

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕАЗ *BACILLUS THURINGIENSIS* IMB B-7324 І *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSENSIS* IMB B-7465

Н.А. Дзюблюк¹, В.О. Чернишенко², О.С. Броварська¹,
Л.Д. Варбанець¹

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

²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9, Київ, 02000, Україна
e-mail: Nidialkova@gmail.com

Метою роботи було охарактеризувати протеази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 та *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465 із колагеназною, еластазною і фібринолітичною активністю, а саме: визначити їх молекулярну масу, якісний і кількісний вміст амінокислот і моносахаридів та порівняти ензими із різних продуцентів за дослідженими параметрами. **Методи.** Гомогенність ензимних препаратів визначали в денатуруючій (SDS-PAGE) і нативній (гель-фільтрація на Sepharose 6B) системах. Визначення амінокислотного складу досліджуваних протеаз здійснювали за допомогою автоматичного амінокислотного аналізатора T339 ("Microtechna", Чехія). Ідентифікацію нейтральних моносахаридів ензимів проводили методом хромато-мас-спектрометрії за методом Albershejn зі співавт. **Результати.** Вперше показано, що протеази 1 і 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 та протеаза *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465 мають різні значення молекулярної маси (близько 25,8, 24,2 і 37,0 кДа відповідно) та подібний амінокислотний склад. Рівень полярних амінокислот протеази 1 *B. thuringiensis* IMB B-7324 в 1,5 рази нижчий, ніж в решті досліджених ензимів. Вперше показано, що дані протеази містять в своєму складі один або два моносахариди. **Висновки.** Отримані результати демонструють відмінності амінокислотного і моносахаридного складу протеаз з колагеназною, еластазною і фібринолітичною активністю в межах виду *B. thuringiensis*, що вносить суттєвий вклад в його характеристику.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, протеази, еластазна, колагеназна, фібринолітична активність, молекулярна маса, амінокислотний і моносахаридний склад.

Відомо [1], що мікроорганізми синтезують різні протеази – з широкою специфічністю, які гідролізують декілька субстратів, або вузькою, які діють виключно на певний субстрат. Серед протеаз мікроорганізмів особливе значення мають ензими, що здатні розщеплювати важкорозчинні протеїни – колаген і еластин, які є складовими колагенових і еластинових волокон сполучної тканини, а також фібрин, що утворює кров'яні згустки судин. Тому протеази з колагеназною, еластолітичною і фібринолітичною активністю можуть бути використані в створенні медичних препаратів для лікування трофічних виразок, гнійних ран, опіків і для розчинення фібринових згустків, а також в інших галузях: м'ясопереробній – в проце-

сах дозрівання м'яса, в складі миючих засобів для видалення нерозчинних білкових забруднень.

Перспективними мікроорганізмами-продуцентами протеаз є представники роду *Bacillus*, перевагами яких є невибагливість більшості видів до поживного середовища, висока технологічність, а також можливість довготривалого зберігання промислових штамів у вигляді висушених спор [2].

У представників *Bacillus thuringiensis* протеази відіграють певну роль в утворенні ентомоцидних токсинів [3, 4], але на сьогодні існує лише декілька робіт [5, 6] щодо їх здатності синтезувати протеази з еластолітичною та фібринолітичною активністю. У зв'язку з цим стає актуальним пошук у представників *B. thuringiensis* протеаз зі специфічністю до колагену, еластину і фібрину, їх виділення, вивчення фізико-хімічних властивостей, амінокислотного і моносахаридного складу.

Раніше в результаті скринінгу мікроорганізмів різних таксономічних груп нами було відібрано штами *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 і *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465, які проявляли широкий спектр активностей щодо нерозчинних білкових субстратів колагену, еластину та фібрину. Після багатостадійного очищення було одержано три протеази. Тому метою даної роботи було охарактеризувати протеази із цих продуцентів, а саме: визначити їх молекулярну масу, якісний і кількісний вміст амінокислот і моносахаридів та порівняти ензими із різних продуцентів за дослідженими параметрами.

Матеріали і методи. Основними об'єктами досліджень були два штами: *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324, отриманий Мацелюх О.В. шляхом хімічного мутагенезу [7], і *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465, виділений з акваторії о. Зміїний (Чорне море) і люб'язно наданий нам співробітниками кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова. Штами зареєстровані в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номером ІМВ В-7324 як продуцент еластолітичної протеази [8] та ІМВ В-7465 як продуцент колагеназної протеази [9].

