

# ВОДНА МІКРОБІОЛОГІЯ

---

УДК 541.49:546.732/3:547.496.2

**О.В. ГУДЗЕНКО**, к. б. н., ст. дослідник, ст. наук. співроб.,  
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна  
e-mail: alena.gudzenko81@gmail.com  
ORCID 0000-0002-6103-6109

**Є.М. СТОГНІЙ**, к. б. н., наук. співроб.,  
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,  
вул. Леонтовича, 9, Київ, 01054, Україна  
e-mail: stogniyevgen@gmail.com  
ORCID 0000-0002-1235-8400

**Л.Д. ВАРБАНЕЦЬ**, д. б. н., проф., зав. відділу,  
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна  
e-mail: varbanets\_imv@ukr.net  
ORCID 0009-0000-1172-4088

**В.О. ЧЕРНИШЕНКО**, д. б. н., ст. дослідник., заст. директора,  
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,  
вул. Леонтовича, 9, Київ, 01054, Україна  
e-mail: bio.cherv@gmail.com  
ORCID 0000-0002-6564-8823

**В.О. ІВАНИЦЯ**, д. б. н., проф., чл.-кор. НАН України, проректор,  
Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65029, Україна  
e-mail: v\_ivanit@ukr.net  
ORCID 0000-0001-5325-3800

## ЗДАТНІСТЬ БАКТЕРІЙ ЧОРНОГО МОРЯ ГІДРОЛІЗУВАТИ ФІБРИН, ФІБРИНОГЕН ТА КОЛАГЕН

---

*В результаті проведених досліджень щодо вивчення здатності екзопротеаз супернатантів культуральних рідин бактерій, виділених із донних осадів Чорного моря, гідролізувати фібрин, фібриноген та колаген, відібрано активні продуценти *Bacillus subtilis* 248 та *Bacillus subtilis* 231. Показано, що їх частково очищені ензимні препарати відрізнялися за фізико-хімічними властивостями. Так, фібрин(оген)олітична активність *B. subtilis* 248 має рН оптимум 9,0, а термооптимум фібриногенолітичної активності — 4—20 °С, в той час як фібринолітичної — 15—20 °С. Частково очищений ензимний препарат *B. subtilis* 231 має два рН оптимума фібрин(оген)олітичної активності — 7,0 та 11,0, а термооптимум — 37 °С. Встановлено, що *Bacillus subtilis* 248 та *Bacillus subtilis* 231, можуть бути перспективними для*

---

Ц и т у в а н н я: Гудзенко О.В., Стогній Є.М., Варбанець Л.Д., Чернишенко В.О., Іваниця В.О. Здатність бактерій Чорного моря гідролізувати фібрин, фібриноген та колаген. *Гідробіол. журн.* 2024. Т. 60, № 4. С. 51—65.

ISSN 0375-8990. Гідробіологічний журнал. 2024. 60(4)

51

подальших наукових досліджень як продуценти протеаз з  $\alpha/\beta/\gamma$ -фібриногеназною та  $\alpha/\beta$ -фібриназною активністю.

**Ключові слова:** ензими морських мікроорганізмів, екзопротеази, фібрин(оген)олітична, колагеназна активність.

Моря та океани, не менш, ніж прісні водойми, придатні для проживання мікроорганізмів, які пристосувалися до таких екстремальних умов, як солоність, високий тиск, низька температура та специфічне освітлення. Ці фактори стимулюють розвиток унікальних мікроорганізмів з незвичайними властивостями та генетичними адаптаціями. В морському середовищі зустрічаються різноманітні види, багато з яких не мають наземних аналогів. Тому одержання біологічно активних сполук нових структурних типів, а також виявлення високопродуктивних продуцентів таких сполук, як ензими морських мікроорганізмів, продовжують знаходитися в центрі інтересів дослідників, які на сьогодні виділили та охарактеризували ряд ензимів. Головним чином, це глікозидази, здатні гідролізувати складні полісахариди, що знаходяться в морському середовищі, такі як полісахариди водоростей, крохмаль, целюлоза, лігнін, пектин, ксилан, та інші [14, 20]. Що стосується протеолітичних ензимів різної специфічності, то найбільш вивченими являються фібринолітичні ензими ряду видів мікроорганізмів [1–6], дещо менше досліджені продуценти колагеназ [18, 23] та фібриногеназ [5, 21]. Екзопротеази, зокрема з колагеназною та фібрин(оген)олітичною активністю, що продукуються морськими бактеріями, відіграють ключову роль у водних екосистемах. Ці ферменти розщеплюють білки, такі як фібрин, фібриноген та колаген, які потім використовуються іншими мікроорганізмами як джерело їжі. Екзопротеази також впливають на доступність поживних речовин для фіто-і зоопланктону, що є основою харчових ланцюгів у водних середовищах [9]. Дослідження біохімічних характеристик протеолітичних ферментів, умов їх експресії та впливу на екологічні процеси мають значення для розуміння динаміки водних середовищ [11].

Необхідно відмітити, що всі відомі на сьогодні продуценти вищевказаних протеолітичних ензимів головним чином виділені із акваторії Тихого океану та близько розташованих морів, зокрема таких, як Південно-Китайське, Східно-Китайське. Разом з тим джерела ферментів із інших морських середовищ досліджено значно менше. Так, лише поодинокі продуценти виділені з Антарктики та Індійського океану. Раніше [12] нами в результаті скринінгу 20 штамів бактерій, виділених із донних осадів Чорного моря, були відібрані 8 штамів, які були ефективними по відношенню до фібрину, фібриногену і колагену.

