

# ОПТИМІЗАЦІЯ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ СИНТЕЗУ ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ ПЕПТИДАЗИ *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324

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

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Отримано 18.08.2011

Досліджено умови культивування *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 для біосинтезу пептидази з фібринолітичною активністю. Встановлено, що максимальний синтез ензиму (4,17 од/мг протеїну) відбувається у стаціонарній фазі росту штаму в умовах глибинного культивування. Показано, що для біосинтезу пептидази значущими є всі компоненти базового середовища, крім желатину, вилучення якого призводить до підвищення активності в 4 рази (21 од/мг). Вивчено вплив різних джерел азоту і вуглецю на синтез ензиму. Виявлено, що оптимальними джерелами є сульфат амонію і мальтоза, використання яких дає змогу збільшити вихідну активність у 12 разів (50 од/мг протеїну). За допомогою двофакторного експерименту на чотирьох рівнях було визначено оптимальні концентрації мальтози і сульфату амонію в середовищі, за яких вдалося підвищити фібринолітичну активність у 25 разів (105 од/мг протеїну). Оптимізоване середовище містило (г/л): мальтозу — 19,0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 12,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1,6,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,25,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,75.

**Ключові слова:** фібринолітична пептидаза, *Bacillus thuringiensis*, джерела вуглецю й азоту, двофакторний експеримент.

Фібринолітичні ензими — представники класу пептидаз, здатні гідролізувати нерозчинний протеїн крові фібрин. Застосування таких ензимів у медичній практиці запобігає і сприяє лікуванню серцево-судинних захворювань, причиною яких є тромбози, спричинені утворенням фібринових згустків усередині судин і в порожнинах серця. У сучасній медицині застосовують фібринолітичні агенти як ендогенного, так і екзогенного походження: урокіназу, фібринолізин, гепарин, стрептокіназу, стафілокіназу, терилітин та ін. Попри їх широке застосування, вони мають деякі недоліки, а саме: короткий час напіврозпаду, висока вартість, ризик виникнення алергічних реакцій та ускладнень, пов'язаних із кровотечами [1]. З огляду на це пошук нових продуцентів фібринолітичних ензимів триває. Так, відомо [2], що найбільш активними продуцентами є представники роду *Bacillus*. Раніше [3, 4] у результаті скринінгу було відібрано штам *Bacillus thuringiensis* 27, який окрім еластолітичної виявляв ще й високу фібринолітичну активність. Шляхом хімічного мутагенезу з *B. thuringiensis* 27 було отримано мутантний варіант *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 зі збільшеною ензиматичною ак-

тивністю. Показано, що, змінюючи умови і тривалість культивування, із цього штаму можна одержувати пептидазні ензими різної специфічності [3]. При цьому підбір оптимального складу живильного середовища є важливим для підвищення синтезу потрібного екзоензиму. Тому метою даної роботи була оптимізація умов культивування *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 для біосинтезу пептидази з фібринолітичною активністю.

## Матеріали та методи

Об'єктом дослідження був отриманий за допомогою хімічного мутагенезу штам *B. thuringiensis* [5], що зареєстрований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України за номером ІМВ В-7324. Для культивування штаму як базове використовували оптимізоване раніше [6] для підвищення продукування пептидаз середовище такого складу (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 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. Як джерело вуглецю слугувала мальтоза, азоту — желатин і сульфат амонію. Загальний вміст вуг-

лецю й азоту в базовому середовищі становив 0,55 і 0,2% відповідно. Вміст цих елементів в органічних сполуках середовища розраховували за усередненими даними з літератури [7, 8]. Так, вміст у желатині становив 50% (С) і 18,3% (N), а в дріжджовому автолізаті — 17,21% (С) і 10% (N).

Вплив джерел азоту вивчали, виключаючи зі складу базового середовища культивування всі азотвмісні сполуки (желатин,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , дріжджовий автолізат), замінюючи їх досліджуваною сполукою в еквівалентній кількості до вмісту азоту в базовому середовищі. Як джерела азоту використовували: метіонін, валін, серин, треонін, аланін, лейцин, аспарагін, ізолейцин, гліцин, аспарагінову і глутамінову кислоти, аргінін, гістидин, нітрат натрію, сульфат амонію, желатин та дріжджовий автолізат.

