

ПОИСК МИКРОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ ШИРОКОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

С.А. Кулиш, Л.И. Сапунова, А.Г. Лобанок

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Протеиназы представляют собой большую и разнообразную группу ферментов гидролитического способа действия, которые классифицируются по месту их воздействия на субстрат, структуре активного сайта фермента и механизмам реакции [1]. Протеолитические ферменты на биохимическом и/или физиологическом уровне принимают участие в функционировании отдельных клеток и целых организмов: они регулируют основные функции дифференциации клеток, их подвижность, деление и гибель. Участвуют во внутриклеточных процессах деградации белков, в которых задействованы лизосомы и протеасомная система [2, 3]. Протеолиз является основой ковалентной активации, регуляции и ингибирования ферментов и других белковых или связанных эффекторов, участвующих, например, в биохимическом каскаде, ведущем к свертыванию крови и выработке инсулина. Протеиназы удаляют сигнальные последовательности пептидов после их транспорта/секреции через мембраны, элиминируют N-концевые остатки метионина после трансляции.

Ежегодный мировой рынок ферментных препаратов оценивается 2,5–3 млрд долларов, из которых на долю протеиназы приходится около 60 % или 1,5–1,8 млрд долларов, включая щелочную

протеиназу для детергентов объемом 1 млрд долларов. Лидирующие позиции на рынке коммерческих ферментных препаратов принадлежат компаниям Novozymes [<http://www.novozymes.com/en>], Genencor International [<http://www.genencor.com>] и DSM [http://DSM.com/en_US/dnp/anh_enzymes.htm] с долей, составляющей 41–44, 21 и 8 %, соответственно.

Протеолитические ферменты животных, растений и, особенно, микроорганизмов представляют собой крупнейший и наиболее важный сегмент рынка коммерческих ферментов, которые находят применение в пищевой, комбикормовой, кожевенной, фармацевтической, химической, промышленности, в растениеводстве [4–11].

Сегодня одним из приоритетных направлений использования протеолитических ферментов является медицина, где протеазы фибрино- и фибринолитического действия находят применение в качестве антикоагулянтов, тромболитиков, фибринолитиков и других лекарственных средств, влияющих на гемостаз [12–16].

Целью настоящей работы явился скрининг микробных протеиназ, отличающихся широкой субстратной специфичностью.

В работе использовали 60 бактериальных и грибных культур, представленных различными видами родов *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Paenibacillus*, *Aspergillus* из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и выделенных из природных источников.

Микроорганизмы выращивали на агаризованной среде, содержащей (в %): K_2HPO_4 – 0,05; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,025; пептон ферментативный – 0,5; агар-агар – 1,5; один из специфических субстратов протеиназ – казеин, желатин, казеинат натрия, глобин, гемоглобин, сухое обезжиренное молоко – 1,0 или фибриноген – 0,5. Величину активной кислотности агаризованной среды устанавливали соответствующей рН 6,5–6,8. Длительность выращивания грибов составляла 6 сут при 24–26 °С, бактерий – 3 сут при 28–30 °С.

По окончании культивирования содержимое чашек обрабатывали окрашивающей смесью, состоящей из бриллиантового голубого G-250 (0,08 %) и хлорной кислоты (3,5 %). Протеолитическую активность микроорганизмов оценивали по их энзиматическому индексу – отношению диаметра зоны просветления специфического субстрата к диаметру колонии [17, 18].

Результаты исследований представлены средним арифметическим значением опытов, выполненных в трехкратной повторности.

Изучение способности исследуемых микробных культур гидролизовать глобулярные белки позволило выявить 27 культур, проявляющих казеинолитическую активность. Из них высоким уровнем деполимеризации казеина характеризовались 11 культур, представленных грибами рода *Aspergillus* (2), бактериями родов *Bacillus* (8) и *Paenibacillus* (1).

Результаты исследования субстратной специфичности протеиназ микробных культур с максимальным казеинолитическим индексом, составляющим 1,4–5,0, приведены в таблице.