Дослідження ензимів з фібринолітичною активністю є перспективними з огляду на їхнє можливе використання для тромболізи. Пояснюється це тим, що саме фібриноген, перетворюючись на фібрин, набуває здатності до полімеризації і складає основу кров'яного згустку — тромбу. За умов адресної доставки протеїназ до зони внутрішньосудинного тромбоутворення, такі ензими можуть ефективно та швидко руйну-

вати фібринову основу тромбу, забезпечуючи реоклюзію. Дія фібриногенолітичних ензимів розглядається як спосіб зниження у плазмі крові концентрації фібриногену, здатного до полімеризації. Частково гідролізований специфічними протеїназами фібриноген не елімінуватиметься, як продукти гідролізу плазміном, а циркулюватиме у кровотоці, хоча й матиме менший прокоагулянтний потенціал [7, 8, 15, 16]. Окрім того, ензими, здатні гідролізувати фібриноген, можуть стати інструментами досліджень структури та функцій цієї молекули, будучи використаними для отримання частково гідролізованих фрагментів фібриногену та для оцінки доступності тих чи інших ділянок молекули дії протеїназ [21].

Підвищену увагу дослідників в останні роки привертають також морські продуценти колагеназ, здатних деградувати такі компоненти морських організмів, як шкіра, луска, кістки, сухожилля, зуби, які є джерелами колагену. Колагени являються найбільш поширеними протеїнами у всіх вищих організмів, включаючи морські тварини. Відсутність знань щодо морських колагенолітичних протеаз є великою перешкодою для з'ясування механізму деградації морського колагену. Разом з тим, мікробні колагенази можуть бути використані для продукції нових колагенових пептидів, як функціональних харчових інгредієнтів.

Тому метою даної роботи було дослідити здатність екзопротеаз супернатантів культуральних рідин бактерій, виділених із донних осадов Чорного моря, гідролізувати фібрин, фібриноген та колаген, а також оцінити фізико-хімічні властивості та субстратну специфічність частково очищених препаратів ензимів найбільш перспективних штамів.

### Матеріал і методика досліджень

Об'єктами дослідження були штами *Bacillus subtilis* 1, *Bacillus atrophaeus* 08, *Priestia megaterium* 035, *Priestia megaterium* 116, *Bacillus subtilis* 231, *Bacillus* sp. Мусо, *Bacillus licheniformis* 249, *Bacillus subtilis* 248, які були виділені з донних відкладів на глибинах 1499, 888 та 2080 м у Чорному морі, з відповідних горизонтів кернів донних осадов з інтервалом 5 см (таблиця 1). Зразки, з яких ідентифіковано штами, були відібрані під час експедиції М 84/2 Бременського університету на кораблі «Метеор» у березні 2011 р. та передані до Одеського національного університету для мікробіологічних досліджень Ю.П. Зайцевим і Б.Г. Александровим (Інститут біології моря НАН України). Відібрані штами були ідентифіковані авторами за спектрами жирних кислот за допомогою автоматичної системи ідентифікації Sherlock Microbial Identification System [3].

Культури *Bacillus subtilis* 1, *Bacillus atrophaeus* 08, *Priestia megaterium* 035, *Priestia megaterium* 116, *Bacillus subtilis* 231, *Bacillus* sp. Мусо, *Bacillus licheniformis* 249, *Bacillus subtilis* 248 вирощували у глибинних умовах в колбах Ерленмейера (750 мл), які містили 100 мл поживного середовища, при перемішуванні 212 об/хв, при температурі 28 °С. В якості базового використовували середовище такого складу (г/л):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,75;  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  — 0,25;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 0,5; мальтоза — 1,0; желатин — 10,0; дріжджовий автолізат — 0,15, рН 7.

Біомасу відділяли центрифугуванням при 5000 g 45 хв, і в супернатанті культуральної рідини (СКР) визначали протеолітичні активності.

Визначення фібрин(оген)олітичної активності проводили за методом [1], використовуючи як субстрат фібрин(оген). Утворення продуктів розщеплення фібрин(оген)у вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібрин(оген)олітичної активності приймали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв.

Колагеназну активність визначали за методом [16]. Продукти розщеплення колагену визначали в реакції з нінгідрином на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 600 нм. За одиницю колагеназної активності приймали кількість мкмолей вивільненого лейцину за 1 хв.

Загальну протеолітичну (казеїнолітичну) активність визначали за методом Ансона, який базується на кількісному визначенні тирозину, що утворюється під час ферментативного гідролізу казеїну під впливом досліджуваних ферментів [1].

Для виділення та очистки фібриногену використовували плазму крові людини [8]. До плазми крові додавали при постійному перемішуванні  $BaSO_4$  (30 г на л плазми) для видалення вітамін К-залежних білків. Плазму перемішували протягом години. Потім проводили центрифугування плазми за 1300 g впродовж 10 хв. Процедуру додавання  $BaSO_4$  повторювали двічі. Потім на водяній бані нагрівали плазму крові не більше ніж до 27 °С протягом 30 хв і додавали 1/10 від загального об'єму 1 М гліцинового буферу, рН 9,0 і при постійному перемішуванні повільно додавали невеликими порціями 16 %  $Na_2SO_4$ . Осад, що утворився, відділяли центрифугуванням (1300 g, 30 хв) при кімнатній температурі, а до супернатанту додавали розчин 16 %  $Na_2SO_4$ , центрифугували при 1300 g протягом 30 хв за температури 10—15 °С і одержували осад фібриногену. Осад розчиняли у 0,2 М  $NaCl$ . Потім фібриноген переосаджували за допомогою рівного об'єму 16 %  $Na_2SO_4$ . Далі переосаджений фібриноген розчиняли при кімнатній температурі у 0,15 М  $NaCl$  і зберігали при —20 °С [15].

Таблиця 1

Штами бактерій

Вид, штам	Номер станцій, глибина, горизонт
<i>Bacillus subtilis</i> 1	242, 1499, 5—10
<i>Bacillus atrophaeus</i> 08	242, 1499, 10—15
<i>Priestia megaterium</i> 035	258, 888, 30—35
<i>Priestia megaterium</i> 116	269, 2080, 0—5
<i>Bacillus subtilis</i> 231	258, 888, 5—10
<i>Bacillus</i> sp. Myco	242, 1499, 15—20
<i>Bacillus licheniformis</i> 249	258, 888, 0—5
<i>Bacillus subtilis</i> 248	242, 1499, 15—20

Протеоліз фібрин(оген)у та колагену проводили за кінцевої концентрації протеїнів 2 мг/мл в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, який містив 0,13 М NaCl, а також супернатанти культуральних рідин досліджуваних культур бактерій, за температури 37 °С. Реакцію гідролізу зупиняли додаванням буферу для зразків, що містив β-меркаптоетанол, та наступним кип'ятінням отриманої суміші.

