

Wpłynęło 22.05.2018 r.
Zrecenzowano 5.06.2018 r.
Zaakceptowano 14.06.2018 r.
A – koncepcja
B – zestawienie danych
C – analizy statystyczne
D – interpretacja wyników
E – przygotowanie maszynopisu
F – przegląd literatury

CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA PROTEAZY SYNTETYZOWANEJ PRZEZ *Streptomyces rimosus*

Urszula JANKIEWICZ¹⁾ ADEF, Sebastian KOBLAK¹⁾ BDEF,
Paweł WIERZCHOWSKI²⁾ E, Stefan RUSSEL²⁾ AF

¹⁾ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolnictwa i Biologii,
Katedra Biochemii

²⁾ Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Falentach, Zakład Użytków Zielonych

Streszczenie

Badania prezentowane w niniejszej pracy miały na celu charakterystykę biochemiczną zewnątrzkomórkowej proteazy syntetyzowanej przez wyizolowany z gleby szczep *Streptomyces rimosus* i ocenę możliwości praktycznego wykorzystania tego enzymu w przemyśle. Badany enzym wyizolowano z 7-dniowych hodowli bakterii *Streptomyces rimosus*. Oczyszczony dwukrotnie enzym wykorzystano do charakterystyki biochemicznej w zakresie optymalnych warunków jego działania oraz wpływu aktywatorów i inhibitorów. Proteaza syntetyzowana przez *S. rimosus* wykazywała najwyższą aktywność w temperaturze 50°C i pH 7,5 oraz wysoką termostabilność w temperaturze 50°C. Dwuwartościowe jony Zn, Mo, Ni, Cd, Co hamowały aktywność enzymu, natomiast Ca i Mg – aktywowały. Silna inhibicja aktywności enzymu w obecności diizopropylodifluorofosforanu (DFP) świadczy o tym, że jest to proteaza serynowa. Aktywność badanego enzymu była stabilna w obecności takich detergentów, jak Triton X-100, Tween 20, Tween 80, bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB) oraz dodecylsulfianu sodu (SDS).

Słowa kluczowe: enzymy proteolityczne, inhibitory proteaz, optimum temperaturowe, promieniowce

WSTĘP

Promieniowce (*Actinobacteria*) zasiedlają różnorodnie środowiska, począwszy od terenów pustynnych, a skończywszy na lodowcach [ZHANG i in. 2016]. Cechuje je zdolność do syntezy wielu zewnątrzkomórkowych enzymów oraz metabolitów

Do cytowania For citation: Jankiewicz U., Koblak S., Wierzchowski P., Russel S. 2018. Charakterystyka biochemiczna proteazy syntetyzowanej przez *Streptomyces rimosus*. Woda-Środowisko- Obszary Wiejskie. T. 18. Z. 2 (62) s. 5–14.

wtórnych, szczególnie antybiotyków [ABDELMOHSEN i in. 2015; SHARMA i in. 2014]. Są to często ryzosferowe i endofityczne mikroorganizmy wywierające stymulujący wpływ na wzrost roślin [DINESH i in. 2017; VURUKONDA i in. 2018]. Znane są także gatunki promieniowców, które przyspieszają wzrost roślin i wspomagają mikoryzę (ang. mycorrhiza helper bacterium) [SCHREY i in. 2005].

Wiele gatunków tych bakterii jest producentami proteaz – hydrolaz rozkładających wiązania peptydowe w białkach i peptydach [MEHTA i in. 2006; SUTHINDHIRAN i in. 2014]. Biorąc pod uwagę specyficzność działania proteaz, można wyróżnić endopeptydazy – katalizujące rozpad wiązania peptydowego wewnątrz cząsteczki białka lub egzopeptydazy, które hydrolizują, uprzednio identyfikując resztę karboksylową lub aminową, na końcach łańcucha peptydowego. Enzymy te, ze względu na mechanizm katalizy, podzielono na: cysteinowe, aspartylowe, serynowe oraz metalozależne proteazy [KAMAL i in. 2017]. Zdolność do syntezy enzymów proteolitycznych wiąże się z dużym potencjałem aplikacyjnym tych bakterii. Proteazy, szczególnie alkaliczne są intensywnie badane w kontekście wykorzystania ich w biotechnologii, szczególnie w takich dziedzinach, jak produkcja detergentów, środków spożywczych, w garbarstwie oraz przemyśle farmaceutycznym i skórzanym [GUPTA i in. 2002; LI i in. 2013]. Zbadano także możliwość wykorzystania bakterii z rodzaju *Streptomyces* jako źródła proteaz wykorzystywanych w procesie produkcji bezpiecznej żywności i leków [TAVANO i in. 2018].