Вивчення впливу різних джерел вуглецю проводили, виключаючи зі складу базового середовища мальтозу, желатин, дріжджовий автолізат і замінюючи їх вуглецевмісними сполуками в еквівалентній до вмісту вуглецю в базовому середовищі кількості. Джерелами вуглецю слугували моносахариди (арабіноза, галактоза, глюкоза, ксилоза, маноза, рамноза, сорбоза); дисахариди (мальтоза, лактоза, сахароза); трисахариди (рафіноза), багатоатомні спирти (маніт, сорбіт, дульцит), а також соєве та кукурудзяне борошно.

Штам *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 культивували на рідкому живильному середовищі зазначеного вище складу в колбах при 42 °С, 200 об/хв качалки, упродовж 2 діб. Інокулюм отримували, культивуючи штам в колбах на тому самому середовищі впродовж 18 год, і вносили в колби у кількості  $10^5$ – $10^6$  КУО/мл.

Кількість біомаси визначали ваговим методом. Клітини відділяли від культуральної рідини центрифугуванням за 8 000 г протягом 15 хв, осад відмивали від компонентів живильного середовища та висушували до постійної маси при 100 °С. Ріст культури оцінювали за оптичною густиною бактеріальної суспензії, яку вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 за довжини хвилі 590 нм.

Ензиматичну активність та протеїн визначали в супернатанті культуральної рідини. Вміст протеїну ватановлювали за методом Лоурі [9]. Загальну пептидазну (казеїнолітичну) активність оцінювали за методом Ансона в модифікації Петрової [10], який базується на кількісному визначенні тирозину і триптофану, що утворюються у процесі ензиматичного гідролізу казеїну під дією досліджуваних ензимів. Продукти роз-

щеплення визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 670 нм. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз протеїну з утворенням 1 мкмоль тирозину за 1 хв. Фібринолітичну активність визначали за методом Masada [11], використовуючи фібрин як субстрат. Утворені продукти розщеплення вимірювали 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 в умовах досліду.

Значущі елементи мінерального живлення базового середовища виявляли шляхом відсіювального досліду [12], в якому нижній рівень концентрацій усіх компонентів приймали за нуль. Значення верхнього рівня дорівнювали концентрації кожного компонента в базовому середовищі культивування. Для кожного компонента знаходили коефіцієнт регресії (b) методом найменших квадратів за допомогою комп'ютерної системи аналізу даних STATISTICA. Для визначення оптимальних концентрацій джерел азоту і вуглецю в живильному середовищі було проведено повний двофакторний дослід (ПФД) на чотирьох рівнях. Фактори живильного середовища позначали як  $X_n$ . Вплив кожного фактора вивчали на чотирьох рівнях. Обчислення та графічне подання результатів повного двофакторного експерименту здійснювали за методом стрімкого сходження (метод Бокса–Уїлсона) за допомогою комп'ютерної системи аналізу даних STATISTICA.

Усі експерименти проводили у трьох повторюваностях. Наведено середні арифметичні величини; відхилення від середнього значення не перевищувало 5%.

## Результати та обговорення

Відомо, що бацили синтезують пептидази в основному в стаціонарній фазі росту. Так, було показано [13], що металоендопептидаза *Bacillus intermedius* 7P синтезується в стаціонарній фазі з максимальним рівнем активності на 30-ту год росту. Максимальний рівень фібринолітичної активності *Bacillus amyloliquefaciens* CH86-1 також досягається у стаціонарній фазі розвитку [2]. Субтилізиноподібна серинова ендонептидаза *B. intermedius* 7P секретується в ранній та пізній стаціонарних фазах росту [14]. Так само двофазний характер синтезу субтилізиноподібної пептидази було показано для *B. amyloliquefaciens* H2 [15].

*B. thuringiensis* IMB B-7324 синтезує пептидази із широким спектром субстратної специфічності. Раніше [16] було встановлено, що в експоненційній фазі росту синтезується пептидаза з еластолітичною дією, причому максимальний синтез ензиму збігається з максимальною швидкістю росту культури. Синтез ензиму залежить від концентрації джерела азоту в середовищі і з підвищенням вмісту азоту до 0,5% пригнічується. Однак при цьому в культуральній рідині штаму залишається фібринолітична активність, що може свідчити про те, що за гідроліз еластину і фібрину відповідають, найімовірніше, різні пептидази. Вивчення динаміки накопичення пептидазного ензиму з фібринолітичною активністю на базовому середовищі показало, що після першої доби культивування рівень фібринолітичної активності становить 1,7 од/мг, а на 48-му год — 4,17 од/мг протеїну (рис. 1). Таким чином, було показано, що за еластолітичну і фібринолітичну активність *B. thuringiensis* IMB B-7324 відповідають різні пептидази, котрі синтезуються на різних стадіях росту клітини. Тому постало питання оптимізації складу живильного середовища для максимального біосинтезу фібринолітичної пептидази.