Культивування та очищення проводили як було описано нами раніше [10-12]. Вміст білка визначали методом Лоурі [13], використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт.

Встановлення молекулярної маси очищених ензимів в нативних умовах проводили гель-фільтрацією на колонці (1,5x25 см) з Sepharose 6B («Pharmacia», Швеція), врівноваженій 0,01 М Трис-НСІ буфером (рН 7,5). На колонку наносили 1 мл розчину ензиму. Елюцію проводили тим же буфером зі швидкістю 0,3 мл/хв. Для розрахунку молекулярної маси будували калібрувальну криву, використовуючи білки-маркери («Pharmacia», Швеція): бичачий сироватковий альбумін (67,0 кДа), протеїназу К (28,9 кДа), трипсин (24,0 кДа), лізоцим (14,5 кДа).

SDS-PAGE в денатуруючих умовах проводили за методом Laemmli [14]. Досліджуваний препарат ензиму розчиняли в буфері для зразків (0,5 М Трис-НСІ з 2-меркаптоетанолом (рН 8,8), який містив 10 % розчину додецилсульфату натрію, 20 % розчину гліцерину та 0,001 % розчину бромфенолового синього), кип'ятили протягом 1 хв, після чого наносили

на гель (50-100 мкг на лунку). Електрофорез проводили у 5%-ому концентруючому та 12%-ому розділяючому акриламідних гелях при постійній силі струму 30 мА. Досліджуваний ензим визначали в гелі після фарбування кумасі G-250. Як білки-маркери використовували («Pharmacia», Швеція): бичачий сироватковий альбумін (67,0 кДа), овальбумін (43,0 кДа), карбоангідразу (30,0 кДа), інгібітор трипсину з сої (20,0 кДа), α -лактальбумін (14,4 кДа).

Для визначення амінокислотного складу препарати ензимів гідролізували в 6 N HCl при 105 °C у вакуумованих ампулах протягом 24 год. Кількісний і якісний склад гідролізатів амінокислот досліджували на автоматичному амінокислотному аналізаторі T339 ("Microtechna", Чехія) [15].

Загальну кількість вуглеводів визначали, використовуючи фенол-сірчаний метод [16]. Для цього в пробірці вносили 0,5 мл досліджуваного розчину ензиму, 0,5 мл 5 % розчину фенолу і 2,5 мл концентрованої сірчаної кислоти, інтенсивно перемішували. Через 30 хв інкубування при кімнатній температурі вимірювали оптичну густина на спектрофотометрі СФ-26 за довжиною хвилі 490 нм. Вміст вуглеводів визначали за стандартною кривою, побудованою за глюкозою.

Для ідентифікації нейтральних моносахаридів препарати гідролізували 2 N HCl протягом 5 год при 100°C, а далі аналізували методом хромато-мас-спектрометрії за методом Albersheim зі співавт. [17].

Усі досліді проводили в 5-8 повторностях. Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням критерію Ст'юдента (t) [18]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні похибки ($M \pm m$). Обробку результатів, що подані графічно, здійснювали з використанням програми Microsoft Excel 2010. Значення при $P < 0,05$ розглядали як достовірні [19].

Результати. Раніше [7-9] шляхом очищення комплексних ензимних препаратів з *B. thuringiensis* IMB В-7324 і *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB В-7465 на нейтральних та заряджених TSK-гелях нами було одержано 3 протеази, які дещо відрізнялись за субстратною специфічністю та оптимальними умовами (рН і температура) дії на вищезгадані протеїнові субстрати. Так, з першого штаму це протеаза 1 – сериновий металактимований ензим зі специфічністю щодо колагену, еластину і фібрину (рН-оптимум дії при 9,0-10,0 та термооптимум 40-50°C), а також протеаза 2 – металопротеаза зі специфічністю щодо колагену і фібрину (рН-оптимум дії при 10,0 та термооптимум 50°C). З другого штаму *B. thuringiensis* виділено ензим, який відноситься до серинових металолазних протеаз зі специфічністю щодо колагену і еластину (рН-оптимум дії при 8,0 та термооптимум 40-50°C).

