

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

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. 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

ЕЛАСТАЗНА АКТИВНІСТЬ *BACILLUS LICHENIFORMIS* IMB B-8008, ВИДІЛЕНОГО З ДОННИХ ОСАДІВ ЧОРНОГО МОРЯ

Встановлено, що *Bacillus licheniformis* IMB B-8008, ізольований з донних осадів Чорного моря, синтезує протеазу, яка проявляє високу еластазну активність, починаючи з третьої доби культивування. Показано, що суттєвий вплив на активність досліджуваного ензима має температура вирощування та аерація. Очищений ензимний препарат має рН-оптимум 8,0 і термооптимум 37 °С. Його молекулярна маса становить близько 18 кДа, питома активність — 1500 од/мг білка.

Ключові слова: *Bacillus licheniformis*, ізольований з донних осадів Чорного моря, еластазна активність, рН-оптимум, термооптимум, молекулярна маса, питома активність.

На сьогодні більшість промислових ензимів отримують від продуцентів з наземних джерел, тоді як морське середовище, яке охоплює близько 71 відсотка земної поверхні та є величезним ресурсом корисних ензимів, залишається невивченим. З появою біотехнології, ензимної інженерії та запровадженням інших інноваційних технологій з'явилися можливості для ефективного управління багатим морським мікробним біорізноманіттям для отримання нових ензимів, які можна було б ефективно використовувати не лише як економічно ефективні біокатализатори,

Ц и т у в а н н я: Гудзенко О.В., Варбанець Л.Д., Іваниця В.О. Еластазна активність *Bacillus licheniformis* IMB B-8008, виділеного з донних осадів Чорного моря. *Гідробіол. журн.* 2024. Т. 60. № 6. С. 94—106.

але й також як екологічно чисті реагенти. Серед ензимів увагу дослідників привертають такі, які здатні деградувати нерозчинні протеїни, зокрема еластин, який існує в позаклітинному матриксі та сполучних тканинах. Він зшитий неполярними амінокислотними залишками, такими як аланін, лейцин та ізолейцин, і поєднується з мікрофібрилами для утворення еластичних волокон *in vivo* [5, 6]. Еластаза є ендопептидазою, яка здатна гідролізувати нерозчинний еластин набагато ефективніше, ніж інші протеази. Еластази, які ізольовані з морських продуцентів, відносяться до екологічно чистих ензимів, які можна використовувати в різних промислових і фармацевтичних цілях. Вони широко застосовуються в харчовій промисловості, медицині та хімічній промисловості [5, 7, 10, 11, 13, 16, 17]. Крім того, еластази, які іммобілізовані на пов'язці, використовують для лікування різних захворювань, серед них карбункули, пошкодження шкіри, фурункули та опіки [17].

Раніше [12] в результаті скринінгу бактерій, виділених із донних осадів Чорного моря, нами був відібраний штам *Bacillus licheniformis* IMB B-8008, який проявляє високу активність по відношенню до еластину. Тому метою даної роботи було дослідити деякі параметри його культивування, а також отримати очищений ензимний препарат і дослідити його фізико-хімічні властивості.

Матеріал і методика досліджень

Об'єктом дослідження був штам *Bacillus licheniformis* IMB B-8008, ізольований з донних осадів Чорного моря. Для дослідження динаміки еластазної активності та її накопичення в якості базового використовували середовище такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 1,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,75, $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ — 0,25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5, мальтоза — 1,0, желатин — 10,0, дріжджовий автолізат — 0,15, pH 7,0.

Культуру *B. licheniformis* IMB B-8008 вирощували у глибинних умовах за температури 28 °C у колбах Ерленмейєра (750 мл), які містили 100 мл живильного середовища. Біомасу відділяли центрифугуванням при 5000 g протягом 45 хв, після чого в супернатанті культуральної рідини визначали протеолітичну активність. Для одержання очищеного ензиму до супернатанта культуральної рідини додавали суху сіль сульфату амонію до кінцевої концентрації 90 % насичення. Суміш витримували 12—16 год за температури 4 °C і центрифугували в тих самих умовах. Осад збирали і розчиняли у трикратному об'ємі 3 M сульфату амонію. Для подальшої очистки було використано методи гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії. Гель-фільтрацію проводили на колонці (2,5×90 см) з нейтральним TSK-гелем — Toyopearl HW-55 фірми «Toyo Soda», Японія, урівноважений 0,01 M Трис-НСl буфером, pH 7,8. Осад, отриманий в результаті фракціонування сульфатом амонію, розчиняли в 1,5 об'ємах 0,01 M Трис-НСl pH 7,8. Зразок наносили на колонку, елюювали тим самим буфером зі швидкістю 90 мл/год. Фракції, що містили еластазну активність, збирали, об'єднували та концентрували (\approx у 5 разів) упарюванням під вакуумом. Отримані зразки наносили на колонку (3×35 см) з Fractogel

DEAE-650-м «Merck», Німеччина, урівноважену 0,01 М Трис-НСІ буфером рН 7,8. Елюцію проводили в лінійному градієнті NaCl (0—1 М, по 200 мл) зі швидкістю 24 мл/год.