Для дослідження гідролізу фібрину супернатантами культуральних рідин використовували: буферний розчин 0,05 М трис-НСІ рН 7,4 з 0,13 М NaCl; розчин фібриногену в концентрації 6 мг/мл, розчин тромбіну з активністю 1,5 NIH/мл та розбавлені в 100 разів розчини супернатантів культуральних рідин досліджуваних бактерій. Вносили у скляні пробірки однакові об'єми розчину фібриногену, супернатанти культуральних рідин та тромбіну. У контрольну пробу замість супернатантів культуральних рідин вносили буферний розчин. Реакційні суміші інкубували за температури 37 °С протягом 1 години. У приготовані зразки додавали буферний розчин для електрофоретичних зразків у співвідношенні 1:1, що містив β-меркаптоетанол.

Електрофорез у поліакріламідному гелі за методом Лемлі [17] проводили з використанням трис-гліцинової системи. Розділення протеїнів проводили при силі струму 19 мА у концентруючому і 35 мА для розподільного гелів.

Проявлення гелю проводили забарвленням у фарбуючому розчині (0,01 % розчин Кумассі G-250 в 25 % ізопропанолі та 10 % оцтової кислоти) протягом 15 хвилин. Для видалення залишків барвника використовували 2—8 % розчин оцтової кислоти.

Для встановлення молекулярної маси білків використовували маркерні протеїни («Thermo Fisher Scientific», США) (250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 кДа).

При проведенні ензим-електрофорезу 12 % ПААГ був заполімеризований у присутності 0,5 мг/мл фібриногену. Після електрофорезу, проведеного за методом Лемлі, SDS видаляли з гелю триразовою промивкою в 2,5 % розчині тритону X-100 протягом 30 хв. Потім гель інкубували у 0,05 М трис-НСІ рН 7,4 з 0,13 М NaCl протягом 12 год. Гель забарвлювали Coomassie R-250 та ідентифікували зони протеолітичної активності за положенням незабарвлених плям на гелі [17].

Аналогічним чином готували гель, заполімеризований з 0,5 мг/мл колагену. Для вивчення фібринолітичної дії методом гель-електрофорезу в гель заполімеризовували фібриноген, а після відмивки SDS додатково інкубували протягом години у 0,05 М трис-НСІ рН 7,4 з 0,13 М NaCl з 0,25 NIH/мл тромбіну.

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [1]. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін (1 мг/мл).

Частково очищені ферментні препарати одержували шляхом осадження сульфатом амонію. До супернатанту культуральної рідини додавали суху сіль  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до кінцевої концентрації 90 %. Суміш витримували

6 год за температури 4 °С та центрифугували при 5000 g 45 хв. Осад збирали, розчиняли у трикратному об'ємі 3 М сульфату амонію.

Дослідження впливу температури та рН середовища проводили в інтервалі температур від 4 до 80 °С та рН від 3,0 до 12,0, останній створювали 0,05 М універсальним фосфатним буфером.

Усі досліди проводили в 3—5 повторностях. Для проведення статистичного аналізу використовувався *t*-критерій Стьюдента. Дані представлені як середнє ± стандартна помилка ( $M \pm m$ ) і вважаються значущими при  $p < 0,05$ . Результати, представлені у вигляді графіків, опрацьовані за допомогою Microsoft Excel 2007.

### Результати досліджень

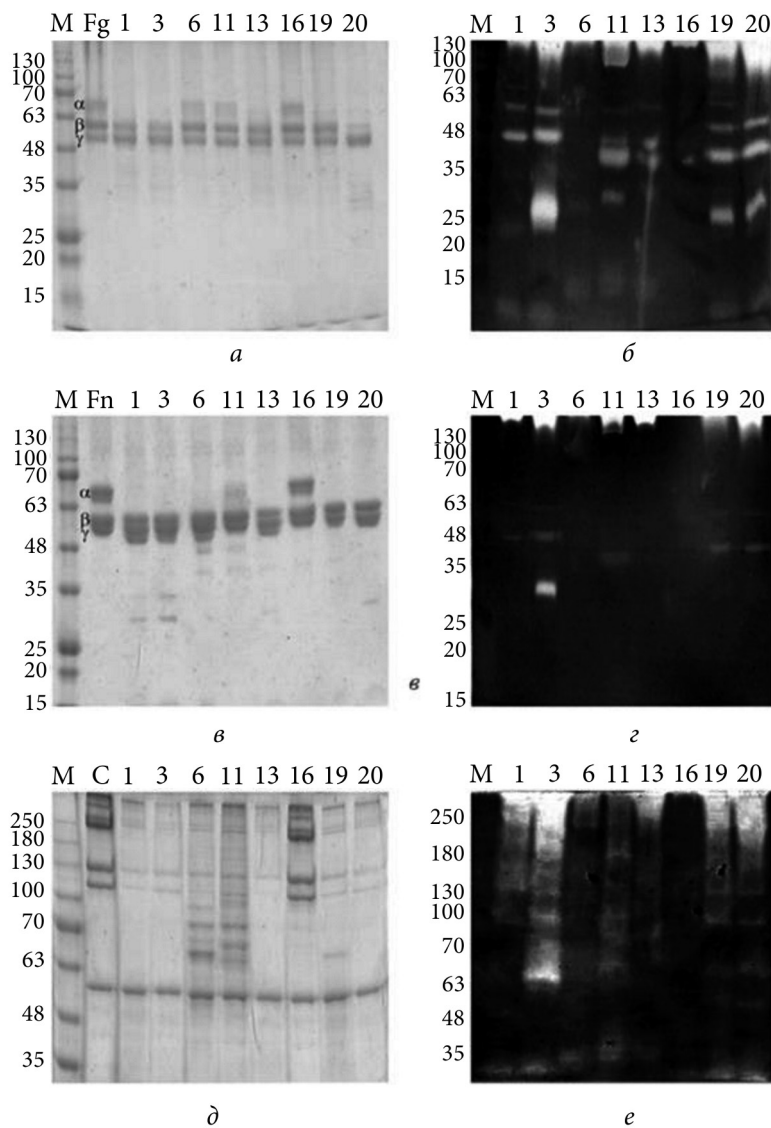
В результаті проведеного нами раніше [12] скринінгу серед бактерій, виділених із донних осадів з різних глибин Чорного моря, було відібрано 8 штамів, які проявляли найбільшу активність (табл. 2) по відношенню до фібриногену, фібрину та колагену.