Оскільки при дослідженнях субстратної специфічності та функціональних груп активного центру необхідно мати гомогенні препарати ферментів, нами був проведений SDS-PAGE, результати якого свідчать про гомогенність ензимів *B. thuringiensis* IMB В-7324 і *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB В-7465 (рис. 1, 2). Для визначення молекулярної маси використовували нативну і денатуруючу системи, зокрема аналітичну ексклюзійну хроматографію на Sepharose 6B, а також

SDS-PAGE. При калібруванні колонки був використаний діапазон білкових зразків з відомими молекулярними масами. Коефіцієнт розподілення (K_{av}) був розрахований як описано в [20]. Показано (рис. 1), що молекулярні маси протеаз 1 і 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 близькі за значеннями і становлять 25,8 і 24,2 кДа відповідно. Як було встановлено раніше [10, 11], вони синтезуються на різних стадіях росту культури та під час виділення зберігають індивідуальну субстратну специфічність. Це дає можливість припустити, що вони є різними ензимами.

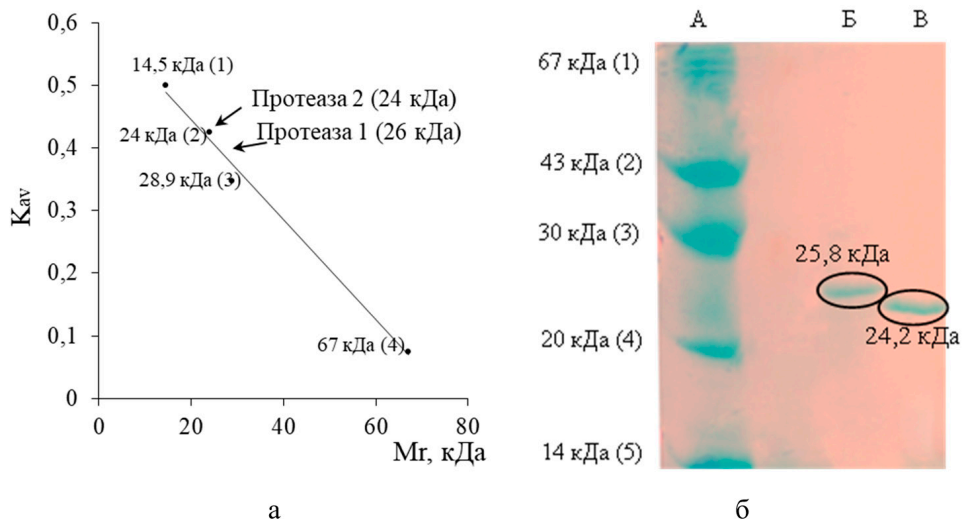


Рис. 1. Визначення молекулярної маси протеаз 1 і 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 в нативних (а) і денатуруючих (SDS-PAGE) (б) умовах:

а – гель-фільтрація на Sepharose 6В (калібрувальний графік); білки-маркери: лізоцим (1), трипсин (2), протейназа К (3), бичачий сироватковий альбумін (4); б – SDS-PAGE: А – білки-маркери: бичачий сироватковий альбумін (1), овальбумін (2), карбоангідраза (3), інгібітор трипсину з сої (4), α -лактальбумін (5); Б – протеаза 1; В – протеаза 2

Аналіз фракцій в нативних і денатуруючих умовах виявив, що молекулярна маса протеази *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465 є більш високою і становить близько 37 кДа (рис. 2).

Дослідження амінокислотного складу протеаз *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 і *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465 свідчить про подібність їх якісного складу, але відмінність у вмісті амінокислот. В складі досліджуваних протеаз переважну більшість складала неполярні амінокислоти – 42, 46 і 36,16 % відповідно в складі протеаз 1 і 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 і ензиму *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465 (рис. 3). З них значну кількість складала (табл. 1) аспарагінова (14,84 і 11,04 %) та глутамінова кислоти (14,19 і 11,33 %) відповідно в складі протеази 1 і 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324, та 18,59 і 8,48 % – протеази *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465. Відмінністю між даними ензимами є також те, що протеаза 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 містить високий рівень (в 2 рази вище, ніж в складі інших двох ензимів) гліцину (19,32 %) і треоніну (17,06 %), а протеаза 1 – низький рівень цистеїну (0,06 %), що в 4 рази менше, ніж в складі решти досліджуваних ензимів.