Еластазну активність визначали колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ензиматичному гідролізі еластину, забарвленого конго червоним [1]. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 515 нм. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз 1 мг еластину за 1 хв.

Вміст білка на всіх етапах дослідження реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 280 нм. Його кількість визначали за методом [1]. Інтенсивність забарвлення проб вимірювали при довжині хвилі 750 нм. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Визначення молекулярної маси ензиму у нативній системі проводили за допомогою гель-фільтрації на колонці (1,3×50 см) з Sepharose 6В. Вільний об'єм колонки, який був встановлений із застосуванням блакитного декстрану 2000, становив 20 мл. Колонку було урівноважено 0,01 М Трис-НСІ буфером, рН 7,8. На колонку наносили 1 мл розчину ензиму (10 мг), збільшивши попередню густину розчину додаванням сахарози в кінцевій концентрації 0,5 М. Елюцію проводили тим самим буфером з 0,1 М NaCl. Швидкість елюції — 0,3 мл/хв. Калібрувальну криву для розрахунку молекулярної маси будували за допомогою білків-маркерів фірми «Pharmacia» (Швеція): рибонуклеази (13,7 кДа), протеїнази К (25,0 кДа), овальбуміну курячого (43,0 кДа), бичачого сироваткового альбуміну (67,0 кДа).

Дослідження впливу температури та рН середовища проводили в інтервалі температур від 4 до 70 °С та рН від 2,0 до 12,0, останній створювали 0,01М універсальним фосфатним буфером (УФБ).

Термостабільність препаратів визначали за температури 37 °С (експозиція 90 хв), рН-стабільність — при показниках рН середовища 7,0, 8,0 та 9,0 (експозиція 120 хв). Після вичерпання часу дії на ензим відповідного фактору відбирали аліквоти по 0,5 мл і визначали активність, як описано вище.

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

Результати досліджень

Вивчення в динаміці культивування *Bacillus licheniformis* ІМВ В-8008 позаклітинної еластазної активності показало (рис. 1), що максимальне значення відмічається вже на третю — п'яту добу. Починаючи з шостої доби вирощування реєстрували значне зниження еластазної активності.

Суттєвий вплив на активність ензимів мають параметри культивування продуцентів, зокрема температура та аерація. Найбільшу еластазну

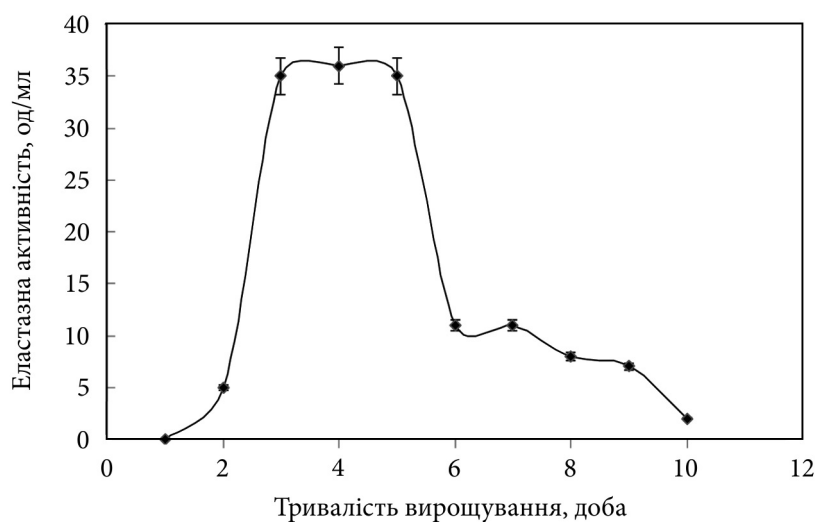


Рис. 1. Еластазна активність в динаміці вирощування *Bacillus licheniformis* IMB B-8008

активність в супернатанті культуральної рідини *B. licheniformis* IMB B-8008 відмічено за температури 28 °С (табл. 1). При дослідженні впливу інтенсивності аерації на еластазну активність встановлено, що більші об'єми живильного середовища в колбах, які знижують швидкість розчи-

