

**СВОЙСТВА ПРОТЕИНАЗЫ БАКТЕРИЙ
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS SSP. *PLANTARUM* 1182**

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

ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, kulish76@mail.ru

Сердечнососудистые заболевания, особенно гипертония, ишемическая болезнь сердца, аритмия, инфаркт миокарда, инсульт, являются причиной ежегодной смерти 17,5 миллионов человек с прогнозируемым увеличением до 24 миллионов к 2030 году [1, 2]. Первопричиной названных патологий является формирование на стенках кровеносных сосудов сгустков крови (фибрина), приводящих к тромбозам. Профилактика и терапия тромбозов основана на использовании современных тромболитических средств. Однако их высокая стоимость и ряд побочных эффектов делают актуальными исследования по выявлению новых протеиназ микробного происхождения с высоким уровнем тромболитической активности [3].

Согласно данным литературы, перспективными продуцентами ферментов фибринолитического действия являются грибы, принадлежащие родам *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Cunninghamella*, *Absidia* и др., среди бактерий – различные виды бактерий родов *Streptomyces*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, а также представители цианобактерий (*Cyanobacteria*) и ряда других микроорганизмов [4, 5]. Сравнительный анализ показывает, что сериновая протеиназа фибринолитического действия, синтезируемая штаммом *Bacillus* sp. СК, в два раза активнее субтилизина BPN' [6] и в пять раз эффективнее субтилизина Карлсберг, который, в свою очередь, в 6 раз уступает по активности субтилизинподобной протеиназе DC-33, полученной из *B. subtilis* [7]. В то же время сопоставимыми являются фибринолитические и тромболитические свойства протеаз бактерий *B. intermedius* и *B. amyloliquefaciens* и мицелиальных грибов родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Pleurotus* и др. [4].

Ранее нами среди 20 микробных культур, выделенных из растительных остатков, семян зернобобовых культур и мясных продуктов, был отобран изолят ПП 8 как наиболее активно синтезирующий специфичную к фибриногену протеиназу. Методом MALDI масс-спектрометрического анализа изолят был идентифицирован как *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* 1182, определены условия его глубинного культивирования, обеспечивающие высокий уровень синтеза ферментного белка [8].

Цель настоящей работы – оценка субстратной специфичности и свойств внеклеточной протеиназы, синтезируемой новым штаммом *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* 1182.

Для получения препарата внеклеточной протеиназы штамм бактерий *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* 1182 выращивали в среде оптимизированного ранее состава при 28–30 °С в течение 48 ч [8]. По окончании культивирования культуральную жидкость центрифугировали (8 000 g, 15 мин) при комнатной температуре. Бесклеточный фильтрат концентрировали методом ультрафильтрации через мембрану из сополимеров акрилонитрила марки ПАН-20 в следующих условиях: площадь поверхности мембраны – 0,4 м², давление – 0,1 МПа, температура – (22±3) °С, перемешивание 600–700 об/мин.

Определение протеолитической активности выполняли спектрофотометрическим методом согласно ГОСТ 20264-2.88 [9]. За единицу протеолитической активности принята способность фермента превращать за 1 мин при 30 °С и рН 7,0 казеинат натрия в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние в количестве, соответствующем 1 мкмолью тирозина. Активность фермента выражали в относительных процентах (%).

Определение величины рН проводили потенциометрически.

Для оценки специфичности действия фермента в качестве субстратов использовали казеинат натрия, казеин, фибриноген, гемоглобин, глобин и желатин в конечной концентрации 1 %.

При изучении зависимости активности протеиназы от ионов кальция (Ca²⁺), железа (Fe²⁺), цинка (Zn²⁺), магния (Mg²⁺), калия (K⁺), меди (Cu²⁺) и кобальта (Co²⁺) использовали сернокислые и хлористые соли металлов, растворенные в 150 мМ трис-НСl буфере (рН 7,5). В качестве специфических ингибиторов протеиназы использовали PMSF (фторид метилфенилсульфонил), ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), йодуксусную кислоту (C₂H₂INaO₂) и SDS (додecil сульфат натрия), растворенные в 0,1 М универсальном буфере, рН 7,5.

Ингибиторы и соли металлов добавляли к раствору фермента в конечной концентрации 5 мМ, и смесь инкубировали при температуре 37°С в течение 60 мин [10].

Представленные результаты являются усредненными данными 1–2 опытов, выполненных в 3 повторностях.

При исследовании физико-химических свойств установлено, что максимальная активность протеиназы фибринолитического действия *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* 1182 проявляется при температуре 55° С и рН 7,5. Предпочтительными субстратами для действия фермента являются казеин (100 %) и казеинат натрия (86 %), в меньшей степени – фибриноген (30 %), а минимальное сродство фермент проявляет к глобину (6 %) и желатину (5 %). Максимальный показатель активности фермента отмечен при концентрации субстрата в реакционной смеси, составляющей 1 %.

Изучение влияния специфических ингибиторов на активность протеазы *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* 1182 показало, что ЭДТА, йодуксусная кислота и PMSF подавляют активность фермента соответственно на 79, 66 и 42 % (таблица 1).

Таблица 1. – Влияние специфических ингибиторов на активность протеиназы *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* 1182

Специфический ингибитор, 5 мМ	Относительная активность протеиназы, %
Контроль	100
ЭДТА	21
Йодуксусная кислота	34
PMSF	58
SDS	111

На активность протеолитического фермента штамма *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* 1182 различное влияние оказывают также катионы металлов. Так, в максимальной степени протеиназу

активируют ионы Ca^{2+} , тогда как ионы Co^{2+} и Cu^{2+} оказывают различное по выраженности отрицательное влияние на активность фермента (таблица 2).