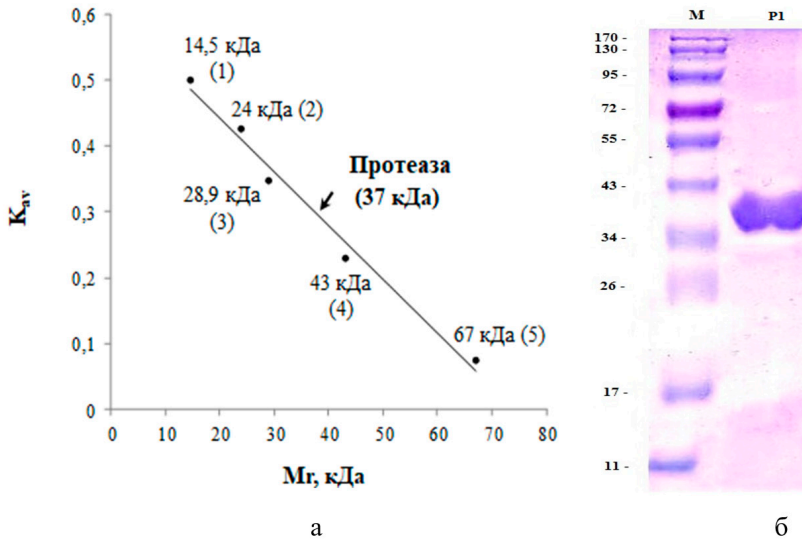


Рис. 2. Визначення молекулярної маси протеази *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465 в нативних (а) і денатуруючих (SDS-PAGE) (б) умовах:
 а – гель-фільтрація на Sepharose 6В (калібрувальний графік); K_{av} – коефіцієнт розподілення; білки-маркери: лізоцим (1), трипсин (2), протеїназа К (3), пероксидаза (4), бичачий сироватковий альбумін (5); б – SDS-PAGE: М – протеїни-маркери; P1 – протеаза *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465

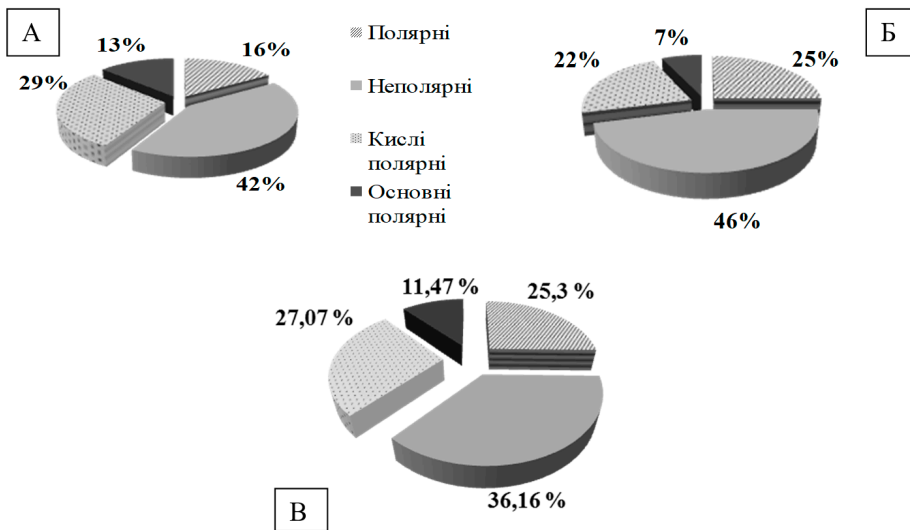


Рис. 3. Амінокислотний склад протеази 1 (А), 2 (Б) *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 і протеази (В) *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465

Характерним для протеази 1 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 було те, що вона містить меншу кількість полярних амінокислот (16 %) (рис. 3, А) в порівнянні з протеазою 2 (25 %) і ензимом *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465 (25,3 %) (рис. 3, Б і В). За вмістом основних амінокислот протеаза 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 містила найменшу кількість їх (7 %) (рис. 3, Б), що майже в 2 рази менше, ніж в складі інших двох досліджуваних ензимів.