Таблиця 1

Вплив параметрів культивування *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 на еластазну активність

Параметри культивування		Еластазна активність, од/мл
Температура, °С	15	5,5±0,05
	25	28,7±0,93
	28	35,0±0,20
	37	18,9±0,10
	42	8,1±0,10
Об'єм середовища, мл	50	33,8±0,50
	100	35,0±0,70
	150	27,1±0,12
	200	17,5±0,13
	250	7,0±0,05
Швидкість перемішування, об/хв	201	10,1±0,05
	212	26,3±0,15
	230	35,0±0,25

нення кисню, сприяють суттєвому зниженню активності. Максимальний рівень еластазної активності зафіксовано при культивуванні в колбах з 100 мл живильного середовища.

При дослідженні впливу швидкості перемішування найвищу активність відмічали при вирощуванні за 230 об/хв. При зменшенні швидкості перемішування відбувається суттєве зниження еластазної активності.

Для виділення та очистки еластази *B. licheniformis* IMB B-8008 використовували класичні для фракціонування білків методи: висолювання сульфатом амонію, гель-фільтрацію та іонообмінну хроматографію. Результати очистки ензиму наведено в таблиці 2.

При фракціонуванні сульфатом амонію еластазна активність майже не змінилась. Значне підвищення активності було досягнуто в результаті гель-фільтрації 90 % висолу сульфатом амонію на TSK-HW-55 і отримано фракцію (рис. 2, див. табл. 2), в якій еластазна активність становила 700 од/мг білка, що в 10 разів вище порівняно з вихідною активністю.

Подальша очистка еластази іонообмінною хроматографією на Fractogel DEAE-TSK-650M з використанням градієнту NaCl (0-1 М) (рис. 3, див. табл. 2) призвела до значного підвищення питомої активності порівняно з вихідною (в 21,43 раза).

Отже, із супернатанту культуральної рідини *B. licheniformis* IMB B-8008 було виділено протеазу з еластазною активністю, вихід якої після очистки становив 16 %, а питома активність становила 1500 од/мг білка (див. табл. 2).

Гомогенність виділеного препарату з еластазною активністю було підтверджено гель-фільтрацією на колонці з Sepharose 6B і встановлено його молекулярну масу, яка становила близько 18 кДа (рис. 4).

Таблиця 2

Основні етапи очистки ензимного препарату *Bacillus licheniformis* IMB B-8008

Стадії очистки	Загальний вміст білка, мг	Загальна активність, од/мл	Вихід, %	Питома активність, од/мг білка	Ступінь очистки
Супернатант культуральної рідини	2500	175 000	100	70	—
Осадження 90 % сульфатом амонію	1220	92 025	48,8	75	1,07
Гель-фільтрація на Toyopearl HW-60	70	49 000	30	700	10,00
Аніонообмінна хроматографія на Fractogel DEAE-650M	28	42 000	16	1500	21,43

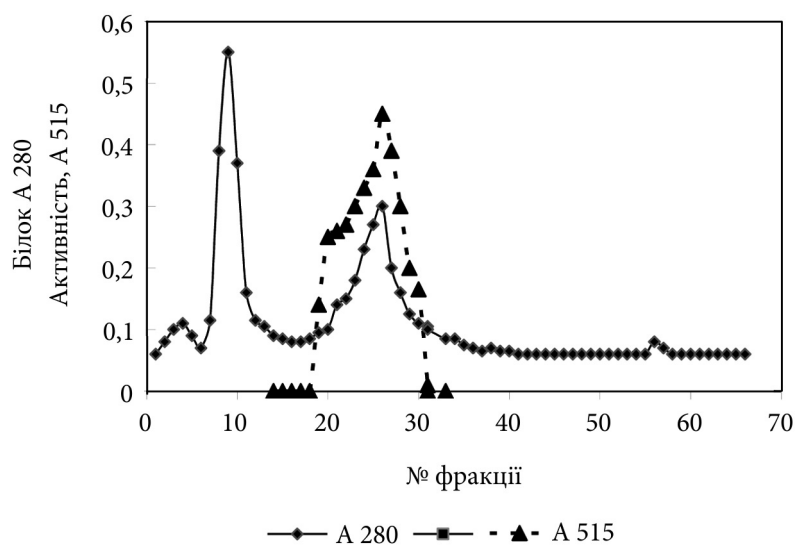


Рис. 2. Профіль елюції на TSK-HW-55 ензимного препарату *Bacillus licheniformis* IMB B-8008