Здатність супернатантів культуральних рідин досліджуваних штамів проявляти вказані протеолітичні активності була підтверджена (рис. 1) дослідженнями їх здатності гідролізувати фібриноген, фібрин та колаген в ПААГ електрофорезі. Так, було показано (див. рис. 1, а), що найбільш активний гідроліз фібриногену спостерігається за дії СКР *Bacillus subtilis* 248, який уже за час гідролізу розщепив не тільки альфа ланцюг, але почав гідролізувати і бета ланцюг. Найгірше гідролізували фібриноген СКР *Priestia megaterium* 035, *Priestia megaterium* 116 та *Bacillus* sp. Мусо, зокрема останній дуже слабо гідролізував тільки альфа ланцюг. З метою ідентифікації протеолітично активних ензимів був проведений ензим-електрофорез (рис. 1, б), який підтвердив закономірність, яка спостерігалася

Таблиця 2

#### Протеолітична активність супернатантів культуральних рідин досліджуваних штамів бактерій

Вид, штам	Активність, од/мл		
	фібриноген-нолітична	фібринолітична	колагеназна
<i>Bacillus subtilis</i> 1	16,66	15,66	0,42
<i>Bacillus atrophaeus</i> 08	11,0	10,00	0,10
<i>Priestia megaterium</i> 035	5,60	5,50	0,20
<i>Priestia megaterium</i> 116	8,60	8,50	0,47
<i>Bacillus subtilis</i> 231	20,00	13,00	0,09
<i>Bacillus</i> sp. Мусо	13,3	13,00	0,18
<i>Bacillus licheniformis</i> 249	20,0	19,0	0,25
<i>Bacillus subtilis</i> 248	21,66	20,5	0,32



**Рис. 1.** Протеоліз фібриногену, полімерного фібрину та колагену супернатантами культуральних рідин мікроорганізмів: 1 — *Bacillus subtilis* 1; 3 — *Bacillus atrophaeus* 08, 6 — *Priestia megaterium* 035; 11 — *Priestia megaterium* 116; 13 — *Bacillus subtilis* 231; 16 — *Bacillus* sp. Мусо; 19 — *Bacillus licheniformis* 249, 20 — *Bacillus subtilis* 248. *a* — SDS-PAGE гідролізу фібриногену протеазами, що містяться в СКР. Fg — контрольна проба фібриногену. *б* — Ензим-електрофорез СКР мікроорганізмів. Фібриноген кополімеризували в поліакриламідному гелі. *в* — SDS-PAGE гідролізу полімеризованого фібрину протеазами СКР. Fn — контрольний зразок фібрину. *г* — Ензим-електрофорез СКР мікроорганізмів. Полімерний фібрин кополімеризували в поліакриламідному гелі. *д* — SDS-PAGE гідролізу колагену протеазами СКР. С — контрольний зразок колагену. *е* — Ензим-електрофорез СКР мікроорганізмів. Колаген кополімеризували в поліакриламідному гелі. М — маркери молекулярної маси (кДа)

при проведенні як електрофорезу, так і спектрофотометричним методом (табл. 2).

Електрофорез гідролізу фібрину (рис. 1, в) свідчить, що СКР шести із восьми досліджуваних штамів майже в однаковій ступені володіли фібринолітичною активністю. *Priestia megaterium* 116 слабо розщеплював, а *Bacillus* sp. Мусо зовсім не розщеплював фібрин. Ці результати були підтверджені також ензим-електрофорезом (рис. 1, з).

Що стосується гідролізу колагену (рис. 1, д, е), то найвищу активність проявили СКР *Bacillus subtilis* 1, *Bacillus atrophaeus* 08, *Bacillus licheniformis* 249, незначну — *Priestia megaterium* 035, *Priestia megaterium* 116. СКР *Bacillus* sp. Мусо майже не проявляв колагеназну активність. Аналогічні дані одержані як електрофорезом, так і ензим-електрофорезом.

Оскільки СКР *Bacillus subtilis* 248 і *Bacillus subtilis* 231 виявили найвищу фібриногенолітичну активність, нами були отримані частково очищені ензимні препарати цих культур, на яких досліджені такі властивості, як рН-, термооптимум та субстратна специфічність.

Встановлено, що комплексний ензимний препарат *Bacillus subtilis* 231 має 2 оптимуми рН як фібрин(оген)олітичної (9,0 і 11,0), так і колагеназної (7,0 і 11,0) активностей (рис 2, а).

Для комплексного ензимного препарату *B. subtilis* 248 оптимальною для фібрин(оген)олітичної активності була рН 9,0, в той час як для колагеназної активності рН оптимум складав 7,0—8,0 (рис. 2, б).

Встановлено, що комплексний ензимний препарат *B. subtilis* 231 активний в інтервалі температур від 4 до 55 °С (рис. 3, а). Оптимум фібрин(оген)олітичної складав 37 °С. Тоді як для колагеназної активності відмічали 2 оптимуми за температури 15 і 50 °С.

Комплексний ензимний препарат *B. subtilis* 248 характеризувався термооптимумом для колагеназної активності за температури 50 °С, тоді як для фібриногенолітичної активності встановлено термооптимум за температури 4—20 °С, а для фібринолітичною — 15—20 °С (рис. 3, б).