Таблиця 1
Амінокислотний склад протеаз *B. thuringiensis* IMB B-7324, *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465, інших представників *Bacillus* та еукаріот (панкреатична еластаза людини, отрута змій, дощовий черв'як)

Амінокислоти	% до сухої маси препарату										
	<i>B. thuringiensis</i> IMB B-7324		3	4	<i>Atropoides carlae</i>	<i>Lumbricus rubellus</i>	<i>Echis multiscquamatis</i>	Панкреатична еластаза	Еластаза <i>Bacillus</i> Ya-B	<i>Vacillus</i> No. AH-101	Субтилізін <i>B. subtilis</i>
	ПІ	ПІІ									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Лізин	7,55	2,51	5,99	4,61	1,44	4,24	1,3	1,67	0,72	2,73	
Гістидин	1,48	1,09	1,12	6,58	2,16	2,66	2,16	3,35	2,88	2,27	
Аргінін	3,76	2,9	4,34	5,92	3,6	4,18	4,76	2,93	5,04	1,36	
Аспарагінова к-та	14,84	11,33	18,59	-	12,95	10,48	9,96	11,72	11,51	9,09	
Треонін	5,71	17,06	8,39	8,55	6,47	6,55	7,79	7,11	6,47	6,36	
Серин	6,6	6,34	7,27	7,89	10,07	7,01	9,52	10,88	10,07	16,82	
Глутамінова к-та	14,19	11,04	8,48	-	6,83	6,63	8,23	5,86	6,47	5,45	
Пролін	6,24	2,41	1,33	3,29	6,12	5,88	3,03	3,35	2,88	4,54	
Гліцин	8,5	19,32	8,56	7,89	12,59	10,6	11,26	15,48	12,95	11,36	
Аланін	6,32	6,3	9,06	7,24	6,83	7,3	7,36	13,81	12,23	12,27	
Цистеїн	0,06	0,24	0,87	3,95	0,36	3,55	3,46	0	0	0	
Валін	4,88	3,39	4,5	9,21	10,07	3,77	11,26	8,79	7,91	9,09	
Метіонін	0,94	1,08	0,45	3,95	1,44	0,69	0,87	1,26	1,44	1,36	
Ізолейцин	3,32	4,8	2,68	7,89	7,55	7,45	4,33	4,18	5,76	5,45	
Лейцин	8,55	6,27	4,48	13,82	2,88	9,25	7,36	4,6	6,47	5,45	
Тирозин	4,27	1,98	9,64	3,29	4,32	5,04	4,33	1,67	4,32	4,09	
Фенілаланін	2,79	1,94	4,23	3,95	2,52	2,84	1,3	2,51	1,44	0,91	
Триптофан	-	-	-	1,97	1,8	-	1,73	0,84	1,44	1,36	

Оскільки відомо [21], що позаклітинні ензими є глікопротеїнами, нами було перевірено наявність моносахаридів у досліджуваних протеазах. За допомогою фенол-сірчаного методу в складі одержаних протеаз виявлено незначний вміст вуглеводів: 1,7 і 1,9 % – в складі протеаз 1 і 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 відповідно та 1,1 % – в складі протеази *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465.

Визначення моносахаридного складу досліджених ензимів свідчить, що вуглеводна частина протеази 1 *B. thuringiensis* IMB B-7324 містить одну сполуку (X), неідентифіковану в рамках даного методу, в той час як протеаза 2 представлена двома моносахаридами: глюкозою (69,19%) і манозою (30,81%). Протеаза *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465 відрізняється за моносахаридним складом від протеаз 1 і 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324, оскільки містить зовсім інші моносахариди, зокрема фукозу (76,04%) і рамнозу (23,9%) (табл. 2).

Таблиця 2

**Моносахаридний склад протеаз *B. thuringiensis* IMB B-7324 і
B. thuringiensis var. *israelensis* IMB B-7465**

Моносахарид	<i>B. thuringiensis</i> IMB B-7324		<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> IMB B-7465
	1	2	
	% до загальної суми площ піків		
Рамноза	-	-	23,9
Глюкоза	-	69,19	-
Маноза	-	30,81	-
Фукоза	-	-	76,09
X	100	-	-

Примітка: X – неідентифікована в рамках даного методу сполука.

Обговорення. Дані щодо здатності представників *B. thuringiensis* продукувати позаклітинні протеази зі специфічністю до еластину, колагену і фібрину на сьогодні є вкрай обмеженими. Тому нові дані щодо їх властивостей представляють як науковий, так і практичний інтерес. За результатами наших досліджень показано, що характерним для протеаз *B. thuringiensis* IMB B-7324 зі специфічністю до еластину, колагену і фібрину є значний вміст неполярних амінокислот. Відомо [22], що зміцнення гідрофобних взаємодій між неполярними амінокислотами всередині білкових молекул підвищує їх стійкість до денатурації SDS. Тим самим можна припустити наявність такого захисного механізму і в молекулах досліджуваних протеаз.

