

Винахід належить до біотехнологічної промисловості, а саме до одержання нового штам, продуцента фібриногенолітичної протеїнази.

Серед великої кількості ферментів особливий інтерес становлять фібриногенолітичні ензими. Фібриноген - білок плазми крові, попередник фібрину, волокна якого складають основу тромбу. Надмірне тромбоутворення призводить до розвитку тромбоемболічних захворювань з можливим летальним наслідком. Видалення тромбів з судин можливо хірургічно або ферментативно. Протеїнази з фібриногенолітичною активністю формують фрагменти фібриногену, які не полімеризуються під дією тромбіну і можуть розглядатися як основа для створення лікарських засобів, які запобігають згортанню крові та знижують артеріальний тиск. З цією метою застосовуються протеїнази тваринного, рослинного і мікробного походження з фібриногенолітичною активністю. Перевагу надають ферментним препаратам, які мають високу фібриногенолітичну активність.

Фібриногенолітична активність у мікроорганізмів зустрічається досить рідко. На сьогодні описані поодинокі штами з фібриногенолітичною активністю у *Bacillus sp*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*.

Найбільш близьким до винаходу по технічній суті та результату, що досягається, є штам *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 [Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д. Оптимізація середовища для синтезу фібриногенолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324//Біотехнологія. - 2012. - Т. 5, № 4. - с. 74-81], при глибинному культивуванні якого в певних умовах можна отримати ензимний препарат з активністю 4,17 од/мг білка.

Недоліком відомого штам є незначна швидкість росту і низький рівень фібриногенолітичної активності позаклітинного ферменту, що продукується.

Задачею, на рішення якої спрямовано винахід, що пропонується, є виділення нового штам зі значною швидкістю росту, і який продукує позаклітинний фермент з високим рівнем фібриногенолітичної активності.

Поставлена задача вирішується завдяки використанню штам *Bacillus licheniformis* IMB B-8008.

Запропонований штам *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 - продуцент позаклітинної протеїнази з фібриногенолітичною активністю, ізольований з донних осадів Чорного моря. Знаходиться в депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Основні характеристики штаму.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості.

Штам *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 добре росте на МПА. На МПА діаметр колоній через 72 години при +30 °C 2 мм, форма округла, дисоціація за кольором - білий та світло-сірий, край цілий, поверхня гладенька, по краях вростає в агар. Клітини забарвлюються за Грамом позитивно. Паличкоподібні. Кінці заокруглені, довжина 1,3 мкм, ширина 0,3 мкм. Спори не здувають спорангій, розташовані центрально, рідше субтермінально, вузькоеліптичної чи циліндричної форми. Спори в клітині розташовані центрально, спори не змінюють морфологію клітин. Утворення спор розпочинається на 18-24 год. культивування.

Ферментація джерел вуглецю: використовує глюкозу в аеробних умовах без утворення газу, дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера.

Асиміляція вуглеводів: штам не асимілює ерітрітол, D-арабінозу, L-ксилозу, D-адонітол, метил-β-D-ксилопіранозид, L-сорбозу, L-рамнозу, дульцитол, інозитол, D-сорбітол, інулін, D-меліцитозу, малонат, амілодекстрин, глікоген, ксиліт, D-ліксозу, D-фукозу, D-арабітол, L-арабітол, натрію глюконат, натрію 2-кетоглюконат, натрію 5-кетоглюконат.

Як джерела вуглецю культура використовує пептон, глюкозу, мальтозу, дріжджовий автолізат.

Штам росте на МПБ при концентрації хлориду натрію 7 %, не здатний рости при температурі 2 °C, не утворює сірководню, не утворює індол, редукує нітрати до нітритів, гідролізує желатин, ескулін.

Фізіолого-біохімічні властивості.

Відношення до вуглецевого живлення: культура *Bacillus licheniformis* синтезує позаклітинну фібриногенолітичну протеїназу на середовищах, що містять мальтозу, глюкозу та дріжджовий екстракт.

Відношення до азотного живлення: із органічних джерел азоту асимілює желатин, дріжджовий екстракт та дріжджовий автолізат, а з неорганічних (NH₄)₂SO₄ Найбільшу фібриногенолітичну активність забезпечує поєднання желатини, дріжджового автолізату та (NH₄)₂SO₄ як джерел азоту в середовищі.

Відношення до кислотності поживного середовища: культура росте в діапазоні pH від 5,0 до 8,0. Оптимальне вихідне значення pH середовища для синтезу ферменту становить 6,0.

Штам *Bacillus licheniformis* зберігається на косяках МПА при температурі +4 °C. Пересів культури необхідно здійснювати кожні 6 місяців.

Штам *Bacillus licheniformis* було ізольовано із донних осадів Чорного моря. Ідентифікація штам проведена за визначником Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

B. licheniformis IMB B-8008 згідно отриманих у "гострих" дослідів результатів та відповідних

нормативних матеріалів є авірулентним неінвазивним мікроорганізмом ($LD_{50 \text{ в/ч}} > 1 \cdot 10^9$, $LD_{50 \text{ per os}} > 10 \cdot 10^9$ клітин/мишу). Штам належить до IV класу небезпеки мікроорганізмів: "мало небезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії". Мікроорганізми цього класу небезпеки дозволені МОЗ України до використання у виробництві [Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсико-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів. Методичні вказівки МОЗ України. Київ, 2004.].

Відношення до кисню: факультативний анаероб.

Відношення до температури: мезофіл, оптимальна температура для росту та біосинтезу фібриногенолітичної протеїнази 25-28 °C.