За результатами відсіювального дослідження було розраховано коефіцієнт регресії, який

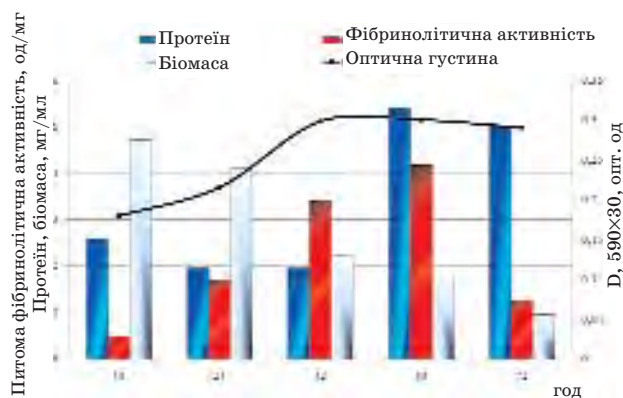


Рис. 1. Динаміка накопичення пептидазного ензиму з фібринолітичною активністю за культивування *B. thuringiensis* IMB B-7324 на базовому середовищі

для всіх компонентів, окрім желатину, мав позитивне значення (табл. 1). Таким чином, показано, що для біосинтезу фібринолітичної пептидази значущими є всі компоненти живильного середовища, крім желатину. Рівень фібринолітичної активності за вирощування на стандартному середовищі, з якого було вилучено желатин, становив до 21 од/мг, що в 4 рази більше, ніж за його присутності.

Відомо, що на синтез пептидаз бацилами однаковою мірою можуть впливати джерела

Таблиця 1. Визначення значущих факторів базового середовища культивування *B. thuringiensis* IMB B-7324 для біосинтезу фібринолітичної пептидази

№	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Желатин	Дріжджовий автолізат	Мальтоза	Фібринолітична активність, од/мг
1	-	+	+	+	+	+	+	2,36
2	+	-	+	+	+	+	+	0,30
3	+	+	-	+	+	+	+	0,38
4	+	+	+	-	+	+	+	3,47
5	+	+	+	+	-	+	+	21,24
6	+	+	+	+	+	-	+	4,19
7	+	+	+	+	+	+	-	0,92
8	-	-	+	+	+	+	+	2,78
9	+	-	-	+	+	+	+	0,84
10	+	+	-	-	+	+	+	1,50
11	-	-	-	+	+	+	+	2,03
12	+	-	-	-	+	+	+	0,00
13	-	-	-	-	+	+	+	0,00
14	-	+	-	+	+	+	+	0,10
15	-	+	+	-	+	+	+	0,15
16	+	-	+	-	+	+	+	1,00
Коефіцієнт регресії, b	0,75	2,83	1,78	1,08	-18,1	0,21	2,22	12,80

Примітка: «+» — наявність, «-» — відсутність відповідного компонента.

як азоту, так і вуглецю. Передбачити, яка саме форма джерела азоту (вуглецю), органічна чи неорганічна, сприятиме максимальному синтезу пептидази, неможливо. Так, для росту і вияву фібринолітичної активності штамом *Bacillus natto* NLSSE оптимальним джерелом азоту є соєвий пептон [17], а для *Bacillus* sp. AS-S20-I — казеїн і сульфат амонію [18]. Додавання солей амонію в середовище культивування *Bacillus pumilis* КММ 62 [19] має подвійний ефект: репресує синтез ензиму на ранній стаціонарній фазі розвитку і стимулює його біосинтез після 46–48 год росту. Комплекс органічних субстратів (альбумін, казеїн, гемоглобін і желатин) репресує синтез пептидази цим штамом. За даними літератури [20], амінокислоти не однаково впливають на синтез пептидазних ензимів, як індуючи, так і репресуючи його. Ріст *B. pumilis* КММ 62 репресувався зі внесенням у живильне середовище валіну та лейцину [19]. Синтез фібринолітичних ензимів *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 і *Paenibacillus polymyxa* SCE 2 підвищувався за культивування їх на середовищі з тіаміном і біотином [21].