Таблица 2. – Влияние ионов металлов на активность протеиназы *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* 1182

Катионы металлов, 5 мМ	Относительная активность протеиназы, %
Контроль	100
Ca^{2+}	114
Fe^{2+}	101
Zn^{2+}	105
Mg^{2+}	102
K^{+}	107
Cu^{2+}	27
Co^{2+}	83

Согласно данным литературы, фенилметансульфонилфторид, ингибитор трипсина из соевых бобов, додецилсульфат натрия являются специфическими ингибиторами сериновых протеиназ, тогда как этилендиаминтетрауксусная кислота подавляет активность металлопротеаз. Например, ингибирующий эффект PMSF, оказываемый на активность протеиназы штамма *B. amyloliquefaciens* UFPEDA 485, составляет 92 % [11]. Сериновыми протеиназами являются Наттокиназа *B. natto*, *B. subtilis* IMR-NK1, *B. subtilis* DC33, Субтилизин DFE и Субтилизин DJ-4 *Bacillus amyloliquefaciens*. К металлопротеазам бациллярного происхождения относятся Бациллокиназа II (BKII), фермент Jeot-gal и др. [4].

Известно, что катионы металлов оказывают различное влияние на активность как сериновых, так и металлопротеаз, синтезируемых бактериями рода *Bacillus*. Например, активность сериновых протеиназ усиливают, как правило, ионы Ca^{2+} , Co^{2+} и Mg^{2+} , а металлопротеиназ фибринолитического действия – двухвалентные катионы Zn^{2+} , Co^{2+} и Hg^{2+} . Однако, сообщается, что ингибиторами бациллярных протеиназ могут быть и PMSF и ЭДТА, а ионы Ca^{2+} , Zn^{2+} и Cu^{2+} могут как активировать, так и ингибировать активность ферментного белка. Такие ферменты относят к металлосериновым протеазам [11, 12, 13, 14].

Таким образом, на основании экспериментальных данных о субстратной специфичности, влиянии катионов металлов и специфических ингибиторов на активность протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* 1182 можно заключить, что исследуемый фермент является металлосериновой протеиназой, обладающей фибринолитическим действием. Дальнейшие исследования будут направлены на определение *in vitro* фибрино- и фибринолитической активности протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* 1182.

Список использованных источников

1. Kotb, E. Fibrinolytic bacterial enzymes with thrombolytic activity / E. Kotb // – Springer Briefs in Microbiology. – 2012. – P. 1–74.
2. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from Marine *Bacillus velezensis* Z01 and Assessment of Its Therapeutic Efficacy *In Vivo* / Y. Zhou [et al.] // Microorg. – 2022. – Vol. 10. – P. 1–17.
3. Современные проблемы тромбозов артерий и вен / И. Н. Бокарев, Л. В. Попова // Практическая медицина. – 2014. – № 6 (82). – С. 13–17.
4. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo* / Y. Peng [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 69, № 2. – P. 126–132.
5. Purification and Characterization of Nattokinase from *Bacillus subtilis* Natto B-12 / C. Wang [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2009. – Vol. 57. – P. 9722–9729.
6. Purification and Characterization of a Thrombolytic Enzyme Produced by a New Strain of *Bacillus subtilis* / J. Frias [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2021. – 31, № 2. – P. 327–337.
7. Балабан, Н. П. Практическое применение бациллярных протеаз / Н. П. Балабан, М. Р. Шарипова // Ученые записки Казанского университета. Сер. Естеств. Науки. – 2011. – Т. 152, кн. 2. – С. 29–38.

8. Выделение и характеристика нового штамма бактерий – продуцента протеиназы фибринолитического действия / Л. И. Сапунова [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : Сборник научных трудов. – Минск: Беларуская навука, 2022. – Т. 14. – С. 161–177.

9. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности: ГОСТ 20264.2-88. – Взамен ГОСТ 20264.2-74 ; введ. 01.07.90. – М. : Гос. Ком. СССР по стандартам, 1989. – 15 с.

10. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation / T. Nascimento [et al.] // Adv. Enzyme. Res. – 2015. – Vol. 3. – P. 81–91.

11. Optimization of production, biochemical characterization and *in vitro* evaluation of the therapeutic potential of fibrinolytic enzymes from a new *Bacillus amyloliquefaciens* / F. A. S. D. De Souza [et al.] // Macromol. Res. – 2016. – Vol. 24, № 7. – P. 587–595.

12. Nguyen, T. T. Cloning and enhancing production of a detergent-and organic-solvent-resistant nattokinase from *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient *Bacillus subtilis* WB800 / T. T. Nguyen, T. D. Quyen, H. T. Le // Microb. Cell Fact. – 2013. – Vol. 12, 79 : DOI: 10.1186/1475-2859-12-79.

13. Keziah, S. M. Fibrinolytic and ACE Inhibitory Activity of Nattokinase Extracted from *Bacillus subtilis* VITMS 2: A Strain Isolated from Fermented Milk of *Vigna unguiculata* / S. M. Keziah // Protein J. – 2021. – Vol. 40. – P. 876–890.

14. Mahajan, P. M. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization / P. M Mahajan, S. Nayak, S. S. Lele // J. Biosci. Bioeng. – 2012. – Vol. 113. – P. 307–314.