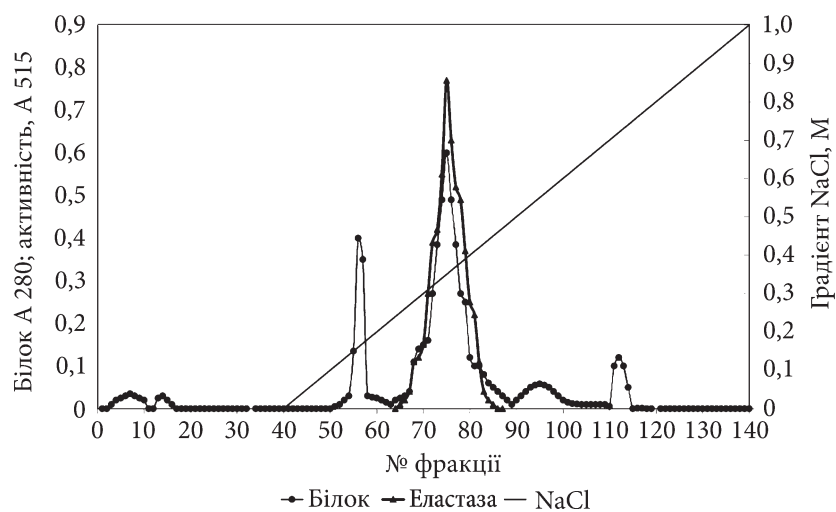


Рис. 3. Профіль елюції ензимного препарату *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 на Frac-togel DEAE-650M в градієнті NaCl (0—1 М)

Важливою характеристикою будь-яких ензимних препаратів є оптимальні параметри їх дії, зокрема рН і температура. Показано (рис. 5, а), що очищений ензимний препарат *B. licheniformis* IMB B-8008 активний в досить широкому інтервалі рН від 4,0 до 11,0, з оптимумом при 8,0, а також в діапазоні температур від 4 до 60 °С, з термооптимумом при 37 °С (рис. 5, б). Еластаза нестабільна при високих температурах (рис. 6, а). Показано, що за температур, які вищі за 50 °С, активність стрімко падає. Так,

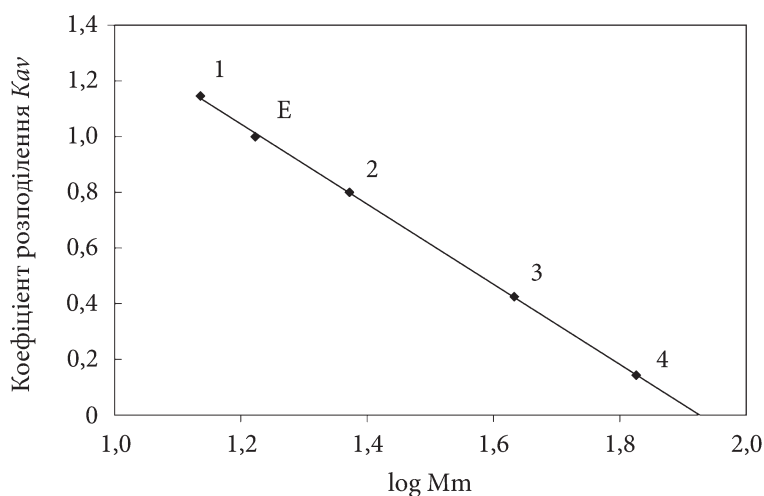


Рис. 4. Молекулярна маса еластази *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 у нативній системі. Маркери молекулярних мас: рибонуклеаза (13,7 кДа) (1), протейназа К (25 кДа) (2), овальбумін (43 кДа) (3), бичачий сироватковий альбумін (67 кДа) (4), Е — ензимний препарат *Bacillus licheniformis* IMB B-8008

вже за через 30 хв інкубації за температури 50 °С еластазна активність знижувалась на 63%, а за температури 60 °С в цих умовах – на 75%. При інкубації досліджуваного ензиму за температури 70 °С еластазна активність знижувалась на 90 % вже через 15 хв. Вивчення рН-стабільності показало (рис. 6, б), що ензим при температурі 30 °С і рН 7,0 та 8,0 на 100 %, при рН 9,0 (на 95—98 %) зберігає активність протягом 90 хв.

Таким чином, з'ясовано, що *B. licheniformis* IMB B-8008 синтезує пептидазу, яка проявляє високу еластазну активність, починаючи з третьої доби культивування. Встановлено, що параметри культивування суттєво впливають на активність досліджуваного ензиму, зокрема температура вирощування та аерація. Визначено молекулярну масу отриманого очищеного ензимного препарату, яка становить близько 18 кДа. Температура 37 °С і рН 8,0 є оптимальними для гідролізу еластину *B.licheniformis* IMB B-8008.