Wykorzystywany w prezentowanych badaniach szczep *Streptomyces rimosus* charakteryzował się zdolnością do wydzielania proteazy o wysokiej aktywności. Dlatego celem pracy była charakterystyka biochemiczna zewnątrzkomórkowej proteazy syntetyzowanej przez *S. rimosus*. Badania zostały ukierunkowane na ocenę potencjalnych możliwości zastosowania tego enzymu w przemyśle.

METODY BADAŃ

Źródłem badanej proteazy był izolat glebowy *Streptomyces rimosus* [SWIONTEK BRZEZIŃSKA i in. 2013].

Hodowlę promieniowca prowadzono przez 7 dni w łaźni wodnej z wytrząsaniem, w temperaturze 28°C, w pożywce płynnej o następującym składzie ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$): ekstrakt drożdżowy – 0,5; pepton – 0,5; K_2HPO_4 – 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; skrobia rozpuszczalna – 1; odczyn pożywki ustalono na pH 6,8.

Aktywność proteazy oznaczano z zastosowaniem 1-procentowego roztworu azokazeiny (Sigma), w 0,1 M buforze Tris-HCl o pH 7,8, jako substratu. Reakcje enzymatyczne prowadzono w 4°C przez 30 min. Absorbancję prób mierzono przy długości fali $\lambda = 420 \text{ nm}$ [JANKIEWICZ i in. 2012]. Jako jednostkę aktywności (U) przyjęto $A_{420\text{nm}} 10$.

Izolacja białek z pożywki hodowlanej: 500 cm^3 hodowli bakterii odwirowywano przez 15 min w temperaturze 4°C z prędkością 11 000 obr. $\cdot \text{min}^{-1}$ osad komórek

bakterii odrzucono, białka z supernatantu wytrącono schłodzonym acetonem. Otrzymany osad rozpuszczono w 10 ml 20 mM buforu Tris-HCl o pH 7,8. Dializę prowadzono w temperaturze 4°C w obecności buforu 20 mM Tris-HCl o pH 7,8.

Uzyskany po dializie roztwór białka poddano rozdzielni techniką chromatografii jonowymiennej (DEAE Sepharose) w następujących warunkach: bufor równoważący – 20 mM Tris-HCl 7,8; bufor elucyjny – 20 mM Tris-HCl 7,8 + 0,6 M NaCl. Naniesiono na kolumnę 10 cm³ preparatu, objętość każdej z zebranych do analizy frakcji ustalono na 3,5 cm³. Frakcje z najwyższą aktywnością wykorzystano w dalszych badaniach nad charakterystyką enzymu. Stężenie białka na poszczególnych etapach oczyszczania enzymu oznaczano metodą Bradforda [BRADFORD 1976].

Optimum temperatury badanego enzymu wyznaczono w zakresie od 30 do 65°C.

Do określenia optymalnego pH badanego enzymu wykorzystano dwa rodzaje buforów w stężeniu 0,1 M Tris-HCl (pH 7,0; 7,5; 8,5; 9,0) oraz 0,1 M sodowo-fosforanowy (pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5). Termostabilność enzymu badano, inkubując enzym przez 30 i 60 minut w temperaturze 50°C, 55°C oraz 60°C, po czym schładzano próby i po dodaniu substratu prowadzono reakcje enzymatyczne.