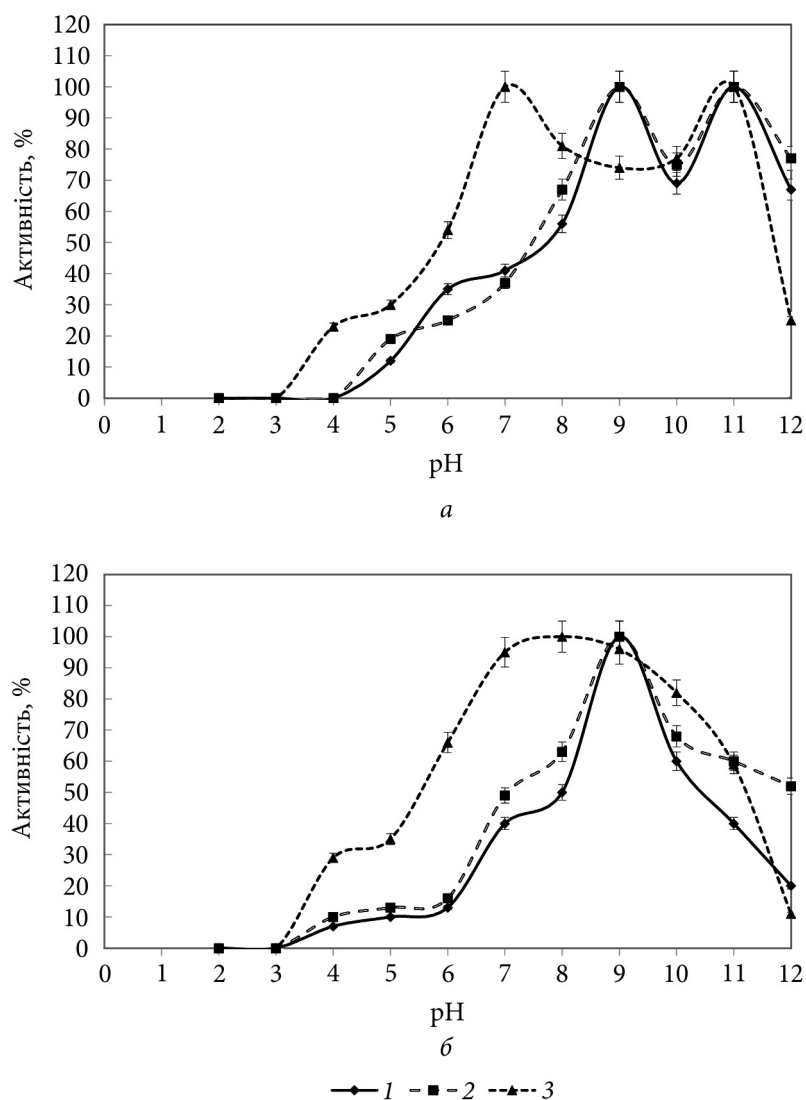
Вивчення субстратної специфічності комплексних ензимних препаратів *B. subtilis* 231 та *B. subtilis* 248 показало, що вони гідролізують всі досліджені білкові субстрати, але в різній ступені (табл. 3). Найбільш активно вони гідролізували фібриноген і фібрин.

За субстратною специфічністю обидва штами проявляють однакову закономірність. Найвища питома активність препарату *Bacillus subtilis* 231 виявлена щодо фібриногену та фібрину (відповідно 55,00 та 45,00 од/мг білка), і незначна до казеїну та колагену (відповідно 0,12 та 0,09 од/мг білка).

Для комплексного ензимного препарату *B. subtilis* 248 найвища питома активність відмічалася щодо фібриногену та фібрину (80,00 та 55,00 од/мг білка відповідно), і незначна до колагену та казеїну (відповідно 0,33 та 0,14 од/мг білка).

Дослідження здатності частково очищених комплексних препаратів ензимів гідролізувати фібриноген (рис. 4) свідчать, що при інкубації фіб-





**Рис.2.** рН оптимум дії комплексних ферментних препаратів *B. subtilis* 231 (а) і *B. subtilis* 248 (б): 1 – фібринолітична, 2 – фібриногенолітична, 3 – колагеназна активності

риногену з ензимом *Bacillus subtilis* 231 відбувається гідроліз його А $\alpha$  та В $\beta$  ланцюгів, в той час як інкубація з ензимом *Bacillus subtilis* 248 призводила до гідролізу всіх ланцюгів фібриногену: А $\alpha$ , В $\beta$  та  $\gamma$ . Отримані дані підтверджуються ензим-електрофорезом, оскільки зона дії на фібриноген очищеного комплексного препарату ензимів *Bacillus subtilis* 248 значно більша, ніж *Bacillus subtilis* 231.

Таким чином, морські штами *Bacillus subtilis* 231 і 248 можна вважати перспективними для подальших наукових досліджень як продуцентів протеаз з фібрин(оген)олітичною активністю.

