

И.А.Кузьмиченко, М.Н.Киреев, О.В.Громова, В.С.Бронникова, С.А.Нижегородцев

## ГИДРОЛИЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ПРОТЕАЗЫ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА – ПРОТЕОВИБРИНА ПО ОТНОШЕНИЮ К БЕЛКОВЫМ СУБСТРАТАМ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Описан способ получения низкомолекулярного ферментного комплекса холерного вибриона – протеовибрина с высокой протеолитической активностью, показано его преимущественное накопление в ультрафильтрате культуральной жидкости производственного штамма М41. По протеолитической активности в отношении ряда белковых субстратов протеаза протеовибрина не уступает коммерческому трипсину и может быть использована для приготовления ферментализатов.

*Ключевые слова:* холерный вибрион, ультрафильтрат культуральной жидкости, ферментный комплекс протеовибрина, протеолитическая активность.

При получении О-антигенного компонента вакцины холерной бивалентной химической из центрифугата формализированной культуральной жидкости производственного штамма *Vibrio cholerae* М41 серовара Огава с помощью концентрирующей мембранной технологии [1] накапливается побочный продукт производственного цикла – ультрафильтрат. Нами было установлено, что он содержит комплекс низкомолекулярных биологически активных ферментов, среди которых преобладают протеаза, фосфолипаза А<sub>2</sub> и С [2]. В настоящей работе мы остановили внимание на одном из них – протеазе. По нашим данным [3], штамм М41 отличается от других штаммов холерного вибриона, выращиваемых глубинным способом в производственных целях, значительно более высокой протеолитической активностью. Она появляется в культуральной жидкости к 7 ч инкубации, и в дальнейшем ее удельная активность, рассчитанная на 100 млрд м.к., нарастает до окончания выращивания (10 ч), в то время как у других производственных штаммов она падает. Существенно, что в процессе длительной (до 30 сут) детоксикации культуральной жидкости штамма М41 формальдегидом, проводимой в соответствии с регламентом производства холерной вакцины, протеолитическая активность в ней не снижается. На всех последующих после детоксикации этапах получения О-антигенного компонента вакцины протеолитическая активность присутствует как в сконцентрированном полуфабрикате, так и в ультрафильтрате. Представляло интерес выяснить, насколько полно протеолитический фермент из культуральной жидкости поступает в ультрафильтрат и может ли данная низкомолекулярная протеаза быть использована для гидролитического расщепления различных белковых субстратов. В качестве фермента сравнения использован коммерческий трипсин.

### Материалы и методы

Штамм *Vibrio cholerae* М41 серовара Огава выращивали глубинным способом в реакторе на бульоне из ферментативного гидролизата казеина (рН 7,6) в течение 10 ч при 37 °С. В опытах использовали ма-

териал из 4 реакторов с объемом питательной среды 250 л каждый. Центрифугат детоксицированной культуральной жидкости подвергали ультрафильтрации на волоконном аппарате марки УВА-ПС-20-1040 (ВНИИ полимерных волокон, Мытищи, Московской обл.) с шестью последовательно соединенными колонками, что позволяло концентрировать полуфабрикат – высокомолекулярный О-антиген до относительно небольшого объема (25 л). Объем ультрафильтрата составлял в среднем 220 л. Ферментный комплекс выделяли из ультрафильтрата после повторного цикла концентрирующей ультрафильтрации на волоконном аппарате марки УВА-ПС-17-1040 с меньшей пропускной способностью волокон. Из повторно сконцентрированного ультрафильтрата с объемом около 10 л низкомолекулярные белки осаждали серноокислым аммонием до 80% насыщения. После диализа и упаривания жидкий ферментный комплекс, названный нами протеовибрином, с содержанием белка (18±2) мг/мл длительно (в течение года) без потери активности хранили при -20 °С либо лиофилизировали и хранили при +4 °С, в сухом препарате содержание белка составляло (55±4) %. Белок определяли по Лоури; в пробах, где присутствовала питательная среда – после предварительного осаждения трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Наличие О-антигена определяли в реакции иммунодиффузии с сывороткой диагностической холерной О1 адсорбированной (РосНИПЧИ «Микроб»).