Wpływ na aktywność proteazy jonów metali analizowano z wykorzystaniem roztworów soli metali o finalnym stężeniu 5 mM: NiSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, CoCl₂·6H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, CdCl₂·2,5H₂O, MnSO₄·4H₂O, Mo(NH₄)₂ oraz 1 i 5 mM roztworów inhibitorów: EDTA (kwas wersenowy), DFP, jodoacetamid, pepstatyna A.

Przed przystąpieniem do właściwej reakcji enzymatycznej preinkubowano enzym z określonym roztworem soli metalu lub inhibitorem przez 30 min w temperaturze 4°C.

Wpływ detergentów: Triton X-100, Tween 20, Tween 80, bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB) oraz dodecylosiarczanu sodu (SDS) badano po uprzedniej 20-godzinnej preinkubacji enzymu w temperaturze 4°C w obecności tych związków, a następnie prowadzono reakcję enzymatyczną.

Wszystkie wyniki zawarte w pracy o charakterze danych liczbowych są średnią z trzech powtórzeń. Błąd względny, oznaczający maksymalne względne odchylenie wyników od średniej, nie przekraczał 5%.

WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

Szeroka gama enzymów i wtórnych metabolitów syntetyzowanych przez promieniowce z rodzaju *Streptomyces* od lat stymuluje liczne badania naukowe nad potencjałem aplikacyjnym tych mikroorganizmów. W aspekcie praktycznego zastosowania enzymów istotne jest prowadzenie badań nad ich optymalnymi warunkami działania, termostabilnością oraz podatnością na inhibitory, aktywatory i detergenty. Etapem wstępnym takich badań zwykle jest oczyszczanie białka enzymatycznego w celu uzyskania bardziej wiarygodnych wyników doświadczeń.

W prezentowanych badaniach proteazę bakterii *Streptomyces rimosus* oczyszczono z zastosowaniem dwóch etapów: wytrącania białek acetonem oraz rozdzielania chromatograficznym na złożu jonowymiennym, zgodnie z tabelą 1. Zastosowana procedura oczyszczania umożliwiła 67-procentowy odzysk aktywności całkowitej badanej proteazy i dwukrotne jej oczyszczenie (tab. 1).

Tabela 1. Etapy oczyszczania proteazy *Streptomyces rimosus*

Table 1. Purification steps of protease from *Streptomyces rimosus*

Etap oczyszczania Purification step	Aktywność całkowita Total activity U	Białko Protein mg	Aktywność właściwa Specific activity U·mg ⁻¹	Wydajność procesu Yield %	Stopień oczyszczenia Purification fold
Płyn pochodzący Crude extract	296,4	65,7	4,5	100	1,0
Wytrącanie acetonem Acetone precipitation	247,0	50,8	4,9	83	1,1
Chromatografia jonowymienna Ion-exchange chromatography	199,7	22,5	8,9	67	2,0

Źródło: wyniki własne. Source: own study.

Najwyższą aktywność proteazy wyizolowanej z hodowli *Streptomyces rimosus* uzyskano w temperaturze 50°C (rys. 1). Aktywność enzymu obniżała się o blisko 50%, gdy reakcję enzymatyczną prowadzono w temperaturze 35°C. Natomiast w 40°C uzyskiwano już 75% maksymalnej aktywności badanej proteazy. Warto zwrócić także uwagę, że w temperaturze 55°C aktywność enzymu zmniejszyła się jedynie o 7% w porównaniu z wartościami uzyskiwanymi w temperaturze optymalnej.