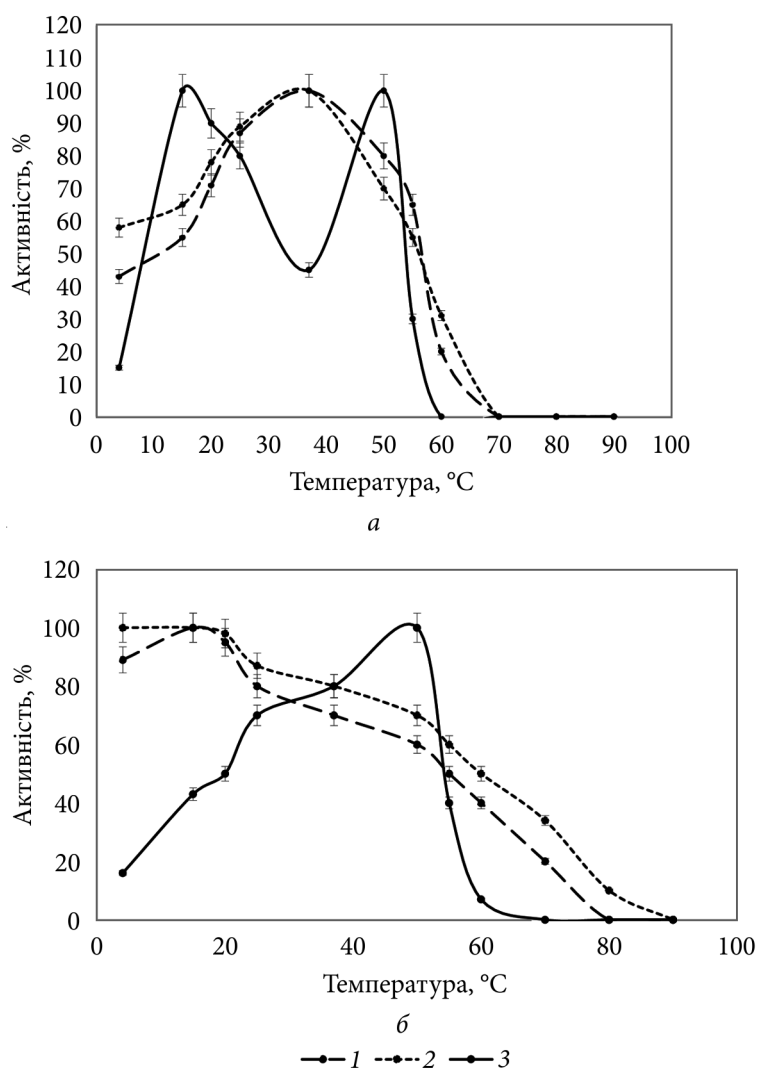


Рис. 3. Термооптимум дії комплексних ферментних препаратів *B. subtilis* 231 (а) і *B. subtilis* 248 (б)

### Обговорення результатів досліджень

В результаті проведених досліджень встановлено, що два із восьми досліджених штамів бактерій, виділених із глибоководних відкладень Чорного моря, *B. subtilis* 248 та *Bacillus subtilis* 231, є перспективними для їх подальших досліджень як продуцентів фібрин(оген)огеназ. Здатність супернатантів їх культуральних рідин та частково очищених ензимів гідролізувати фібрин та фібриноген показано рядом методів, зокрема спектрофотометричним [7] та ензим-електрофоретичним. На основі характеру деградації фібриногену можна сказати, що в СКР *Bacillus subtilis* 248

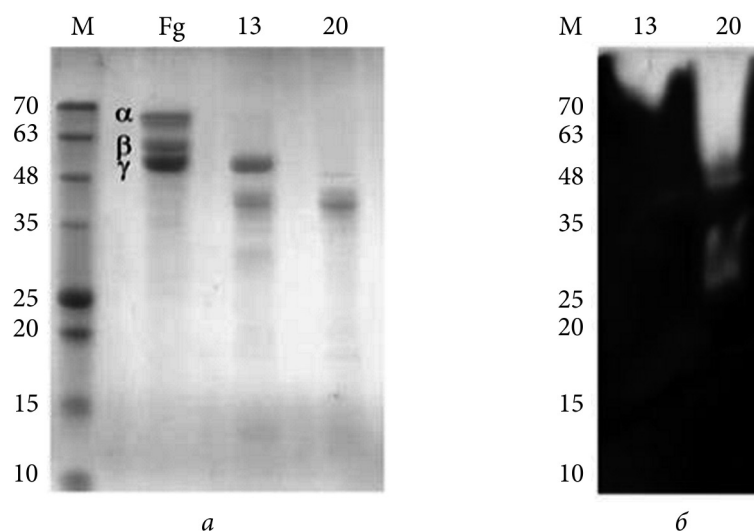
Таблиця 3

Субстратна специфічність комплексних ензимних препаратів *Bacillus subtilis* 231 та *Bacillus subtilis* 248

Субстрат	Питома активність, од/мг білка	
	<i>Bacillus subtilis</i> 231	<i>Bacillus subtilis</i> 248
Фібрин	45,00	55,00
Фібриноген	55,00	80,00
Колаген	0,09	0,33
Казеїн	0,12	0,14

присутня  $\alpha/\beta/\gamma$ -фібриногеназна активність, в той час як в СКР *Bacillus subtilis* 231 — тільки  $\alpha/\beta$ -фібриногеназна активність. Що стосується фібрину, то СКР обох штамів розщеплювали тільки  $\alpha$ -ланцюги фібрину.

Дослідження фізико-хімічних властивостей частково очищених ензимних препаратів показали, що фібрин(оген)олітична активність *B. subtilis* 248 має рН оптимум 9,0, а термооптимум фібриногенолітичної активності — 4—20 °С, в той час як фібринолітичною — 15—20 °С. Частково очищений ензимний препарат *B. subtilis* 231 має два рН оптимума фібрин(оген)олітичної активності 7,0 та 11,0, а термооптимум — 37 °С.



**Рис. 4.** Електрофореграма фібриногену (а) та фібриногенолітична ензімограма (б) гідролізованого фібриногену частково очищеними комплексними препаратами ензимів *Bacillus subtilis* 231 (13) та *Bacillus subtilis* 248 (20). М — маркери молекулярної маси(кДа); Fg — нативний фібриноген. Зразки приготовано за наявності 0.2%  $\beta$ -меркаптоетанолу

За цими показниками досліджені нами ензимні препарати відрізняються від одержаних дослідниками раніше [22] даних щодо оптимальних умов дії фібринолітичної протеази *Bacillus velezensis* Z01, виділеної з морського мулу Південно-Китайського моря, рН оптимум дії якої склав 7,0, а термооптимум 40 °С, що відповідає фізіологічному середовищу тіла людини. Аналогічні дані були одержані авторами для фібринолітичних ензимів, ізольованих із морських видів *Streptomyces radiopugnans* VITSD8 [10] та *Serratia marcescens* [16].

Що стосується колагеназної активності ензимів, то показано, що оптимуми їх дії склали: рН 7,0—8,0 і температура 50 °С для *B. subtilis* 248 і рН 9,0 та 11,0 (два оптимума) і температура 15 і 50 °С (два оптимума) для *B. subtilis* 231.