Оскільки в літературі відсутні дані щодо амінокислотного складу протеаз *B. thuringiensis* з еластолітичною і фібринолітичною активністю, отримані результати можна порівняти з аналогічними ензимами інших представників роду *Bacillus* та еукаріот (людини, змії, дощового черв'яка) (табл. 1). На відміну від панкреатичної еластази людини [23], а також еластолітичних ензимів *Bacillus* Ya-B, *Bacillus* No.АН-101 і субтилізіну *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* [24], в складі протеаз *B. thuringiensis* IMB B-7324 і *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465 кількість заряджених амінокислот: лізину, аспарагінової та глутамінової кислот, була вищою в 1,5-3,0 рази. З літератури відомо [25], що глутамінова та аспарагінова

кислоти зазвичай розташовані на зовнішній поверхні молекули білка і можуть стабілізувати молекулу ензиму. Кількість серину, аланіну і валіну навпаки була нижчою приблизно в 2 рази. Порівняно з фібринолітичними ензимами отрути змій *Atropoides carlae* і *Echis multisquamatis*, а також дощового черв'яка *Lumbricus rubellus* [1, 26] в складі протеаз досліджених нами штамів *B. thuringiensis* кількість таких амінокислот, як валін, лейцин та ізолейцин майже в 2 рази була нижчою. Кількість цистеїну в складі фібринолітичних ензимів отрути змій була вищою в 3 рази і більше.

Глікозилювання білків є посттрансляційною їх модифікацією і характерне майже для 50% всіх білків, зокрема, трансмембранних білків еукаріот, архей і, у меншій мірі, прокаріот [27]. В останні роки з'являється все більше доказів того, що глікани мають суттєвий вплив на активність багатьох ферментів, зокрема, як регулюючі модулі для зв'язування субстрату, стійкість до дії високих температур та інших чинників агресивного середовища, захист від деградації протеолітичними ензимами під час синтезу білка [28]. На сьогоднішній день не було повідомлень щодо глікозилювання протеаз *B. thuringiensis* з колагеназною, еластазною і фібринолітичною активностями. За результатами визначення моносахаридного складу досліджуваних ензимів виявлено вміст рамнози, глюкози, манози і фукози. З літератури відомо [21], що до складу більшості фібринолітичних ензимів еукаріот входять такі моносахариди, як фукоза і маноза. Так, олігосахариди восьми фібринолітичних протеаз, виділених з дощового черв'яка *Eisenia fetida*, складаються з залишків манози. Тканинний плазмінотен (tPA) людини містить значну кількість манози та меншу кількість фукози, які можуть модулювати його функціональну активність та зв'язувати з поверхневими рецепторами клітин [29]. Аналіз компонентного складу вуглеводних фракцій панкреатичної еластази людини показав, що вона містить, крім фукози і манози, також і галактозу [30].

Отже, вперше показана відмінність протеаз *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 і *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465 за молекулярною масою та компонентним складом (вміст амінокислот і моносахаридів). Для протеаз 1 і 2 першого штаму молекулярна маса становить близько 25,8 і 24,2 кДа, а протеази другого – близько 37,0 кДа. За амінокислотним складом ензими майже не відрізняються, але в складі протеази 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 рівень основних полярних амінокислот нижчий в 0,8-1,86 разів, а протеази 1 – в 1,5 рази, ніж в протеазі *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465 за рахунок низького вмісту цистеїну (лише 0,06 %, що в 14,5-21,8 разів менше в порівнянні як з іншими відомими, так і дослідженими нами протеазами). Крім того, в складі протеаз виявлено такі моносахариди, як рамноза, глюкоза, маноза і фукоза. Таким чином, отримані результати демонструють відмінності амінокислотного і моносахаридного складу протеаз з колагеназною, еластазною і фібринолітичною активністю в межах виду *B. thuringiensis*, що вносить суттєвий вклад в його характеристику.