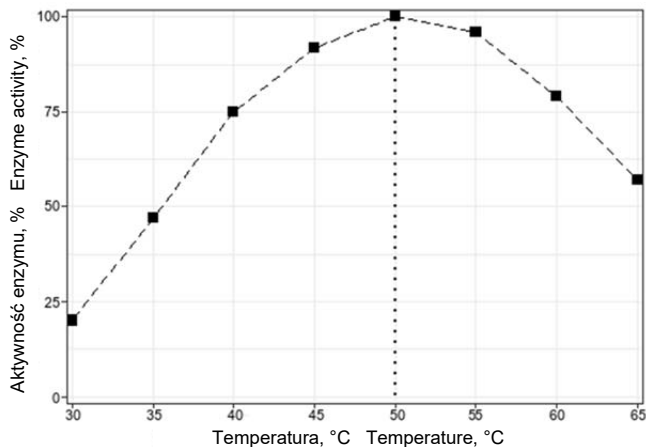
W przeprowadzonych badaniach ustalono, że optymalne pH dla proteazy *S. rimosus* wynosi 7,5. Znaczącą aktywność badanej proteazy uzyskiwano, gdy pH wynosiło między 6,5 a 8,0 (rys. 2).

Wyniki zbliżone do uzyskanych w badaniach prezentowanych w niniejszej pracy otrzymano dla proteazy syntetyzowanej przez *Streptomyces flavogriseus* HS1, wykazującej najwyższą aktywność w pH 7,0 i w temperaturze 50°C [GHORBEL i in. 2014]. Należy podkreślić, że wiele gatunków promieniowców z rodzaju *Streptomyces* syntetyzuje proteazy o wyższej temperaturze optymalnej niż 50°C, czego przykładem może być wysoce aktywny w 60°C enzym syntetyzowany przez *S. griseorubens* E44G [AL-ASKAR i in. 2015] lub proteaza syntetyzowana przez *Streptomyces koyangensis* TN650 w 70°C [BEN ELHOUL i in. 2015].

W przypadku bakterii z tego rodzaju opisano dotychczas wiele alkalicznych proteaz z optymalnym pH między pH 9 a 11 [HUI i in. 2004; SHILPA i in. 2015; XIN i in. 2015]. Opisano także proteazę syntetyzowaną przez *S. tendae* z optymalną aktywnością w pH 6,0 [SEONG i in. 2004].

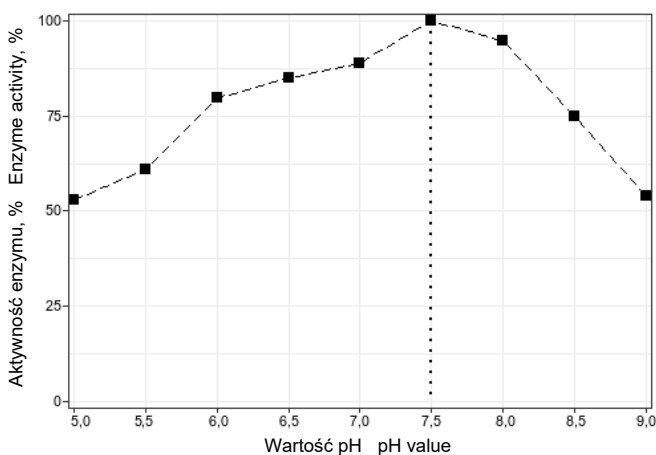
Rys. 1. Wpływ temperatury na aktywność proteazy syntetyzowanej przez *Streptomyces rimosus*; źródło: wyniki własne

Fig. 1. Effect of temperature on activity of protease from *Streptomyces rimosus*; source: own study



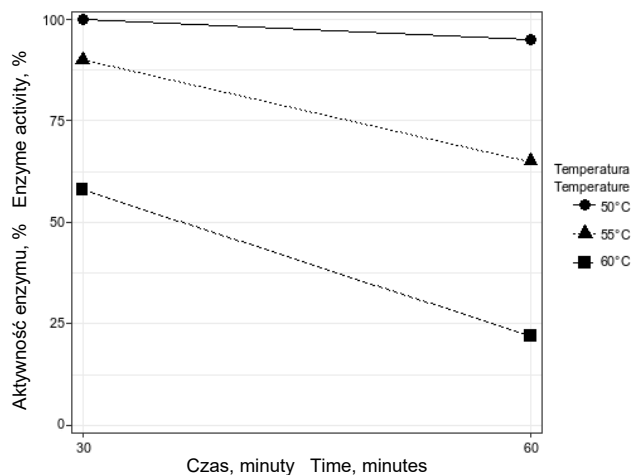
Rys. 2. Wpływ pH na aktywność proteazy syntetyzowanej przez *Streptomyces rimosus*; źródło: wyniki własne