Дослідження колагенолітичних ензимів морських бактерій на сьогодні незначні і попередні. Повідомлялося про деякі морські бактерії, що продукують колагенолітичні ензими. Так, автори [13] показали, що протеаза з колагенолітичною активністю, виділена з *Pseudoalteromonas* sp. SM9913, є лужною, термооптимум якої 60 °С, але ензим здатний зберігати 12,4 % найвищої активності при 0 °С. Дослідження іншого штаму *Pseudoalteromonas* sp. SJN2 [23], ізольованого з прибережної зони Південно-Китайського моря, свідчить, що ця колагеназа проявляла оптимум активності при рН 8,5 і температурі 32 °С. Автори показали, що колагеназа *Pseudoalteromonas* sp. SJN2 ефективно гідролізувала морський колаген, особливо із риб'ячої кістки іспанської скумбрії та риб'ячої луски морського ляща.

Частково очищені ензимні препарати досліджених нами культур *B. subtilis* 248 і *B. subtilis* 231 проявляли високу субстратну специфічність як до фібрину, так і до фібриногену, причому до останнього вона була більш високою. Здатність цих ензимних препаратів гідролізувати фібриноген була підтверджена даними електрофорезу.

Результати проведених досліджень дозволяють нам припустити, що для подальших досліджень перспективним є *B. subtilis* 248, частково очищений ензимний препарат якого проявляв термооптимум фібринолітичної активності при 4—20 °С. Застосування холодоактивних протеаз в останні роки привертає все більшу увагу дослідників, оскільки такі ензими характеризуються такими перевагами як збереження високої каталітичної ефективності за низьких температур та незначними витратами енергії під час їх виробництва. Однак можливість їх застосування ще не повністю розроблена, що обмежує просування та застосування адаптованих до холоду протеаз у різних галузях промисловості і медицини.

Обидва досліджених нами морські штами бацил є перспективними також як тромболітичні агенти, які можуть бути використані у майбутньому. В розробці та вдосконаленні тромболітичних засобів використовується нова тенденція, яка полягає в посиленні їх фібрин-специфічності та ефективності зв'язування, що було встановлено нами при електрофоретичному дослідженні ензимів двох культур, як *B. subtilis* 248, так і *B. subtilis* 231.

Унікальна специфічність фібриногенолітичних ензимів дозволяє отримувати за їх допомогою нефізіологічні фрагменти молекули фібриногену, які за своїми властивостями відрізняються від фізіологічних продуктів плазмінового гідролізу. Вивчаючи функціонування окремих фрагментів молекули можна зробити висновок щодо значення окремих її ділянок у протеїн-протеїнових та протеїн-клітинних взаємодіях.

### Висновки

Протеази морських бактерій відіграють важливу роль у гідробіологічних процесах. Дослідження цих ферментів необхідні для кращого розуміння динаміки водних екосистем та розробки нових біотехнологічних продуктів.

Показана здатність екзопротеаз супернатантів культуральних рідин бактерій, виділених із донних осадів Чорного моря, гідролізувати фібрин, фібриноген та колаген. Встановлено, що два із восьми досліджених штамів бактерій, а саме *Bacillus subtilis* 248 та *Bacillus subtilis* 231, є перспективними для їх подальших досліджень як продуцентів фібрин(оген)огеназ. Вивчення фізико-хімічних властивостей частково очищених препаратів ензимів цих штамів показало, що препарати *Bacillus subtilis* 248 і *Bacillus subtilis* 231 відрізняються за фізико-хімічними властивостями, зокрема рН та термооптимумом. Так, фібрин(оген)олітична активність *B. subtilis* 248 має рН оптимум 9,0, а термооптимум фібриногенолітичної активності — 4—20 °С, в той час як фібринолітичної — 15—20 °С. Частково очищений ензимний препарат *B. subtilis* 231 має два рН оптимума фібрин(оген)олітичної активності — 7,0 та 11,0, а термооптимум — 37 °С. Показана здатність частково очищеного комплексного препарату ензиму *Bacillus subtilis* 231 гідролізувати тільки А $\alpha$  та В $\beta$  ланцюги фібриногену, в той час як ензимний препарат *Bacillus subtilis* 248 гідролізував всі 3 ланцюги фібриногену: А $\alpha$ , В $\beta$  та  $\gamma$ . Вивчення субстратної специфічності свідчить, що *Bacillus subtilis* 248 та *Bacillus subtilis* 231 можуть бути перспективними для подальших наукових досліджень як продуценти протеаз з фібрин(оген)азною активністю.

### Список використаної літератури

1. Варбанець Л.Д., Мацелюх Е.В. Пептидазы микроорганизмов и методы их исследования. Киев : Наук. думка, 2014. 323 с.
2. Гудзенко О.В., Штеніков М. Д., Варбанець Л.Д., Іваниця В.О. Вплив температури культивування на активність протеолітичних ензимів бактерій, виділених з глибоководних відкладів Чорного моря. *Гідробіол. журн.* 2024. Т. 60, № 2. С. 108—118.
3. Іваниця В.О., Штеніков М.Д., Остапчук А.М. Факультативно-анаеробні спороутворюючі бактерії глибоководних відкладень Чорного моря. *Мікробіологія та біотехнологія.* 2017. Т. 40, № 4. С. 94—103.
4. Abdul R.P., Rengaswamy D. Fibrinolytic enzyme — an overview. *Curr Pharm. Biotechnol.* 2022. Vol. 23, N 11. P. 1336—1345.
5. Baggio L.M., Panagio L.A., Gasparin F.G. et al. Production of fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes by a strain of *Penicillium* sp. isolated from contaminated soil with industrial effluent. *Acta Scientiarum. Health Sciences.* 2019. Vol. 41, N 1, e40606. <https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v41i1.40606>