Відношення до кислотності поживного середовища: культура росте в діапазоні pH від 5,0 до 8,0. Оптимальне вихідне значення pH середовища для синтезу ферменту становить 6,0, а в процесі росту та ферментації спостерігається зростання pH до 8,0.

Поживним середовищем для ферментації є середовище наступного складу, (г/л): KH_2PO_4 -1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,75; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,25; $(NH_4)_2SO_4$ -0,5; мальтоза - 1,0; желатина - 10,0; дріжджовий автолізат - 0,15; pH 6,0.

Вирощування бактеріальної культури проводять в глибинних умовах у пробірках або колбах Ерленмейєра (750 мл) на качалці, що робить 244 об/хв (рівень аерації 16,76 мг O_2 /л×год) при 28 °C впродовж 72 год. Засів поживного середовища здійснюють 5 % однодобовим інокулюмом. Після культивування клітини відділяють центрифугуванням (5000 g, 20 хв), ензиматичну активність визначають у супернатанті культуральної рідини.

Для визначення активності ензиму як субстрат використовують фібриноген. При вивченні фібриногенолітичної активності в дослідну пробірку додають 1 мг фібриногену, 1,8 мл 0,01 М Трис-НСІ-буфера (pH 7,5) і 0,2 мл розчину досліджуваного препарату. Реакційну суміш інкубують впродовж 30 хв за температури 37 °C. Реакцію зупиняють додаванням 2 мл 10 %-го розчину ТХУ. В контрольну пробу ТХУ додають відразу ж. Зразки витримують при кімнатній температурі 20 хв, а потім центрифугують 10 хв при 10000 g для видалення осадженого білка. Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі СФ-26 за поглинанням при 275 нм. За одиницю активності ензиму приймають таку його кількість, при використанні якої оптична густина підвищується на 0,01 за 1 хв в умовах досліді.

Фібриногенолітична активність у супернатанті культуральної рідині штаму-продуцента *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 за цих умов складає 8,6 од/мг білка.

Перевагою запропонованого продуцента є його здатність синтезувати високоактивну протеїназу з фібриногенолітичною активністю, відсутність сезонності та токсичності, що є технологічно ефективним. Ензимний препарат, одержаний з культуральної рідини *B. licheniformis* IMB B-8008, здатний ефективно деградувати фібриноген при значеннях pH середовища від 5,0 до 9,0 з максимумом активності при pH 8,0. Фермент стабільний при зазначених значеннях pH. Ензимний препарат ефективно гідролізує фібриноген за 37 °C.

Винахід ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1.

Спосіб отримання протеїнази з фібриногенолітичною активністю за допомогою штаму *B. licheniformis* IMB B-8008.

Культуру бактерії вирощували на м'ясо-пептонному агарі упродовж 18 год. Фібриногенолітичну активність визначали після культивування упродовж 72 год. при 28 °C на рідкому живильному середовищі наступного складу, (г/л): KH_2PO_4 -1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,75; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,25; $(NH_4)_2SO_4$ -0,5; мальтоза - 1,0; желатина - 10,0; дріжджовий автолізат - 0,15; pH 6,0.

Вирощування бактеріальної культури проводили в глибинних умовах у пробірках або колбах Ерленмейєра (750 мл) на качалці, що робить 244 об/хв (рівень аерації 16,76 мг O_2 /л×год). Засів поживного середовища здійснювали 5 % однодобовим інокулюмом. Після культивування клітини відділяли центрифугуванням (5000 g, 20 хв), ензиматичну активність визначали у супернатанті культуральної рідини. Фібриногенолітична активність у супернатанті культуральної рідині штаму-продуцента *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 за цих умов складала 8,6 од/мг білка.

Білки культуральної рідини осаджували сірчаноокислим амонієм при 90 % насиченні на холоді. Після формування осадів їх відділяли центрифугуванням (5000 g, 30 хв). Осад білків розчиняли в 0,05 М трис-НСІ буфері (pH 8,5), видаляли нерозчинну частину осаду, розчин діалізували при 4 °C проти того самого буфера. Отриманий розчин зберігають в холодильнику при 4 °C. Для тривалого зберігання розчин ліофілізують.

Фібриногенолітичну активність визначають шляхом, описаним вище.

Приклад 2.

Порівняння способів отримання протеїнази з фібриногенолітичною активністю штаму *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 і найближчого аналога - штаму *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 проводили за прикладом 1. Фібриногенолітична активність протеїнази в культуральній рідині за запропонованим способом в 2 рази вище, ніж у найближчого аналогу.

При глибинному культивуванні *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 в певних умовах можна отримати

ензимний препарат з активністю 4,17 од/мг білка.

Таким чином, виділено новий штам - продуцент ферменту з фібриногенолітичною активністю, який, у порівнянні з відомими, є більш активним, має інші культуральні ознаки і є новою культурою зі стійкими біохімічними властивостями. Запропонований фермент може знайти використання у медико-технологічних процесах для створення лікарських засобів, спрямованих на зменшення загрози внутрішньосудинного тромбоутворення шляхом обмеженого протеолізу фібриногену, що циркулює у кровотоці пацієнта, а також може бути застосований для розщеплення внутрішньосудинних тромбів, що перешкоджають кровопостачанню органів за таких патологій як інфаркт міокарда, ішемічний інсульт, тромбоемболія легеневої артерії. В Україні на цей час високоактивні продуценти протеїназ з фібриногенолітичною активністю відсутні.