Fig. 2. Effect of pH on activity of protease from *Streptomyces rimosus*; source: own study



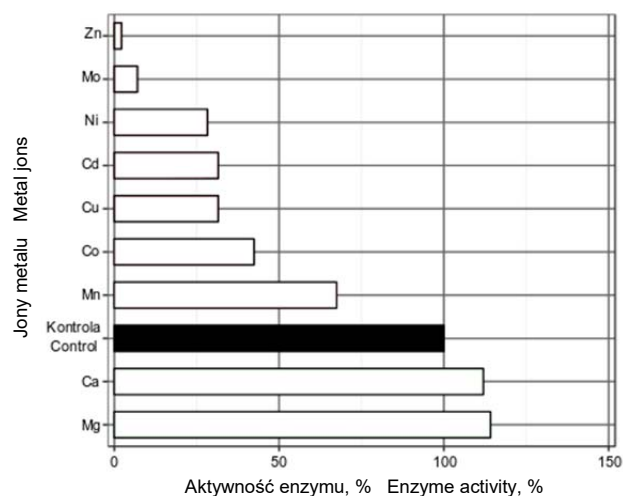
Badana proteaza wykazywała wysoką termostabilność po 60-minutowej preinkubacji, w temperaturze 50°C (rys. 3). Podwyższenie temperatury o 10°C spowodowało 80% strat w aktywności tego enzymu. Termostabilne białka enzymatyczne są interesującym obiektem badań ze względu na ich potencjał aplikacyjny. Do termostabilnych enzymów można zaliczyć m.in. proteazę syntetyzowaną przez *S. fungicidicus* MML1614 [RAMESH i in. 2009] lub *S. clavuligerus* Mit-1 [THUMAR, SINGH 2007] czy też *S. tendae* [SEONG i in. 2004].

Zastosowane w doświadczeniu jony metali w różny sposób wpływały na aktywność badanej proteazy (rys. 4), jednak większość z nich obniżała aktywność enzymatyczną. Silną inhibicję – na poziomie 90% aktywności enzymu – wywołały jony cynku i molibdenu. Jony Ni, Cd, Cu i Co również obniżały (o ok. 65–75%) aktywność badanego enzymu. Podobne wyniki stwierdzono w przypadku proteazy syntetyzowanej przez *Streptomyces* sp. DPUA 1576 [MEDEIROS i in. 2016].



Rys. 3. Termostabilność proteazy *Streptomyces rimosus* po inkubacji przez 30 i 60 minut w temperaturze 50°C, 55°C oraz 60°C; źródło: wyniki własne

Fig. 3. Thermostability of protease from *Streptomyces rimosus*, after 30 and 60 minutes of incubation in 50°C, 55°C and 60°C; source: own study

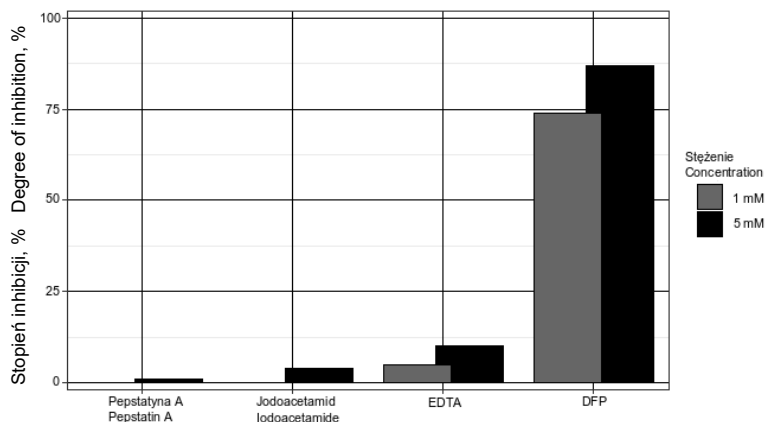


Rys. 4. Wpływ jonów metali na aktywność proteazy syntetyzowanej przez *Streptomyces rimosus*; źródło: opracowanie własne