Таблица – Протеолитическая активность микроорганизмов на агаризованных средах с различными белковыми субстратами

Микроорганизм	Энзиматический индекс						
	фибриноген	казеин	казеинат натрия	желатин	глобин	гемоглобин	молоко
<i>Bacillus</i> sp. 1182	3,0	4,7	3,1	3,8	1,1	10,0	3,1
<i>Bacillus</i> sp. 112	5,0	4,4	5,0	4,0	3,8	7,5	5,5
<i>Bacillus</i> sp. 199	5,0	4,2	2,4	6,0	1,1	8,5	3,9
<i>Bacillus</i> sp. 1114 D	1,2	3,6	5,0	4,0	2,1	6,3	7,5
<i>Bacillus</i> sp. 1211	1,1	5,0	3,2	2,0	1,1	3,0	3,4
<i>Bacillus</i> sp. 1138	1,7	3,8	3,0	1,8	1,3	1,6	3,2
<i>Paenibacillus</i> sp. 1369	2,2	2,0	2,0	2,5	1,8	1,4	2,2
<i>Aspergillus</i> sp. 1764	0	1,4	0	0	0	0	1,1
<i>Aspergillus</i> sp. 1	2,0	1,8	1,2	1,7	1,4	4,0	1,2

Как видно, у 8 из 9 исследованных штаммов обнаружена также способность гидролизовать фибриноген (индекс 1,1–5,0), казеинат натрия (1,2–5,0), желатин (1,7–6,0), глобин (1,1–3,8), гемоглобин (1,4–10,0), казеин молока (1,1–7,5). При этом наибольшим энзиматическим индексом (5,0)

по отношению к фибриногену характеризуются 2 изолята бактерий, предварительно отнесенных к роду *Bacillus*. Среди грибов фибринолитическая активность обнаружена только у штамма *Aspergillus* sp. 1.

Среди протеиназ, специфичных к фибриллярным белкам, наиболее известными являются стрептокиназа *Streptococcus hemolyticus* и стафилокиназа *Staphylococcus aureus*, а также фибринолитические ферменты бактерий рода *Bacillus*, субтилизины различных штаммов *B. subtilis*, наттокиназа *B. natto*, субтилизин DFE и субтилизин DJ-4 *B. amyloliquefaciens*. Протеиназы указанного действия синтезируют также бактерии рода *Streptomyces* (*S. megasporus* SD5, *S. spheroids* M8-2, *Streptomyces* sp. Y405), грибы *Aspergillus ochraceus* 513 [19], *A. terreus* 2, *A. flavipes* A17, *A. fumigatus* D1, *A. sydowii* 1 [20], *Fusarium oxysporum* [21], *Penicillium chrysogenum* H9 [22], *Rhizopus chinensis* 12 [23], *Cochliobolus lunatus*, *Pleurotus ostreatus* и другие. Хотя фибринолитические ферменты обнаружены у микроорганизмов различных таксономических групп, для их промышленного производства используются преимущественно штаммы бактерий рода *Bacillus*, выделенные из традиционных ферментированных продуктов питания. Поэтому поиск и изучение фибринолитических ферментов, продуцируемых другими группами микроорганизмов, все еще продолжается. Особое внимание при этом уделяется исследованию субстратной специфичности ферментов и их тромболитических эффектов *in vivo*, а также совершенствованию тромболитических средств в части повышения их эффективности и специфичности к фибрину.

Таким образом, среди 60 исследованных микробных культур нами отобраны штаммы *Bacillus* sp. 112 и *Aspergillus* sp. 1 в качестве модельных объектов для изучения продукции, локализации и свойств протеиназ фибрино- и фибринолитического действия.