Відомо [22], що амінокислоти можуть виступати тільки як джерело азоту за умови достатньої концентрації в середовищі інших джерел вуглецю. У результаті проведення однофакторного експерименту встановлено (рис. 2, а), що заміна джерела азоту в живильному середовищі на треонін призводила до збільшення синтезу ензиму вже на першу добу культивування в 14 разів. Підвищений біосинтез також спостерігали в разі використання деяких інших амінокислот — аспарагіну, аланіну, аргініну, метіоніну, серину і валіну. Внесення як джерел азоту мінеральних сполук сульфату амонію і нітрату натрію спричиняло збільшення активності в 11 і 5 разів, відповідно. Для подальших дослідів було вирішено як джерело азоту використовувати сульфат амонію, виходячи з його доступності і невисокої вартості. Додавання глютамату, аспарагіну, лейцину, гліцину, триптофану, а також високомолекулярних сполук желатину і дріжджового автолізу пригнічувало синтез ензиму. Це може свідчити про те, що для синтезу фібринолітичної пептидази клітині передусім потрібні легкодоступні джерела азоту. Інhibуючий вплив дріжджового автолізу, який за результатами попередньо проведеного відсіювального експерименту (табл. 1) виявився одним зі значущих факторів, найімовірніше, можна пояснити різницею в концентраціях, у яких цю сполуку

вносили в середовище в різних дослідах. Імовірно, в ньому можуть міститись фактори, які у великих концентраціях пригнічують синтез протеїну і/або інhibують ензиматичну активність. Вивчення казеїнолітичної активності в супернатанті культуральної рідини *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 за умов додавання до складу середовища різних джерел азоту (рис. 2, б), виявило деякі закономірності, схожі з такими за фібринолітичною активністю: дріжджовий автолізат її пригнічував, а в разі росту на середовищі з глютаматом, аспарагіном та триптофаном пептидазна активність була повністю відсутня.

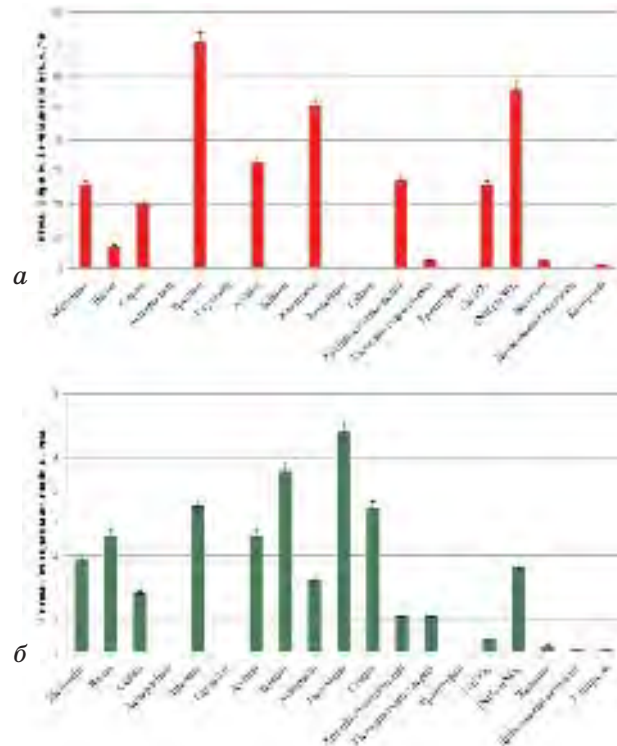


Рис. 2. Питома фібринолітична (а) і загальна пептидазна (б) активність за культивування *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 на середовищах з різними джерелами азоту

Аналіз даних літератури щодо впливу джерел вуглецю на синтез пептидаз із фібринолітичною активністю показав, що органічні джерела вуглецю є кращими для росту культури та накопичення таких ензимів. Так, крохмаль і глюкоза стимулюють синтез пептидаз і ріст *B. licheniformis* CUMC 305 і *Bacillus coagulans* CUMC 512 [23], а наттокіназа *B. subtilis* ZK8 [24], яка міститься в натто — традиційній ферментованій їжі японців, — за культивування на середовищі з ксилозою (2%). З урахуванням даних літератури наступний однофакторний експеримент