Fig 4. Effect of metal ions on protease activity from *Streptomyces rimosus*; source: own study

Uzyskane w tej pracy wyniki badań dają podstawy do stwierdzenia, że jony wapnia i magnezu stymulowały w ok. 20% aktywność proteazy syntetyzowanej przez *S. rimosus*, co może świadczyć o stabilizacji aktywności enzymatycznej przez te jony metali. Stabilizacja lub aktywacja aktywności proteaz w obecności jonów wapnia i magnezu jest dość często opisywana w literaturze. Dla przykładu aktywność proteazy wydzielanej przez *Streptomyces* sp. AH4 zwiększała się dwukrotnie pod wpływem jonów wapnia i 1,5-krotnie pod wpływem jonów magnezu [TOUIOUI i in. 2015].

W badaniach przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy stosowano inhibitory specyficzne względem określonych typów katalitycznych proteaz: EDTA (inhibitor metalozależnych peptydaz), pepstatyna A (aspartylowych), jodoacetamid (cysteinowych) oraz DFP (serynowych). Silna inhibicja w obecności DFP (rys. 5)



Rys. 5. Wpływ inhibitorów na aktywność proteazy *Streptomyces rimosus*; źródło: wyniki własne

Fig. 5. Effect of specific protease inhibitors on protease activity from *Streptomyces rimosus*; source: own study

umożliwia zaliczenie tej proteazy do grupy enzymów serynowych. Proteazy o takim typie katalitycznym opisano także w przypadku innych gatunków bakterii z rodzaju *Streptomyces*, w tym *S. pactum* DSM 40530 [BÖCKLE, MULLER 1997], *Streptomyces* sp. AH4 [TOUIOUI i in. 2015] lub *Streptomyces* sp. M30 [XIN i in. 2015]. Serynowe proteazy są także wydzielane przez inne bakterie, np. z rodzaju *Stenotrophomonas* [JANKIEWICZ i in. 2017].

Aktywność badanej proteazy wykazywała dużą stabilność w obecności zastosowanych w doświadczeniu detergentów jonowych (SDS, CTAB) i niejonowych (Tween, Triton) wymienionych w tabeli 2. Jedynie SDS (w stężeniu 1%) obniżał o 5% aktywność badanego enzymu. Stabilność proteaz w obecności detergentów otwiera możliwości praktycznego zastosowania tych enzymów w przemyśle chemicznym. Podobne wyniki zostały zaprezentowane w odniesieniu do *Streptomyces flavogriseus* HS1 [GHORBEL i in. 2014] i *Streptomyces* sp. strain AH4 [TOUIOUI i in. 2015].

Tabela 2. Wpływ różnych detergentów na aktywność proteazy *Streptomyces rimosus*

Table 2. Effects of various detergents on protease activity from *Streptomyces rimosus*

Detergent Detergent	Stężenie, % Concentration, %	Aktywność, % Activity, %
Kontrola Control	–	100
Tween 20	5	110
Tween 80	5	115
Triton X-100	5	100
SDS	1	95
CTAB	0,1	100

Źródło: wyniki własne. Source: own study.

WNIOSKI

1. Wyizolowany z gleby promieniowiec *Streptomyces rimosus* syntetyzuje ze-wnątrzkomórkową proteazę o optymalnej aktywności w temperaturze 50°C oraz pH 7,5, termostabilną w temperaturze 50°C.

2. Badany enzym zaliczono do serynowych proteaz aktywowanych jonami wapnia i magnezu.

3. Proteaza *S. rimosus* wykazuje stabilność w obecności jonowych i niejonowych detergentów, co może mieć praktyczne zastosowanie np. w przemyśle chemicznym.