Список использованных источников

1. A systematic reconsideration on proteases / P. Gurumallesh [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 128. – P. 254–267, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081.
2. Ward, O.P. In Comprehensive Biotechnology / O.P. Ward // Univ. Waterloo, Canada; Industrial Biotechnol. Commod. Product. Proteases. – 2011. – Vol. 3, № 2. – P. 571–582. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1.
3. Сорокин, А.В. Протеасомная система деградации и процессинга белков / А.В. Сорокин, Е.Р. Ким, Л.П. Овчинников // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 3–76.
4. Harrison, R.L. Proteases as insecticidal agents / R.L. Harrison, B.C. Bonning // Toxins (Basel). – 2010. – Vol. 2, № 5. – P. 935–953, doi: 10.3390/toxins2050935.
5. Niyonzima, F.N. Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. / F.N. Niyonzima, S. More // Prep. Biochem. Biotechnol. – 2015. – Vol. 45, № 3. – P. 233–258, doi: 10.1080/10826068.2014.907183.
6. Banerjee, G. Impact of microbial proteases on biotechnological industries / G. Banerjee, A.K. Ray // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. – 2017. – Vol. 33, № 2. – P. 119–143, doi: 10.1080/02648725.2017.1408256.
7. Dos Santos Aguilar, J.G. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. / J.G. Dos Santos Aguilar, H.H. Sato // Food Res. Int. – 2018. – Vol. 103. – P. 253–262, doi: 10.1016/j.foodres.2017.10.044.
8. Bond, J.S. Proteases: History, discovery, and roles in health and disease / J.S. Bond // J. Biol. Chem. – 2019. – Vol. 294, № 5. – P. 1643–1651, doi:10.1074/jbc.TM118.004156.
9. Kumar, S.S. Fibrinolytic enzymes for thrombolytic therapy / S.S. Kumar, A. Sabu // Adv. Exp. Med. Biol. – 2019. – Vol. 1148. – P. 345–381, doi: 10.1007/978-981-13-7709-9_15.
10. Barzkar, N. Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications / N. Barzkar // Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 161. – P. 1216–1229, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072.
11. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors. A review. / M. A. Hassan [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 1, № 154. – P. 567–583, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.116.
12. Peng, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo* / Y. Peng, X. Yang, Y. Zhang // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 69, № 2. – P. 126–132, doi: 10.1007/s00253-005-0159-7.
13. Тромболитическая и фибринолитическая активность бактериальных протеаз / Ю.В. Данилова [и др.] // Клет. Трансплантол. Ткан. Инженер. – 2012. – Т. 7, № 3. – С. 49–51.

14. Kotb, E. Fibrinolytic bacterial enzymes with thrombolytic activity / E. Kotb // Springer Briefs Microbiol, 2012. – P. 1–74, doi: 10.1007/978-3-642-24980-8_1.

15. Fibrinolytic Actinokinase – A Short Review / D. Dhamodharan [et al.] // Cardiovasc. Hematol. Agents. Med. Chem. – 2015. – Vol. 13, № 2. – P. 78–81, doi: 10.2174/1871525713666150911113128.

16. Cai, D. Microbial production of nattokinase: current progress, challenge and prospect / D. Cai, C. Zhu, S. Chen // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 33, № 5. – P. 84. doi: 10.1007/s11274-017-2253-2.

17. Фибринолитическая и коллагенолитическая активность внеклеточных протеиназ штаммов микромицетов *Aspergillus ochraceus* L-1 и *Aspergillus ustus* 1 / А.А. Осмаловский [и др.] // Весн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. – 2016. – № 1. – С. 71–75.

18. Секреция микромицетами внеклеточных протеиназ, активных по отношению к фибриллярным белкам / Е.А. Попова [и др.] // Весн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. – 2017. – Т. 72, № 4. – С. 241–245.

19. Batomunkueva, B.P. Isolation, purification, and resolution of the extracellular proteinase complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities / B.P. Batomunkueva, N.S. Egorov // Mikrobiologiya. – 2001. – Vol. 70, № 5. – P. 602–606, doi: 10.1023/A:1012343718772.20.

20. Combined microbiological approach to screening of producers of proteases with hemostasis system proteins activity among micromycetes / A.A. Osmolovskiy [et al.] // Biotechnol. Reports. – 2018. – Vol. 19. – P. 1–3, doi: 10.1016/j.btre.2018.e00265.

21. New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum* / S. Tao [et al.] // Proc. Biochem. – 1998. – Vol. 33, № 4. – P. 419–422, doi: 10.1016/S0032-9592(97)00096-4.

22. EI-Aassar, S.A. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 / S.A. EI-Aassar // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1990. – Vol. 33 – P. 26–30, doi: 10.1007/BF00170564.

23. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium* sp. CPCC 480097 / B. Wu [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 36. – P. 451–459, doi: 10.1007/s10295-008-0516-5.