з дослідження впливу різних джерел вуглецю проводили, використовуючи як джерело вуглецю різні низькомолекулярні та високомолекулярні вуглецевмісні сполуки в еквімолярній з базовим середовищем кількості. У цих дослідах джерелом азоту слугував сульфат амонію. Показано (рис. 3, а) пригнічувальну дію більшості вуглеводів, зокрема й глюкози, на синтез *B. thuringiensis* IMB B-7324 пептидази з фібринолітичною активністю. Оптимальними джерелами вуглецю для синтезу фібринолітичного ензиму були дульцит, мальтоза і арабіноза, використання яких підвищувало активність у 8–12 разів. Меншою мірою стимулювали синтез пептидази ксиліоза, манноза і галактоза (у 3–4 рази). Питома активність при цьому становила від 10 до 52 од/мг протеїну. Беручи до уваги вартість, серед трьох найоптимальніших джерел вуглецю для подальшої роботи було обрано мальтозу. Заміна простого джерела вуглецю в живильному середовищі на багатокомпонентні високомолекулярні сполуки, такі як соєве та кукурудзяне борошно, призводила до пригнічення фібринолітичної активності. На противагу цьому, раніше було встановлено, що високомолекулярні сполуки стимулюють синтез пептидаз з еластолітичною активністю на ранніх фазах розвитку культури [16]. Дослідження загальної пептидазної активності *B. thuringiensis* IMB B-7324 показало, що дисахариди (сахароза, лактоза, мальтоза), трисахарид (рафіноза) і багатоатомні спирти (маніт, дульцит і сорбіт) стимулюють синтез штамом інших пептидаз (рис. 3, б). Пептидазна активність при цьому досягала значень 0,47–0,77 од/мг протеїну.

Відомо, що іони двовалентних металів необхідні для формування функціонально активної конформації багатьох пептидаз, а також стабілізації молекули ензимів, що може сприяти підвищенню їхньої активності [15]. Так, було встановлено (табл. 1), що крім джерел азоту і вуглецю значущими факторами є й компоненти мінерального живлення (сульфат цинку, фосфат калію, сульфат магнію). Оскільки не встановлено, що саме впливає — катіон металу чи аніон, було проведено наступну серію однофакторних експериментів (№1–6), в яких штам культивували на середовищах, що містили підібрані раніше джерела азоту і вуглецю, а сульфат цинку замінювали на ацетат і хлорид цинку; сульфат магнію — на карбонат магнію; фосфат калію — на хлорид калію, фосфат натрію і фосфат кальцію (табл. 2). Було встановлено, що для максимального

синтезу фібринолітичної пептидази необхідним є додавання в середовище сульфату цинку (№1, табл. 2). Питома фібринолітична активність при цьому становила 50 од/мг.

Завдання зі знаходження оптимального співвідношення відібраних джерел вуглецю й азоту на фоні постійних рівнів інших факторів середовища розв'язували за допомогою двофакторного експерименту на чотирьох рівнях. Як джерело азоту і вуглецю використовували сульфат амонію і мальтозу, відповідно. Також, враховуючи попередні результати, для експерименту замість сульфату цинку застосовували ацетат цинку, концентрація якого перебувала на постійному рівні. Фактори живильного середовища позначали: X1 —  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , X2 — мальтоза (табл. 3). Для кожного фактора визначали інтервал варіювання. Було показано, що для максимального синтезу фібринолітичної пептидази слід збільшувати концентрацію як джерела азоту, так і джерела вуглецю (табл. 4). Найвищі показники активності культуральної рідини було зафіксовано за вмісту сульфату амонію 12 г/л. Оптимальний вміст мальтози коливався в межах від 18 до 24 г/л.

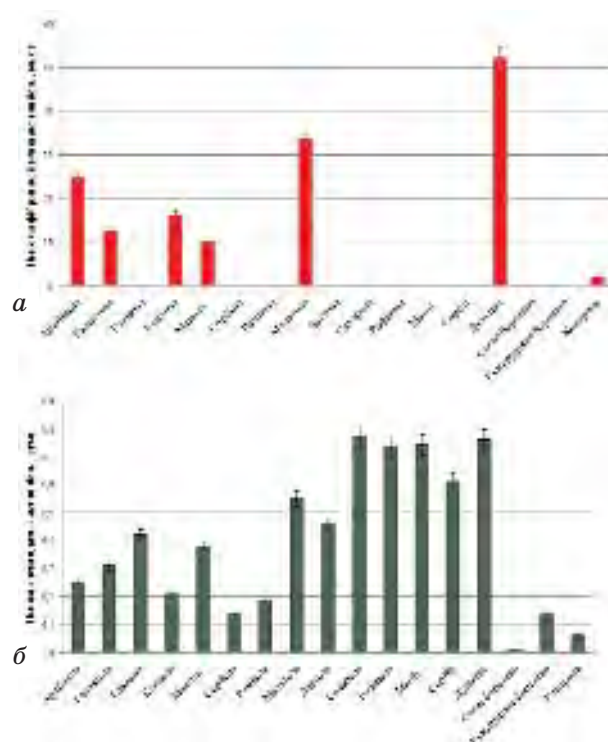


Рис. 3. Питома фібринолітична (а) і загальна пептидазна (б) активність за культивування *B. thuringiensis* IMB B-7324 на середовищах з різними джерелами вуглецю