6. Barzkar N., Jahromi S.T., Vianello F. Marine microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, biochemical properties and thrombolytic activity. *Mar. Drugs*. 2022. Vol. 20, N 1. P. 46. doi: 10.3390/md20010046.
7. Chernyshenko V., Platonova T., Makogonenko Y. et al. Fibrin(ogen)olytic and platelet modulating activity of a novel protease from the *Echis multisquamatis* snake venom. *Biochimie*. 2014. N 105. P. 76—83.
8. Chernyshenko V., Shteinberg K., Lugovska N. Preparation of highly-concentrated autologous platelet-rich plasma for biomedical use. *Ukr. Biochem. J.* 2019. Vol. 91, N 2. P. 19—27.
9. Dimassi S.N., Hahladakis J.N., Yahia M.D. et al. Degradation-fragmentation of marine plastic waste and their environmental implications: A critical review. *Arab. J. Chem.* 2022. Vol. 15, Iss. 11. P. 104262.
10. Dhamodharan D., Naine J.S., Keziah M.S., Devi S.C. Novel fibrinolytic protease producing *Streptomyces radiopugnans* VITSD8 from marine sponges. *Mar. Drugs*. 2019, N 17. P. 164.
11. Fuhrman J., Cram J., Needham D. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. Vol. 15, N 13. P. 133—146.
12. Gudzenko O.V., Ivanytsia V.O., Varbanets L.D. Bacteria of the Black Sea are producers of proteolytic enzymes. *Microbiol. J.* 2022. Vol. 84, N 3. P. 3—8.
13. Guo-Yan Zhao, Xiu-Lan Chen, Hui-Lin Zhao et al. Hydrolysis of insoluble collagen by disease MCP-01 from deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, N 52. P. 36100—36107.
14. Homaei A. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *Intern. J. Biol. Macromolecules*. 2016. N 88, P. 542—552.
15. Korolova D., Syrko M., Stohnii Ye. et al. Standardization of the protein calibrators isolation methodology for thrombophilia markers detecting immunodiagnostic test systems. *Biotechnologia Acta*. 2019. Vol. 12, N 6. P. 34—45.
16. Krishnamurthy A., Belur P.D. A novel fibrinolytic serine metalloprotease from the marine *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis*: Purification and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. N 112. P. 110—118.
17. Laemli R.V. Cleavage of structural proteins during of bacteriophage. *Nature*. 1970. Vol. 4, N 227. P. 680—685.
18. Mandl I., Zipper H., Ferguson L.T. *Clostridium histolyticum* collagenase: its purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 1958. Vol. 74, N 3. P. 465—475.
19. Ostapchenko L., Savchuk O., Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2011. N 2. P. 20—26.
20. Shaaban K.A. Marine microbial diversity as source of bioactive compounds. *Mar. Drugs*. 2022. Vol. 20, N 5. P. 304.
21. Stohnii Y.M., Yatsenko T.A., Nikulina V.V. Functional properties of individual sub-domains of the fibrin(ogen)  $\alpha$ C-domains. *BBA Adv.* 2023. Vol. 5, N 3. P. 100072.
22. Udovenko A., Makogonenko Y., Korolova D. et al. Formation and elimination of soluble fibrin and D-dimer in the bloodstream. *Croat. Med. J.* 2023. Vol. 364, N 6. P. 421—429.
23. Xinghao Yang, Xiao Xiao, Dan Liu et al. Optimization of collagenase production by *Pseudoalteromonas* sp. SJN2 and application of collagenases in the preparation of antioxidative hydrolysates. *Marine Drugs*. 2017. Vol. 15, N 12. P. 377.

Надійшла 26.03.2024

O.V. Gudzenko, PhD (Biol.), Senior Researcher, Senior Researcher,  
Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,  
Academician Zabolotny St., 154, Kyiv, 03143, Ukraine  
e-mail: alena.gudzenko81@gmail.com  
ORCID 0000-0002-6103-6109

Y.M. Stohnii, PhD (Biol.), Researcher,  
Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine,  
Leontovicha St., 9, Kyiv, 01054, Ukraine  
e-mail: stogniyevgen@gmail.com  
ORCID 0000-0002-1235-8400

L.D. Varbanets, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Head of Department,  
Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
Academician Zabolotny St., 154, Kyiv, 03143, Ukraine  
e-mail: varbanets\_imv@ukr.net  
ORCID 0009-0000-1172-4088

V.O. Chernyshenko, Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Deputy Director of the Palladin  
Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine,  
Leontovicha St., 9, Kyiv, 01054, Ukraine  
e-mail: bio.cherv@gmail.com  
ORCID 0000-0002-6564-8823

V.O. Ivanytsia, Dr. Sci. (Biol.), Prof., NAS Corresp. member, Vice-Rector,  
Mechnikov Odesa National University,  
Dvoryanska St., 2, Odesa, 65029, Ukraine  
e-mail: v\_ivanit@ukr.net  
ORCID 0000-0001-5325-3800

#### THE ABILITY OF THE BLACK SEA BACTERIA TO HYDROLYZE FIBRIN, FIBRINOGEN AND COLLAGEN

Active producers were selected as a result of studies on the ability of exoproteases of supernatants of culture liquids of bacteria isolated from bottom sediments of the Black Sea to hydrolyze fibrin, fibrinogen, and collagen. It was shown that partially purified enzyme preparations of *Bacillus subtilis* 248 and *Bacillus subtilis* 231 differed in physicochemical properties. Thus, the fibrin(ogen)olytic activity of *B. subtilis* 248 has a pH optimum of 9.0, and the thermooptimum of fibrinogenolytic activity is 4–20 °C, while that of fibrinolytic activity is 15–20 °C. The partially purified enzyme preparation *B. subtilis* 231 has two pH optimums of fibrin(ogen)olytic activity — 7.0 and 11.0, and the thermooptimum — 37 °C. It was established that *Bacillus subtilis* 248 and *Bacillus subtilis* 231 may be promising for further scientific research as producers of proteases with  $\alpha/\beta/\gamma$ -fibrinogenase and  $\alpha/\beta$ -fibrinase activity.

**Keywords:** *enzymes of marine microorganisms, exoproteases, fibrinolytic, fibrinogenolytic, collagenase activity.*