BIBLIOGRAFIA

- ABDELMOHSEN U.R., GRKOVIC T., BALASUBRAMANIAN S., KAMEL M.S., QUINN R.J., HENTSCHEL U. 2015. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances*. Vol. 33. Iss. 6 s. 798–811.
- AL-ASKAR A.A., RASHAD Y.M., HAFEZ E.E., ABDULKHAIR W.M., BAKA Z.W., GHONEEM K.M. 2015. Characterization of alkaline protease produced by *Streptomyces griseorubens* E44G and its possibility for controlling *Rhizoctonia* root rot disease of corn. *Journal Biotechnology & Biotechnological Equipment*. Vol. 29. Iss. 3 s. 457–462.
- BEN ELHOUL M., ZARA JAOUADI N., REKIK H., BEJAR W. 2015. A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 79 s. 871–882.
- BÖCKLE B., MULLER R. 1997. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63. Iss. 2 s. 790–792.
- BRADFORD M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol. 72 s. 248–254.
- DINESH R., SRINIVASAN V.T.E.S., ANANDARAJ M., SRAMBICKAL H. 2017. Endophytic actinobacteria: Diversity, secondary metabolism and mechanisms to unsilence biosynthetic gene clusters. *Critical Reviews in Microbiology*. Vol. 43. Iss. 5 s. 546–566.
- GHORBEL S., KAMMOUN M., SOLTANA H., NASRI M., HMIDET N. 2014. *Streptomyces flavogriseus* HS1: Isolation and characterization of extracellular proteases and their compatibility with laundry detergent. *BioMed Research International*. Vol. 2014. Article ID 345980 s. 18.
- GUPTA R., BEG Q.K., LORENZ P. 2002. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 59. Iss. 1 s. 15–32.
- HUI Z., DOI H., KANOUCHI H., MATSUURA Y., MOHRI S., NONOMURA Y., OKA T. 2004. Alkaline serine protease produced by *Streptomyces sp.* degrades PrP Sc. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 32. Iss. 1 s. 45–50.
- JANKIEWICZ U., KILISZCZYK A., RUSSEL S. 2012. Charakterystyka właściwości proteolitycznych dwóch wybranych szczepów bakterii z rzędu *Myxococcales*. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*. T. 12. Z. 3(39) s. 53–62.
- JANKIEWICZ U., MIROS E., GÓRSKA E., PRĘDECKA A., RUSSEL S. 2017. Aktywność proteolityczna keratynolitycznych bakterii *Stenotrophomonas rhizophila*. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*. T. 17. Z. 2(58) s. 103–110.
- KAMAL S., REHMAN S., IQBAL H. 2017. Biotechnological valorization of proteases: From hyperproduction to industrial exploitation – A review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. Vol. 36 s. 511–522.