Обговорення результатів досліджень

Морське середовище – це одна з найрізноманітніших екосистем на Землі, де мешкають мільйони видів бактерій. Останні виробляють широкий спектр ферментів, багато з яких є унікальними і не виявляються в наземному середовищі. Деякі з цих ензимів мають екстремальні властивості, такі як термостабільність, холодостійкість, або стійкість до високих концентрацій солі. Морські бактерії відіграють важливу роль у розкладанні органічних речовин, кругообігу поживних речовин та біогеохімічних процесах в океані. Їхні ферменти беруть участь у таких процесах, як розщеплення білків, мінералізація органічних речовин, детоксикація забруднювачів. Тому вони виступають індикаторами екологічного стану.

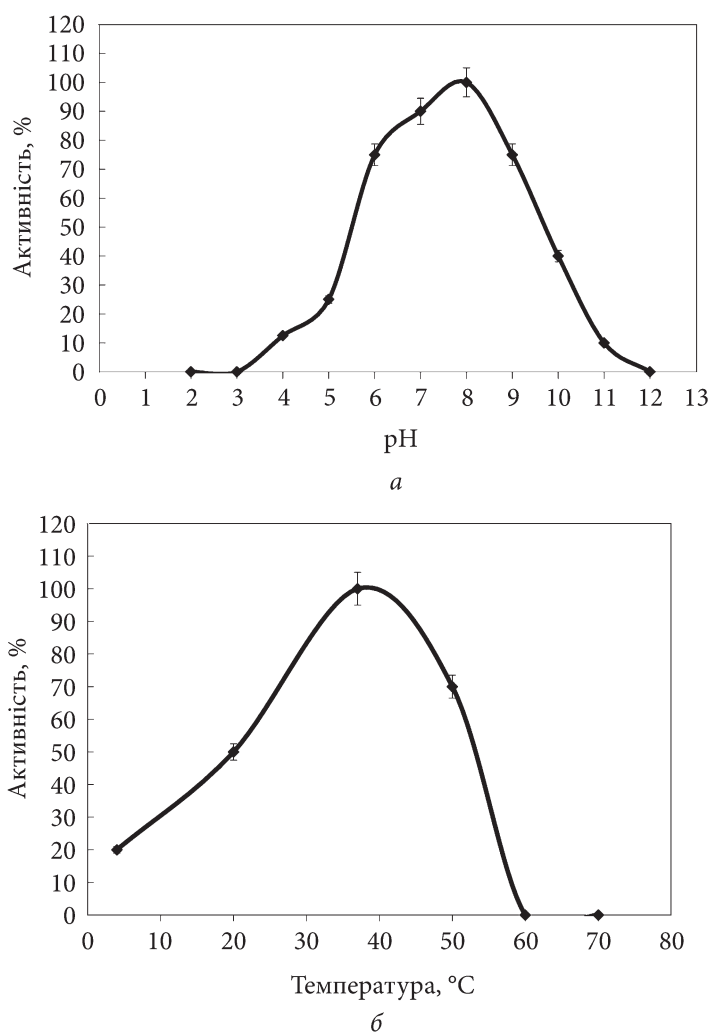
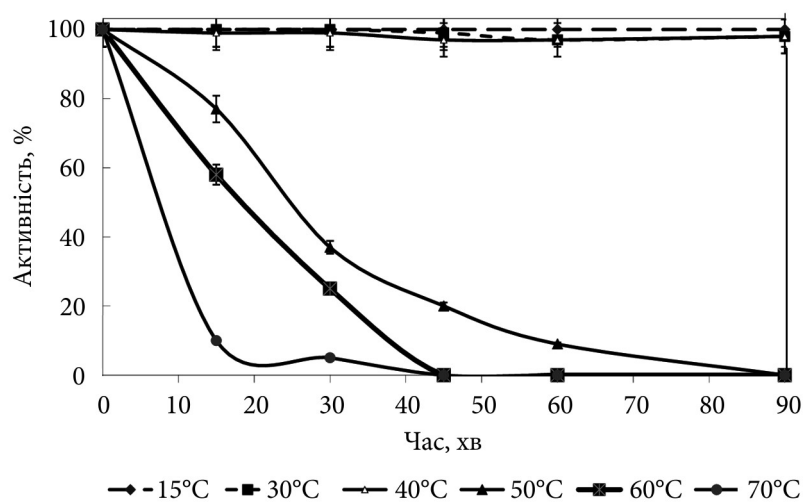


