, Е.В. Гудзенко¹,
Н.А. Нидялкова¹, П.П. Зеленая², Ю.В. Юмына²,
Л.Г. Степура², В.В. Шепелевич², С.И. Войчук¹**

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

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

СКРИНІНГ α -L-РАМНОЗИДАЗ І ПЕПТИДАЗ СРЕДИ АКТИНОБАКТЕРІЙ І БАЦИЛЛ

Резюме

Цель. Провести скрининг продуцентів пептидаз, а також α -L-рамнозидаз серед актинобактерій і бацилл. **Методы.** Были использованы биохимические методы определения α -L-рамнозидазной, эластазной, казеинолитической, фибринолитической и коллагеназной активностей. **Результаты.** Вследствие скрининга, проведенно-

го среди 31 штамма актинобактерий и 24 штаммов бацилл, не выявлено ни одного штамма актинобактерий, способного синтезировать энзим с эластазной активностью, но некоторые актинобактерии оказались активными продуцентами коллагеназ. Что касается бацилл, то эластолитическая активность была выявлена только у пяти исследуемых штаммов, но ее уровень не представляет интерес для дальнейших исследований. В то же время, фибринолитическая активность двух штаммов *Bacillus subtilis* 121 и 108 была достаточно высокой (0,100 ед/мг белка и 0,092 ед/мг белка соответственно). **Выводы.** Наиболее эффективными продуцентами коллагеназы и α -L-рамнозидазы является штамм актинобактерий 6/5, выделенный из ризосферы крапивы, а пептидазы с фибринолитической активностью - *B. subtilis* 121 и 108. Эти штаммы можно считать перспективными для дальнейших исследований.

К л ю ч е в ы е с л о в а: актинобактерии, бациллы, α -L-рамнозидаза, протеазы.

**L.D. Varbanets¹, O.V. Matseliuk¹, O.V. Gudzenko¹,
N.A. Nidialkova¹, P.P. Zelena², Yu.V. Yumina²,
L.G. Stepura², V.V. Schepelevich², S.I. Voychuk¹**

¹Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,

154 Acad. D.K. Zabolotnogo Str., Kyiv, 03143, Ukraine

²Taras Shevchenko Kyiv National University

SCREENING OF α -L-RHAMNOSIDASES AND PEPTIDASES AMONG ACTINOBACTERIUM AND BACILLI

Summary

Purpose. To carry out screening of peptidases and α -L-rhamnosidases producers among actinobacterium and bacilli. **Methods.** The biochemical methods of α -L-rhamnosidase, elastase, caseinolytic, fibrinolytic and collagenase activity determination have been used. **Results.** Among 31 strains of actinobacterium and 24 strains of bacilli it was not exhibited any enzyme with elactolytic activity, while a number of actinobacterium strains displayed high collagenase activity. As to bacilli, elastolytic activity was observed only in five strains, however its level is not an interest for future investigations. *Bacillus subtilis* 121 and 108 exerted enough high activity (0.100 and 0.092 U/mg of protein respectively). **Conclusion.** The most effective producer of collagenase and α -L-rhamnosidase is actinobacterium strain 6/5 isolated from nettle zhisosphere, while peptidase with fibrinolytic activity - *B. subtilis* 121 and 108. We believe these strains may be perspective for further researches.

К е y w o r d s: actinobacterium, bacilli, α -L-rhamnosidase, proteases.

1. Варбанец Л.Д., Мацелюх О.В. Пептидазы микроорганизмов и методы их исследования. – К.: Наукова думка. – 2014. – 322 с.
2. Иванко О.В., Варбанець Л.Д., Валагурова О.В. Колагеназна активність *Streptomyces* sp. 1349 // Мікробіологічний журнал. – 2002. – Т. 64, № 6. – С. 21–27.
3. Иванко О.В., Варбанець Л.Д., Валагурова О.В., Нагорна С.С., Редчиць Т.І., Жданова Н.Н. Скринінг продуцентів колагенази і кератинази // Мікробіологічний журнал. – 2002. – Т. 64, № 1. – С. 31–36.
4. Колтукова Н.В., Бондарчук А.А., Левитина Т.Л. Множественные формы щелочной сериновой протеиназы *Bacillus mesentericus* // Микробиол. журнал. –

1983. – Т. 45, № 6. – С. 90–92.

5. Колтукова Н.В., Васкивнюк В.Т. Подбор методов выделения протеолитического комплекса из *Bacillus mesentericus* 316м при глубинном выращивании // Микробиол. журнал. – 1980. – Т. 42, № 2. – С. 245–249.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. Школа. – 1990. – 352 с.
7. Петрова И.С., Винцуняйте М.Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохимия и микробиология. – 1966. – Т. 2, № 1. – С. 322–327.
8. Рзаева О.М., Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Дослідження особливостей будови активних центрів α -L-рамнозидаз *Penicillium commune* 266 // Укр. Біохім. Журнал. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 42–51.
9. Рзаева О.М., Борзова Н.В., Варбанець Л.Д., Соколова О.В., Харкевич О.С., Жданова Н.М., Сафронова Л.А. Скринінг мікроорганізмів-продуцентів α -L-рамнозидази // Мікробіологічний журнал. – 2005. – Т. 67, № 5. – С. 19–27.
10. Lowry O.H., Rosebrough H.J., Faar A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, № 1. – P. 265–275.
11. Mandl I. Collagenase // Science. – 1970. – V. 169, № 3951. – P. 1234–38.
12. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // Food style. – 2004. – V. 8, № 1. – P. 92–95.
13. Puri M. Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects // Appl. Microb. Biotechnol. – 2012. – V. 93, № 1. – P. 49–60.
14. Romero C., Manjon A., Bastida J. A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase // Analytical Biochemistry. – 1985. – V. 149, № 2. – P. 566–571.
15. Schmidchen A., Holst E., Tapper H., Björck L. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth // Microb. Pathog. – 2003. – V. 34, № 1. – P. 47–55.
16. Trombridg G.O., Moon H.D. Purification of human elastase // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1972. – V. 141, № 3. – P. 928–931.
17. Yin L.J., Lin H.H., Jiang S.T. Bioproperties of potent Nattokinase from *Bacillus subtilis* YJ1 // J. Agric. Food Chem. – 2010. – V. 58, № 9. – P. 5737–5742.

Отримано 24.02.2016