- LI Q., YI L., MAREK P., IVERSON B.L. 2013. Commercial proteases: Present and future. FEBS Letters. Vol. 587. Iss. 8 s. 1155–1163.
- MEDEIROS G.M., BEZERRA R.P., TEIXEIRA J.A., SILVA F.O., CORREIA J.M., PORTO T.S., LIMA-FILHO J.L., FIGUEIREDO A.L. 2016. Screening, production and biochemical characterization of a new fibrinolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. (*Streptomycetaceae*) isolated from Amazonian lichens. Acta Amazonica. Vol. 46. Iss. 3 s. 1–8.
- MEHTA V.J., THUMAR, J.T., SINGH S.P. 2006. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. Bioresource Technology. Vol. 97. Iss. 14 s. 1650–1654.
- RAMESH S., RAJESH M., MATHIVANAN N. 2009. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614. Bioprocess and Biosystem Engineering. Vol. 32 s. 791–800.
- SCHREY S.D., SCHELLHAMMER M., ECKE M., HAMPP R., TARKKA M.T. 2005. Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytologist. Vol. 168. Iss. 1 s. 205–216.
- SEONG C.N., JO J.S., CHOI S.K., KIM S.W., KIM S.J., LEE OH., HAN J.M., YOO J.C. 2004. Production, purification, and characterization of a novel thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*. Biotechnology Letters. Vol. 26. Iss. 11 s. 907–909.
- SHARMA M., DANGI P., CHOUDHARY M. 2014. Actinomycetes: Source, identification, and their applications. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Vol. 3. Iss. 2 s. 801–832.
- SHILPA A.J., RAVAL H., HARNISHA P., DRASHTI D., ANKIT R., SEEMA P. 2015. Production and characterization of keratinolytic protease from *Streptomyces* sp. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Vol. 24. Iss. 5 s. 962–975.
- SUTHINDHIRAN K., JAYASRI M.A., DIPALI D., PRASAR A. 2014. Screening and characterization of protease producing actinomycetes from marine saltern. Journal Basic of Microbiology. Vol. 54. Iss. 10 s. 1098–1109.
- SWIONTEK BRZEZINSKA M., JANKIEWICZ U., WALCZAK. 2013. M. Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. International Biodeterioration & Biodegradation. Vol. 84 s. 104–110.
- TAVANO O.L., BERENQUER-MURCIA A., SECUNDO F., FERNANDEZ-LAFUENTE R. 2018. Biotechnological applications of proteases in food technology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol. 17. Iss. 2 s. 412–436.
- THUMAR J., SINGH. S.P. 2007. Two-step purification of a highly thermostable alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. Journal of Chromatography B. Vol. 854. Iss. 1–2 s. 198–203.
- TOUIOUI S.B., JAOUADI N.Z., BOUDJELLA H., FERRADJI F.Z., BELHOUL M., REKIK H., BADIS A., BEJAR S., JAOUADI B. 2015. Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from *Streptomyces* sp. strain AH4. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 31. Iss. 7 s. 1079–1092.
- VURUKONDA S.S.K.P., GIOVANARDI D., STEFANI E. 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. International Journal of Molecular Science. Vol. 19. Iss. 4 s. 1–26.
- XIN Y., SUN Z., CHEN Q., WANG J., WANG Y., LUOGONG L., LI S., DONG W., CUI Z., HUANG Y. 2015. Purification and characterization of a novel extracellular thermostable alkaline protease from *Streptomyces* sp. M30. Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 25 s. 1944–1953.
- ZHANG B., WU X., ZHANG W., CHEN X., ZHANG G., AI X., SUN L., ZHANG B., LIU G., CHEN T., DYSON P. 2016. Diversity and succession of actinobacteria in the Forelands of the Tianshan Glacier, China. Geomicrobiology Journal. Vol. 33. Iss. 8 s. 716–723.

Urszula JANKIEWICZ, Sebastian KOBLAK, Paweł WIERZCHOWSKI, Stefan RUSSEL

CHARACTERIZATION OF THE PROTEASE SYNTHESIZED BY *Streptomyces rimosus*

Key words: *Actinomycetes, protease inhibitors, proteolytic enzymes, temperature optimum*

S u m m a r y

The research was aimed at isolation and biochemical characterization of the extracellular protease synthesized by the soil *Streptomyces rimosus* and assessment of the possibilities of practical use of this enzyme in the industry. For this purpose, the test enzyme was isolated from 7 day old culture of *S. rimosus*. The enzyme two-fold purified was used for biochemical characterization for optimal temperature and pH of activity and activators and inhibitors of activity. The *S. rimosus* protease showed the highest activity at 50°C and at pH 7.5 and high thermostability at 50°C. Divalent ions such as Zn, Mo, Ni, Cd, Co caused inhibition while Ca and Mg stimulated activity. Strong inhibition of activity in the presence of diisopropylfluorophosphate (DFP) indicates that it is a serine protease. The activity of the test enzyme was stable in the presence of such detergents as Triton X-100, Tween 20, Tween 80, hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) and sodium dodecyl sulfate (SDS).

Adres do korespondencji: prof. dr hab. Stefan Russel, Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Falentach, Zakład Użytków Zielonych, al. Hrabka 3, 05-090 Raszyn; e-mail: s.russel@itp.edu.pl