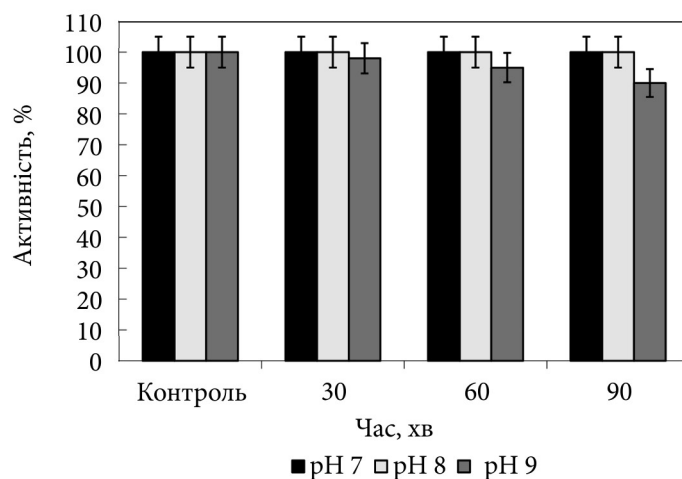
Рис. 5. pH-оптимум (а) та термооптимум (б) дії еластази *Bacillus licheniformis* IMB B-8008

Ферменти з морських бактерій мають широкий спектр застосувань у біотехнології: розробка нових ферментних препаратів для харчової, фармацевтичної та косметичної промисловості, біоремедіація забрудненого середовища, виробництво біопалива та ін.. Проте, незважаючи на комерційну привабливість та медичну необхідність, залишаються нез'ясованими деякі біохімічні аспекти цих бактерій.

Інтерес до еластолітичних ензимів, що спостерігається в останні десятиліття, викликаний передусім їхньою активною участю у розвитку різних захворювань запального ґенезу і високою клініко-діагностичною інформативністю визначення цих протеаз при багатьох патологічних станах. Це значною мірою пояснюється високою каталітичною активністю еластаз і широким спектром протеїнів, які піддаються протеолізу і



a



б

Рис. 6. Термостабільність (а) та рН-стабільність (б) еластази *Bacillus licheniformis* ІМВ В-8008

втрачають свої біологічні властивості під дією цих ензимів. Одним з підходів для отримання еластаз із бажаними характеристиками є скринінг бактерій з еластолітичною активністю. Однак існують певні труднощі при виділенні бактерій, адаптованих до росту в середовищі з високими концентраціями солей, в умовах екстремального тиску, рН, температури [3, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18]. Тому у світовій літературі досить обмежені дані стосовно продуцентів з еластазною активністю, виділених із морського середовища. Відомо, що морські екосистеми є природним середовищем для таких патогенів людини і тварин, як бактерії родів *Aero-*