Автори висловлюють щире подяку завідувачу лабораторії біологічних полімерних сполук ІМВ НАН України к.б.н. М.А. Хархоті за допомогу в проведенні моносахаридного аналізу протеаз та к.б.н. М.П. Мясниковій (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України) – у проведенні амінокислотного аналізу

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕАЗ
BACILLUS THURINGIENSIS ИМВ В-7324 И
BACILLUS THURINGIENSIS VAR. ISRAELENSIS ИМВ В-7465**

**Н.А. Дзюблюк¹, В.А. Чернышенко², О.С. Броварская¹,
Л.Д. Варбанец¹**

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

²Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины,
ул. Леонтовича, 9, Киев, 02000, Украина
e-mail: Nidialkova@gmail.com

Резюме

Целью работы было охарактеризовать протеазы из *Bacillus thuringiensis* ИМВ В-7324 и *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 с коллагеназной, эластазной и фибринолитической активностью, а именно: определить их молекулярную массу, качественное и количественное содержание аминокислот и моносахаридов и сравнить энзимы из различных продуцентов по исследуемым параметрам. **Методы.** Гомогенность ферментных препаратов определяли в денатурирующей (SDS-PAGE) и нативной (гель-фильтрация на Sepharose 6B) системах. Определение аминокислотного состава исследуемых протеаз осуществляли с помощью автоматического аминокислотного анализатора Т339 («Microtechna», Чехия). Идентификацию нейтральных моносахаридов ферментов проводили методом хромато-масс-спектрометрии по методу Albershein с соавт. **Результаты.** Впервые показано, что протеазы 1 и 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 и протеаза *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 имеют разные значения молекулярной массы (приблизительно 25,8, 24,2 и 37,0 кДа соответственно) и подобный аминокислотный состав молекул. Уровень полярных аминокислот протеазы 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 в 1,5 раза ниже, чем у остальных исследованных ферментов. Впервые показано, что данные протеазы содержат в своем составе один или два моносахарида. **Выводы.** Полученные результаты демонстрируют различия аминокислотного и моносахаридного состава протеаз с коллагеназной, эластазной и фибринолитической активностью в пределах вида *B. thuringiensis*, что вносит существенный вклад в его характеристику.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, протеазы, эластазная, коллагеназная, фибринолитическая активность, молекулярная масса, аминокислотный и моносахаридный состав.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PROTEASES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IMV B-7324 AND *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* IMV B-7465

N.A. Dziubliuk¹, V.O. Chernyshenko², O.S. Brovarskaya¹,
L.D. Varbanets¹

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

² Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine,
9 Leontovycha Str., Kyiv, 01601, Ukraine

Summary

The aim of this study was to characterize *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 and *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 proteases with collagenase, elastase and fibrinolytic activities namely to measure their molecular weight, qualitative and quantitative amino acid and monosaccharide composition and compare these enzymes of the studied parameters. **Methods.** Homogeneity of the enzyme preparations was determined in denaturing (SDS-PAGE) and native (gel-filtration on Sepharose 6B) systems. The amino acid composition assay of the studied proteases was carried out using an automatic amino acid analyzer T339 ("Microtechna", Czech Republic). Identification of neutral monosaccharides of the preparations was carried out by the method of chromatographic mass spectrometry by Albershein et al. **Results.** For the first time has been shown that protease 1 and 2 of *B. thuringiensis* IMV B-7324 and *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 protease have different values of molecular weight (about 25.8, 24.2 and 37.0 kDa respectively) and similar amino acid composition of molecules. The level of polar amino acids in protease 1 of *B. thuringiensis* IMV B-7324 is 1.5 times lower than in the rest of the tested enzymes. It has been shown for the first time that these proteases contain in their composition one or two monosaccharides. **Conclusions.** The obtained results demonstrate differences in the amino acid and monosaccharide composition of the proteases with collagenase, elastase and fibrinolytic activity within the *B. thuringiensis* species, which makes a significant contribution to its characterization.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, proteases, elastolytic, collagenolytic, fibrinolytic activity, molecular weight, amino acid and monosaccharide composition.

1. Rawlings ND, Salvesen GS. Handbook of Proteolytic Enzymes. 3rd ed. London: Academic Press, Elsevier; 2013. P. 1062-1064.
2. Contesini FJ, Melo RR, Sato HH. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. Crit Rev Biotechnol. 2018; 38(3):321-334.
3. Elleuch J, Zghal RZ, Lacoix MN, Chandre F, Tounsi S, Jaoua S. Evidence of two mechanisms involved in *Bacillus thuringiensis israelensis* decreased toxicity against mosquito larvae: Genome dynamic and toxins stability. Microbiological Research. 2015; 176(July):48-54.
4. Ennouri K, Ayed RB, Triki MA, Ottaviani E, Mazzarello M, Hertelli F, Zouari N. Multiple linear regression and artificial neural networks for deltaendotoxin and protease yields modelling of *Bacillus thuringiensis*. Biotech. 2017; 7(3):187-199.
5. Egorov NS, Yudina TG, Loria JK, Kreyer VG. [About fibrinolytic activity of some variants of *Bacillus thuringiensis*]. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 1979; 15(3):416-420. Russian.