Протеолитическую активность на этапах получения препарата определяли на плотной тест-среде с обезжиренным молоком в стандартной постановке. За условную единицу активности принимали максимальное разведение препарата с известным содержанием белка, дающее за 20 ч инкубации при 37 °С зону просветления 2 мм [4]. Удельную активность выражали количеством условных единиц на 1 мг белка препарата.

Протеолитическую активность в присутствии различных белковых субстратов определяли спектрофотометрически при 280 нм по накоплению продуктов, неосаждаемых ТХУ (преимущественно тирозина) [6]. Активность выражали в мкг тирозина,

отщепленного на 1 мг белка/ч. В качестве фермента сравнения использовали трипсин (Serva), активность которого после определения на тест-среде с молоком приводили путем разведения в соответствие с активностью протеазы протеовибрина.

В качестве субстратов использовали казеин, овальбумин, желатину, белки крови – гемоглобин и фибрин лошади, фибриноген человека, сывороточный альбумин быка и человека, белки сои. Последние были взяты в виде суспензии соевой муки.

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами.

### Результаты и обсуждение

Для оценки степени перехода протеазы через селективный барьер волокон в процессе ультрафильтрации культуральной жидкости получены данные о распределении белка и активности фермента между разделяемыми фазами (табл. 1).

Как видно из табл. 1, количество белка на весь объем культуральной жидкости превышает его суммарное содержание в двух других препаратах, что может быть связано с частичной сорбцией белка на волокнах. При разделении основная масса белка остается в концентрате, в ультрафильтрат переходит около 25 % всего растворимого белка. В то же время очевидно, что удельная активность протеазы в ультрафильтрате значительно превышает таковую в концентрате, поэтому с учетом большого объема ультрафильтрат после дополнительного концентрирования может служить источником получения фермента.

Существенно, что сам процесс ультрафильтрации служит способом первичной очистки препарата, отсекая молекулы с молекулярной массой свыше 35–40 кДа, в том числе О-антиген. Нами в РИД с О-сывороткой не обнаружено присутствие О-антигена в сконцентрированном ультрафильтрате.

Ферментный комплекс протеовибрин, полученный из ультрафильтрата традиционным способом высаливания сульфатом аммония, имел удельную активность протеазы на тест-среде (16000±2000) усл. ед./мг белка при рН 7,2. Результаты по определению протеолитического гидролиза различных белковых субстратов представлены в табл. 2.

Таблица 1

Содержание белка и протеолитическая активность в препаратах, полученных при ультрафильтрации культуральной жидкости

Препарат	Объем, л	Содержание белка		Удельная активность протеазы, усл. ед./мг белка
		г/л	на весь объем, г	
Культуральная жидкость	250	0,263	65,8	2066
Концентрат О-антигена	25	1,62	40,5	155
Ультрафильтрат	220	0,073	16,1	2700

Примечание. Даны средние значения по 4 реакторам.

Все перечисленные субстраты протеовибрин расщеплял с различной степенью интенсивности, при этом наибольшая активность выявлена в отношении белков крови животных и человека. Характерно, что фибрин крови лошади после денатурации нагреванием становится значительно более доступен для протеолитического воздействия. Коммерческий трипсин в отличие от протеазы протеовибрина не гидролизует овальбумин и белки сои. Последнее очевидно связано с содержанием в сое известного специфического ингибитора трипсина.

Что касается желатины, оценить ее гидролиз спектрофотометрически по накоплению тирозина не удалось, что возможно связано с низким содержанием последнего в самом белке. Поэтому мы сравнивали образцы по степени разжижения 4 % желатинового геля в столбиках в течение 2 ч при 37 °С при двукратном разведении препаратов. Полное разжижение происходило с протеовибрином в дозе 31 мкг белка/мл, с трипсином – 62 мкг белка/мл.