monas та *Vibrio*. Автори [9] дослідили 34 морські штами *Vibrio alginolyticus*, які вирощували протягом 18—24 год при 37 °С на середовищі з лужним пептоном і 1—3 % NaCl і встановили, що вони проявляють еластазну, колагеназну та хондроїтиназну активність. Ці ензими відповідають за прояв вірулентності досліджуваних штамів, які є причиною дерматологічних інфекцій людини, тому пошук непатогенних для людини продуцентів з еластазною активністю є актуальним завданням дослідників. Так, з морського штаму *Bacillus pumilis* одержано термолабільний еластолітичний ензим з рН-оптимумом 8,0—9,0 і питомою активністю 119 од/мг протеїну. На відміну від інших ензимів, виділених із морських мікроорганізмів, еластаза *B. pumilis* не інактивувалася повністю (а тільки на 25 %) розчином NaCl [17]. З морського мулу в районі Гезіву Циньхуандао (Китай) автори [13] виділили штаму морської бактерії *Pseudomonas hibiscicola* SD8, який продукував лужну протеазу з еластазною активністю при його культивуванні в 20 мл середовища в 100 мл колбах Ерленмейера протягом 48 год за температури 30 °С, з початковим значенням рН 7,5. З морських відкладів у Сіамській затоці на глибині 24 м дослідники [19] виділили *Bacillus megaterium*, який проявляв еластазну активність. У різних місцевостях Східної провінції Саудівської Аравії з води Перської затоки, пляжного піску, харчових продуктів, верблюжого молока, сиру було виділено 91 бактеріальний ізолят, що продукує еластазу [6]. Але найвищу (771,3 од/мл) еластазну активність відмічено у штаму *Priestia megaterium* gasm 32, виділеного з харчових продуктів, у той час як еластазна активність в штаммах *Serratia marcescens* gasm 82, ізольованого з пляжного піску, і *Serratia marcescens* gasm 91, ізольованого з води Перської затоки, була нижчою і становила відповідно 453,2 та 405,5 од/мл. Інші дослідники [8, 14] оптимізували умови продукції еластази мутантним штамом *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410, який при культивуванні у глибинних умовах при швидкості перемішування 220 об/хв та об'ємі середовища 25 мл у колбах Ерленмейера об'ємом 250 мл синтезує еластазу, максимальна активність якої становила 495 Од/мл. Еластазу *Chryseobacterium indologenes* WZE87 з високою активністю автори [15] очищали у три етапи: осадженням сульфатом амонію, аніонообмінною хроматографією на Q-Sepharose та гель-фільтраційною хроматографією на Sephadex G-75. Активність очищеної еластази становила 2376,5 од/мг (8,3-кратне збільшення питомої активності), вихід 5,8 %, молекулярна маса 26 кДа. Цей фермент був стабільним в діапазоні рН 5,0—10,5 при 37 °С. Оптимальна температура і рН становили відповідно 37 °С та 7,5. Виявлено, що активність цієї еластази знижується за температури вище 50 °С. Близькі до цієї еластази властивості очищеного нами ензимного препарату *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 [14, 16]. Молекулярна маса ензимного препарату становить близько 18 кДа, температура 37 °С і рН 8,0 є оптимальними для гідролізу еластину *B. licheniformis* IMB B-8008. Ензим був нестабільним при дії високих температур. Але за своєю активністю (1500 од/мг білка) він поступається штаму *Chryseobacterium indologenes* WZE87, активність еластази у якого становила 2376,5 од/мг білка. Водночас за своєю активністю еластаза

дослідженого нами штаму *B. licheniformis* IMB B-8008 (70 од/мг білка) перевищує еластазу штаму *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324, виділеного з Чорного моря, активність якої в супернатанті культуральної рідини досягала 14–16 од/мг білка [4], а також еластазу *Bacillus* sp. IMB B-7883, активність якої в супернатанті культуральної рідини становила 24,0 од/мл [2].

Таким чином, аналіз наведених даних літератури і одержаних нами експериментальних результатів свідчить про наявність еластолітичних ензимів у мікроорганізмів, що належать до різних таксономічних груп. Вони виконують різні фізіологічні функції, зокрема можуть відігравати певну роль у прояві патогенних властивостей продуцентів. Тому дослідження здатності різних мікроорганізмів гідролізувати еластин, розроблення методів виділення й очищення еластаз, а також вивчення їхніх фізико-хімічних і каталітичних властивостей мають перспективи теоретичного і практичного їх застосування у біотехнологічних процесах.

Що стосується еластази дослідженого нами штаму *Bacillus licheniformis* IMB B-8008, то за своєю активністю і фізико-хімічними властивостями вона може бути використана на практиці після подальших досліджень можливостей її застосування як окремо, так і в складі поліферментних медичних препаратів різної дії. Еластази, окремо або в комплексі з іншими протеазами, використовують для оброблення ран при опіках, для зменшення запальних процесів, набряків, гематом та ін.

Висновки

Еластаза відіграє важливу роль у рециклінгу поживних речовин в морських екосистемах, що сприяє підтримці їхньої продуктивності. Вона може допомогти регулювати популяції різних організмів в екосистемі, що є важливим для збереження біологічного різноманіття. Еластаза впливає на еволюцію морських організмів, наприклад, сприяючи розвитку нових механізмів захисту від хижаків.

Дослідження еластаз морських бактерій допоможе краще зрозуміти функціонування морських екосистем. В подальшому це дозволить використовувати еластазу морських бактерій для розробки нових методів біоремедіації та інших екологічних технологій. Вивчення еластаз морських бактерій дозволить розробити нові ліки та інші біологічно активні сполуки.

Дослідження еластази *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 показало, що суттєвий вплив на активність досліджуваного ензима має температура вирощування та аерація. Встановлено, що молекулярна маса очищеного ензимного препарату становить близько 18 кДа, рН-оптимум – 8,0, термооптимум – 37 °С, питома активність – 1500 од/мг білка. Таким чином, досліджена еластаза може бути використана в харчовій промисловості та медицині, зокрема для регенерації та загоєння еластинових волокон пошкодженої шкіри. Але для цього потрібно провести додаткові дослідження, перш ніж його використовувати як комерційний продукт.