Таблиця 2. Підбір компонентів мінерального живлення в середовищі культивування *B. thuringiensis* IMB B-7324 для біосинтезу фібринолітичної пептидази

№ до-слі-ду	Мальтоза + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn	ZnCl <sub>2</sub>	MgCO <sub>3</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	CaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Питома ФА, од/мг (2 доба)
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	50±2,5
2	+	-	+	+	-	-	-	+	-	23±1,15
3	+	-	+	+	-	-	-	-	+	39±1,95
4	+	+	-	+	-	-	+	-	-	34±1,7
5	+	+	+	-	+	-	-	-	-	24±1,2
6	+	+	+	-	-	+	-	-	-	27±1,4

Таблиця 3. Значення факторів у натуральних змінних, одиниці варіювання (σ г/л) і концентрації основних компонентів живильного середовища

Досліджувані фактори	Рівні досліджуваних факторів*			
	1	2	3	4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (г/л), X1	6	12	18	24
Мальтоза, (г/л), X2	6	12	18	24

\* — Концентрації KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O в середовищі залишалися на постійному рівні (1,6, 0,75, 0,25 г/л, відповідно).

Таблиця 4. Результати повного факторного експерименту для двох факторів

Номер варіанта	X1	X2	Фібринолітична активність, од/мг протеїну
1	1	1	49,13±2,46
2	1	2	49,87±2,49
3	1	3	57,38±2,87
4	1	4	42,80±2,11
5	2	1	66,97±3,35
6	2	2	77,17±3,86
7	2	3	94,50±4,72
8	2	4	93,40±4,67
9	3	1	33,77±1,69
10	3	2	38,59±1,93
11	3	3	44,66±2,23
12	3	4	52,73±2,64
13	4	1	25,0±1,25
14	4	2	26,78±1,34
15	4	3	38,59±1,93
16	4	4	40,19±2,0

На основі отриманих даних двофакторного дослідження було побудовано тривимірне зображення поверхні відгуку (рис. 4, а) для визначення оптимальних концентрацій мальтози і сульфату амонію, за яких досягається максимальна питома фібринолітична активність супернатанта культуральної

рідини *B. thuringiensis* IMB B-7324. Зміна параметрів культивування за основними елементами живлення показала досить сильну ступінь кривизни 3D-поверхні, за допомогою якої можна легко знайти оптимальні концентрації (рис. 4, б): мальтози — 19 г/л, сульфату амонію — 12 г/л. В умовах дослідження використання таких концентрацій мальтози і сульфату амонію в живильному середовищі дало змогу досягти на другу добу культивування рівня фібринолітичної активності культуральної рідини 100–105 од/мг протеїну. При цьому в оптимізованому середовищі загальний вміст азоту було підвищено в 12,5 раза (з 0,2 до 2,5%), а вміст вуглецю — в 14,6 раза (з 0,55 до 8,04%). Таким чином, у ході цього дослідження вдалося збільшити активність фібринолітичної пептидази майже в 25 раз порівняно з активністю на базовому середовищі.

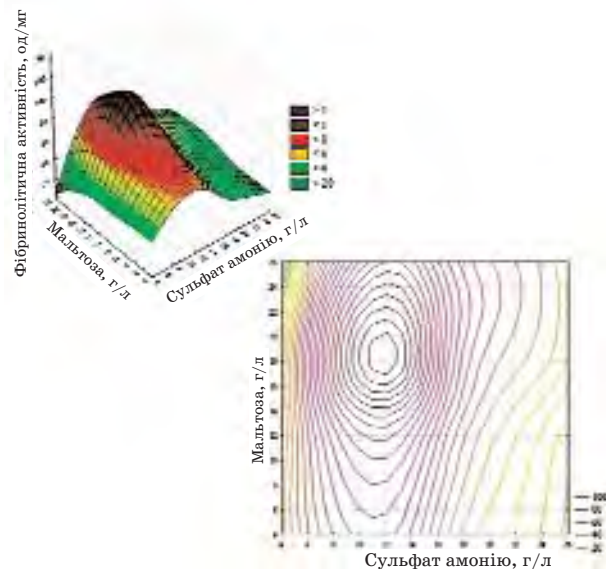


Рис. 4. Тривимірне зображення поверхні відгуку, що показує ефект впливу різних концентрацій мальтози і сульфату амонію на питому фібринолітичну активність *B. thuringiensis* IMB B-7324