Таким образом, протеаза ферментного комплекса холерного вибриона – протеовибрина обладает активностью в отношении достаточно широкого спектра белковых субстратов, не уступая коммерческому трипсину, а для ряда субстратов и превосходя его. Следует отметить, что недавно охарактеризован спектр белков, гидролизуемых очищенной гемагглютинин/протеазой холерного вибриона, синтезируемой рекомбинантным штаммом кишечной палочки [5]. Однако проводить какие-либо аналогии между этими протеазами можно будет лишь после дополнительного изучения свойств протеазы протеовибрина. На данном этапе способность последнего эффективно гидролизовать белки казеина, сои, фибрина лошади, являющегося отходом производства антирабического иммуноглобулина, указывает на возможность практического использования протеовибрина для получения ферментолитатов, пригодных в качестве основ микробиологических питательных сред.

Таблица 2

Ферментативный гидролиз различных белковых субстратов протеазой протеовибрина и трипсином

Субстрат	Протеаза протеовибрина	Трипсин
	Активность в мкг тирозина/мг белка/ч	
Казеин	178±21	535±64
Овальбумин	462±49	0
Гемоглобин крови лошади	1333±283	1334±211
Бычий сывороточный альбумин	796±62	647±59
Альбумин сыворотки человека	992±87	99±8
Фибриноген человека	419±38	127±19
Фибрин крови лошади, нативный	284±36	230±27
Фибрин крови лошади, денатурированный	782±71	764±82
Белки сои	631±52	0

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дятлов И.А., Нижегородцев С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Бутов А.С., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Разработка ультрафильтрационной технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства вакцин. Пробл. особо опасных инф. 2001; 2(82):133–9.
2. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Нижегородцев С.А., Балашова Е.В., Дятлов И.А., Киреев М.Н. Экзоферменты ультрафильтрага культуральной жидкости вакцинного штамма М41 холерного вибриона. В кн.: Холера: Матер. VIII Российск. науч.-практ. конф. по проблеме «Холера». Ростов н/Д; 2003. С. 229–30.
3. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Белякова Н.И. Активность ферментов в динамике глубинного роста производственных штаммов холерного вибриона О1 и О139 серогрупп. Пробл. особо опасных инф. 2003; 86:86–9.
4. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Джаридзе М.Н., Киреев М.Н., Белякова Н.И., Клокова О.Д. Тест-среды для определения активности триназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах. Пробл. особо опасных инф. 2002; 1(83):115–9.
5. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Гончарова Л.А., Михась Н.К., Непомнящая Н.Б., Асеева Л.Е., Каграманов В.С. Клонирование и экспрессия гена гемагглютинин/протеазы (hapA) *Vibrio cholerae* в *Escherichia coli*. Биотехнология. 2006; 6:8–15.
6. Покровский А.А., редактор. Биохимические методы исследования в клинике. М.: Медицина; 1969. С. 202–203.

I.A.Kuzmichenko, M.N.Kireev, O.V.Gromova, V.S.Bronnikova,  
S.A.Nizhegorodtsev

**Hydrolyzing Ability of Protease  
of Enzyme Complex of Cholera Vibrio that is Proteovibrin  
for Protein Substrates**

*Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov*

The way of production of low-molecular weight enzyme complex of cholera vibrio (proteovibrin) with high proteolytic activity is described. Its prevailing accumulation in ultrafiltrate of cultural liquid of M41 production strain is shown. Proteovibrin protease doesn't yield to commercial trypsin in proteolytic activity as regards some protein substrates and can be used for enzymolysate preparation.

*Key words:* cholera vibrio, ultrafiltrate of cultural liquid, proteovibrin enzyme complex, proteolytic activity.

**Об авторах:**

Кузьмиченко И.А. (с.н.с.), Киреев М.Н. (зав. отд.), Громова О.В. (с.н.с.), Бронникова В.С. (химик-эксперт), Нижегородцев С.А. (зав. отд.). Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел.: (845-2) 73-46-48. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 10.06.08.