6. Tenorio-Sánchez SA, Rojas-Avelizapa NG, Ibarra JE, Avelizapa LIR, Cruz-Camarillo R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated from a highly polychlorinated biphenyls contaminated soil. *Tecnóloga*. 2010; 3(3):52-63.
7. Matselyukh OV. [Obtaining of mutants of *Bacillus* sp. with enhanced elastase production]. *Biotekhnolohiya*. 2010; 3(2):42-47. Ukrainian.
8. Matselyukh OV, Varbanets LD, Ivanitsa VO. Strain *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 – producer of the extracellular elastase. Patent 97906UA. Publ. 26.03.2012, Bul. № 6. Ukrainian.
9. Nidialkova NA, Varbanets LD, Ivanitsa VO. Bacterial strain of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*– producer of the extracellular collagenase». Patent 96195UA. Publ. 26.01.2015, Bul. № 2. Ukrainian.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265-275.
11. Laemmli UK Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-685.
12. Varbanets LD, Borzova NV. [Glycosidases of microorganisms and methods of its analysis]. K.: Naukova Dumka; 2010. 438 p. Ukrainian.
13. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*. 1956; 28(3):350-356.
14. Albershein P, Nevis DJ, English PD, Karr A. A method for analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gasliquid chromatography. *Carboh. Res*. 1976; 5(3):340-345.
15. Lakin GF. [Biometriya]. M.: Vysshaya shkola; 1990. 352 p. Russian.
16. Lapatch SN, Tchubenko AV, Babitch PH. [Statistical methods in biomedical research using “Excel”]. K.: Morion; 2001. 408 p. Russian.
17. Nidialkova NA, Matselyukh OV, Varbanets LD. [Isolation of *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 fibrinolytic peptidase]. *Mikrobiol Z*. 2012; 74(5):9-15. Ukrainian.
18. Matselyukh OV, Nidialkova NA, Varbanets LD. [Purification and physicochemical properties of *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 peptidase with elastolytic and fibrinolytic activity]. *Ukr Biokhim Z*. 2012; 84(6):25-36. Ukrainian.
19. Nidialkova NA, Varbanets LD, Chernyshenko VO. Isolation and purification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 peptidase with specificity toward elastin and collagen. *Ukr Biochem J*. 2016; 88(3):18-28.
20. Walls D, Loughran ST. Protein Chromatography: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press: Springer; 2007; 681. 426 p.
21. Yong-Gang Z, Hua LI, William XU, Jia L, Rui-An XU. An Overview of the Fibrinolytic Enzyme from Earthworm. *Chin J Nat Med*. 2010; 8(4):301-308.
22. Hammami A, Fakhfakh N, Abdelhedi O, Nasri M, Bayouhd A. Proteolytic and amyolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: Characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *Int J Biol Macromol*. 2018; 108:56-68.
23. SinhaS, WatorekW, Karr S, Giles J, Bode W, Travis J. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(8):2228-2232.
24. Takami H, AkibaT, Horikoshi K. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1990; 33(5):519-523.

25. McKee T, McKee J. Biochemistry. The Molecular Basis of Life Updated Fifth Edition. New York: Oxford University Press; 2012. 864 p.
26. Nakajima N, Mihara H, Sumi H. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. Biosci Biotechnol Biochem. 1993; 57(10):1726-1730.
27. Goettig P. Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. Int J Mol Sci. 2016; 17(12):1969.
28. Russell D, Oldham NJ, Davis BG. Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. Carbohydr. Res. 2009; 344(12):1508–1514.
29. Cesarman-Maus G, Hajjar KA Molecular mechanisms of fibrinolysis. British Journal of Haematology. 2005; 129(3):307–321.
30. Wendorf P, Geyer R, Sziegoleit A, Linder D. Localization and characterization of the glycosylation site of human pancreatic elastase 1. FEBS Letters. 1989; 249(2):275-278.

Отримано 13.06.2018