Таким чином, у результаті проведених нами досліджень можна зробити такі висновки.

*B. thuringiensis* IMB В-7324 синтезує позаклітинну фібринолітичну пептидазу в умовах глибинного культивування. Максимальна активність на базовому середовищі становить 4,17 од/мг і досягається у стаціонарній фазі росту культури.

Для біосинтезу фібринолітичної пептидази значущими є практично всі компоненти живильного середовища, крім желатину. Виключення його із середовища культивування дає змогу підвищити фібринолітичну активність культуральної рідини до 21 од/мг.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Gebbink M., Bouma B., Maas C. et al.* Physiological responses to protein aggregates: Fibrinolysis, coagulation and inflammation (new roles for old factors) // *FEBS Lett.* — 2009. — V. 583, N 16. — P. 2691–2699.
2. *Lee A. R., Kim G. M., Park J. Y. et al.* Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH86-1 isolated from cheonggukjang // *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* — 2010. — V. 53, N 1. — P. 56–61.
3. *Левішко А. С.* Фізико-хімічні властивості і субстратна специфічність протеаз *Bacillus sp.27*, *Bacillus circulans* 693 і *Yarrowia lipolytica* 2061: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2009. — 24 с.
4. *Шубчинська А. С., Варбанець Л., Нагорна С. та ін.* Скринінг мікроорганізмів — продуцентів протеаз // *Мікроб. журн.* — 2008. — Т. 70, № 1. — С. 3–9.
5. *Мацелюх О. В.* Отримання мутантів *Bacillus sp.* з підвищеною здатністю до синтезу еластази // *Біотехнологія.* — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 42–47.
6. *Колтукова Н. В., Васкивнюк В. Т.* Подбор методов выделения протеолитического комплекса из *Bacillus mesentericus* 316м при глубинном выращивании // *Микробиол. журн.* — 1980. — Т. 42, № 2. — С. 245–248.
7. *Szpak P.* Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis // *J. Archaeol. Sci.* — 2011. — V. 38, N 12. — P. 3358–3372.
8. *Minami M., Nakamura T.* Carbon and nitrogen isotopic fractionation in bone collagen during chemical treatment // *Chem. Geol.* — 2005. — V. 222, N 1–2. — P. 65–74.
9. *Lowry O. H., Rosebrough H. J., Faar A. L. et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193, N 1. — P. 265–275.
10. *Петрова И. С., Винцюнайте М. Н.* Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // *Прикл. биохим. микробиол.* — 1966. — Т. 2, № 1. — С. 322–327.
11. *Masada M.* Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // *Food Style.* — 2004. — V. 8, N 1. — P. 92–95.
12. *Лисенков А. Н.* Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов. — М.: Медицина, 1979. — 344 с.
13. *Федорова К. П., Каюмов К. П., Федорова А. Р. и др.* Экспрессия генов сериновых протеиназ *B. intermedius* в клетках *B. subtilis*, дефектных по белкам CodY и TnrA // *Мат. докл. междунауч. конф. студ. асп. мол. уч. «Ломоносов — 2008»*, 8–11 апреля. — М., 2008. — С. 14.
14. *Михайлова Е. О.* Субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus intermedius*, секретируемая рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Казань, 2007. — 21 с.
15. *Балабан Н. П., Марданова А. М., Маликова Л. А. и др.* Биосинтез субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* H2 и биологические свойства фермента // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* — 2008. — Т. 150, Кн. 2. — С. 81–90.
16. *Мацелюх О. В., Нидялкова Н. А., Варбанець Л. Д.* Особливості росту і біосинтезу еластази мутантним варіантом *Bacillus sp. 27-88ELS* // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 3. — С. 43–50.
17. *Liu J. G., Xing J. M., Chang T. S. et al.* Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods // *Proc. Biochem.* — 2005. — V. 40, N 8. — P. 2757–2762.
18. *Mukherjee A. K., Raia S. K.* A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative *Bacillus sp.* strain AS-S20-I // *New Biotechnol.* — 2011. — V. 28, N 2. — P. 182–189.
19. *Маликова Л. А., Марданова А. М., Соколова О. В. и др.* Условия биосинтеза внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы

- B. pumilis* КММ 62 // Микробиол. — 2007. — Т. 76, № 3. — С. 313–320.
20. Намазов Н. Р., Касумова С. Ю., Гасанов Х. А. и др. Влияние различных источников азота на образование протеолитических ферментов гриба *Arthrobotrys compacta* // Вестн. Моск. гос. обл. ун-та, серия «Естеств. науки». — 2010. — № 1. — С. 48–51.
21. Alvarez V. M., von der Weid I., Seldin L. et al. Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE 2 // Lett. Appl. Microbiol. — 2006. — V. 43, N 6. — P. 625–630.
22. Любецкая А. В., Рубанов Л. И., Гельфанд М. С. Применение потоковой модели для изучения метаболизма *Escherichia coli* // Биохимия. — 2006. — Т. 71, Вып. 11. — С. 1544–1549.
23. Asokan S., Jayanthi C. Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* // J. Cell Tissue Res. — 2010. — V. 10, N 1. — P. 2119–2123.
24. Deepak V., Kalishwaralal K., Ramkumarpan-dian S. et al. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology // Biores. Technol. — 2008. — V. 99, N 17. — P. 8170–8174.

**ОПТИМИЗАЦИЯ СРЕДЫ  
ДЛЯ СИНТЕЗА  
ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ ПЕПТИДАЗЫ  
*Bacillus thuringiensis* ИМВ В-7324**

Н. А. Нудялкова  
Е. В. Мацелюх  
Л. Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии  
НАН Украины, Киев

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Исследованы условия культивирования *Bacillus thuringiensis* ИМВ В-7324 для биосинтеза пептидазы с фибринолитической активностью. Установлено, что максимальный синтез энзима (4,17 ед/мг протеина) происходит в стационарной фазе роста штамма при глубинном культивировании. Показано, что для биосинтеза пептидазы значимыми являются все компоненты базовой среды, кроме желатина, удаление которого приводит к повышению активности в 4 раза (21 ед/мг). Изучено влияние источников азота и углерода на синтез энзима. Установлено, что оптимальными источниками являются сульфат аммония и мальтоза, использование которых позволяет увеличить исходную активность в 12 раз (50 ед/мг протеина). С помощью двухфакторного эксперимента на четырех уровнях были определены оптимальные концентрации мальтозы и сульфата аммония в среде, использование которых способствует повышению фибринолитической активности в 25 раз (105 ед/мг протеина). Оптимизированная среда содержала (г/л): мальтозу — 19,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 12,0, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> — 1,6, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0, 25, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,75.

**Ключевые слова:** фибринолитическая пептидаза, *Bacillus thuringiensis*, источники углерода и азота, двухфакторный эксперимент.

**OPTIMIZATION  
OF THE MEDIUM FOR THE SYNTHESIS  
OF THE *Bacillus thuringiensis* IMB В-7324  
FIBRINOLYTIC PEPTIDASE**

N. A. Nidialkova  
O. V. Matselyukh  
L. D. Varbanets

Institute of microbiology and virology  
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

The cultivation conditions of *Bacillus thuringiensis* IMV В-7324 with fibrinolytic activity was studied. It was found that maximal synthesis of enzyme (4,17 U/mg of the protein) occurred at the stationary phase of the strain by submerged cultivation. It was shown that all the components of the basic medium without gelatin were significant for biosynthesis of peptidase. Elimination of gelatin resulted in increasing of the activity in 4 times (21 U/mg of protein). Influence of nitrogen and carbon sources on enzymatic synthesis was studied. It was found that the optimal synthesis sources were ammonium sulfate and maltose. Their application enabled to increase the initial activity in 12 times (50 U/mg of protein). The optimal concentrations of ammonium sulfate and maltose in the medium which allowed increasing the fibrinolytic activity in 25 times (105 U/mg of protein) was determined by bifactorial experiment on four levels. The optimized nutritious medium contained (g/l): maltose — 19,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 12,0, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> — 1,6, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,25, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,75.

**Key words:** fibrinolytic peptidase, *Bacillus thuringiensis*, carbon and nitrogen sources, bifactorial experiment.