Незважаючи на широке використання еластаз, в Україні відсутнє виробництво дослідженого ензиму. Тому отримані результати можуть допомогти зменшити залежність від імпортованих ферментів.

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., Варбанець Л.Д., Буценко Л.М., Пасічник Л.А. Штам *Bacillus* sp. IMB В-7883 — продуцент позаклітинної еластази. Патент на корисну модель. Бюл. № 22. 25.11. 2020.
3. 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.
4. Мацелюх О.В. Отримання мутантів *Bacillus* sp. з підвищеною здатністю до синтезу еластази. *Біотехнологія.* 2010. Т. 3, № 2. С. 42—47.
5. Мацелюх О. В., Нідялкова Н.А., Варбанець Л.Д. Еластолітичні ензими мікроорганізмів. *Там само.* 2010. Т. 3, № 4. С. 21—27.
6. AlShaikh-Mubarak G.A., Kotb E., Alabdallal A.H., Aldayel M.F. A survey of elastase-producing bacteria and characteristics of the most potent producer, *Priestia megaterium* gasm32. *PLoS one.* 2023. Vol. 18, N 3. e0282963. doi:10.1371/journal.pone.0282963
7. Asitok A., Ekpenyong M., Takon I. et al. A novel strain of *Stenotrophomonas acidaminiphila* produces thermostable alkaline peptidase on agro-industrial wastes: process optimization, kinetic modeling and scale-up. *Archives Microbiol.* 2022. Vol. 204, N 7. P. 400.
8. Chen Q.H., Ruan H., Zhang H.F., Ni H.G.Q. Enhanced production of elastase by *Bacillus licheniformis* ZJU31410: optimization of cultivation conditions using response surface methodology. *J. Zhejiang Univer. Sci. B* 2007. Vol. 8, N 11. P. 845—852.
9. Costa R.A., Amorim C. L., Araújo R.L. Multiple enzymatic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from oysters. *Rev. Argent. Microbiol.* 2013. Vol. 45. N 4. P. 267—270.
10. Contesini F.J., Melo R.R., Sato H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Rev. Biotechnol.* 2018. Vol. 38, N 3. P. 321—334.
11. Cui H., Yang M., Wang L., Xian C.J. Identification of a new marine bacterial strain SD8 and optimization of its culture conditions for producing alkaline protease. *PLoS one.* 2015. Vol. 10, N 12. e0146067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146067>
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. Zhao G. Y., Chen X. L., Zhao H. L. et al. Hydrolysis of insoluble collagen by deseasein MCP-01 from deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, N 52. P. 36100—36107.
14. Hadjidj R., Badis A., Mechri S. et al. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. *Intern. J. Biol. Macromolecules.* 2018. Vol. 114. P. 1033—1048.
15. Lei Y., Zhao P., Li C. et al. Isolation, identification and characterization of a novel elastase from *Chryseobacterium indologenes*. *Appl Biol Chem.* 2018. Vol., N 3. P. 365—372.
16. Chen Q., Guoqing H., Jinling W. Acid shock of elastase-producing *Bacillus licheniformis* ZJU31410 and its elastase characterization evaluation. *J. Food Engineering.* 2007. Vol. 80, Iss. 2. P. 490—496.
17. Razzaq A., Shamsi S., Ali A. et al. Microbial Proteases Applications. *Front. Bioeng Biotechnol.* 2019. Vol. 7, N 110. doi:10.3389/fbioe.2019.00110
18. Rekik H., Zraoui Jaouadi N., Gargouri F. et al. Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *Intern. J. Biol. Macromolecules.* 2019. Vol. 121. 1227—1239.
19. Uttaree S., Kobtrakool K., Ketsuk A. et al. A novel metal-tolerant, solvent and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus megaterium*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2017. Vol. 12 (7). P. 228—235.

Надійшла 2.05.2024

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

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

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

ELASTIC ACTIVITY OF *BACILLUS LICHENIFORMIS* IMV B-8008, ISOLATED
FROM THE BLACK SEA BOTTOM SEDIMENTS

It was established that *Bacillus licheniformis* IMV B-8008, isolated from the bottom sediments of the Black Sea, synthesizes a protease that exhibits high elastase activity starting from the third day of cultivation. It has been shown that growing temperature and aeration have a significant effect on the activity of the studied enzyme. The purified enzyme preparation has a pH-optimum of 8.0, and a thermo-optimum of 37 °C. Its molecular weight is about 18 kDa, specific activity is 1500 U/mg of protein.

Key words: *Bacillus licheniformis* IMV B-8008, isolated from bottom sediments of the Black Sea, elastase activity, pH, thermo-optimum, molecular weight, specific activity.