

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

Биологически факултет

Катедра “Обща и промишлена микробиология”



Детелина Христова Петрова

**Биосинтеза, изолиране и охарактеризиране на колагенази от
мезофилни и термофилни актиномицети**

А в т о р е ф е р а т

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”

Професионално направление 4.3. Биологически науки

(Микробиология)

Научен ръководител

проф. дбн Стоян Влахов

София

2015

Дисертационният труд съдържа 202 страници на формат А4, 38 таблици и 48 фигури. В библиографската справка са включени 355 заглавия, от които 18 на кирилица и 337 на латиница. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра „Обща и промишлена микробиология на СУ „Св. Кл. Охридски“.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на Катедрения съвет на катедрата по Обща и промишлена микробиология към Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“, проведено на 20.04.2015 г и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед..... на Ректора на Софийски университет „Св. Кл. Охридски“.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от..... в Заседателната зала на Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“.

Материалите по защитата се намират на разположение на сайта на Биологически факултет и в катедрата по Обща и промишлена микробиология.

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

Биологически факултет

Катедра “Обща и промишлена микробиология”



Детелина Христова Петрова

Биосинтеза, изолиране и охарактеризиране на колагенази от мезофилни и термофилни актиномицети

А в т о р е ф е р а т

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”

Професионално направление 4.3. Биологически науки

(Микробиология)

Научен ръководител

проф. дбн Стоян Влахов

София

2015

Списък на използваните съкращения

ПФЕ – пълен факторен експеримент

ВАРНА. – N-алфа-бензоил- DL-аргинин-p-нитроанилид

pСМВ – 4-хлормеркурийбензоат

ДФР – диизопропилфлуорофосфат

EDTA – етилендиамин тетраоцетна киселина

IA - йодоацетамид

IAA – йодооцетна киселина

Leu - левцин

PMSF – фенилметилсулфонил флуорид

Pz-PLGPR – фенилазобензилоксикарбонил-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg

SDS-PAGE – натриев додецил сулфат полиакриламидна електрофореза

TLCK – натриев тозил-L-лизин-хлорметил кетон

TPCK - тозил-L- фенилаланил-хлорометил кетон

УВОД

Колагеназите са протеолитични ензими, които катализират хидролитичното разграждане на нативната тройно спирална структура на колагена, при физиологични стойности на рН и температура. Те намират широко приложение в различни области на живота, като хранително-вкусовата, фармацевтичната, козметичната, кожарската промишленост и др. В последните години колагенолитичната активност на тези ензими се използва широко в медицината, за клинично и терапевтично приложение. Колагеназите се използват за лечение на изгаряния и рани, за отстраняване на белези, играят важна роля в успешната трансплантация на специфични органи и често се прилагат за лечение на редица заболявания - фибрози, дискови хернии, артритни заболявания, бактериални вагинози, пародонтни състояния, туморни заболявания и много др. Затова е важно да се изучи добре природата на колагеназите и да се открият най-подходящите методи за тяхното изолиране и пречистване.

Продукцията на колагенази от бактерии е добре документирана и описана, но малко внимание е отделено на изучаването на стрептомицетите, познати основно като продуценти на антибиотици. Почвените стрептомицети участват активно в деградацията на белтъчни отпадъци в природата и притежават способност да синтезират комплекс от протеолитични ензими с широк спектър на действие. Тази особеност на стрептомицетите ги прави естествен резервоар на перспективни продуценти на колагенази.

Колагеназите описани до момента са изолирани основно от мезофилни микроорганизми и тяхното широко-машабно индустриално приложение е затруднено, тъй като техните ензими имат ниска термостабилност. В последните години, термофилните актиномицети се изучават интензивно с цел търсене на продуценти на нови термостабилни ензими. Тези организми са предпочитани за практическо приложение, поради високата термостабилност на продуцираните от тях ензимни комплекси, повишената скорост на растеж и интензивна акумулация на биомаса. Това определя като перспективно, търсенето на нови култури сред термофилните актиномицети, като продуценти на термостабилни колагенази, чието изолиране, пречистване и съхранение е по-лесно. До момента има само няколко публикации за колагеназни форми от термофилни микроорганизми. Всички те са бактериални продуценти на колагенази.

Колагеназите изолирани от актиномицети притежават свойства, с които може да изместят в някои направления известни колагенолитични препарати, тъй като разграждат нативния колаген в степен подходяща за лечение на редица заболявания, напр. препаратата "дисколизин", получен от щам на *Streptomyces* (Endo, 1986) се използва за лечение на дискова херния. Ето защо получаването на нови, полезни колагенази от аеробни, непатогенни, необразуващи токсини микроорганизми има своето значимо бъдеще. Високата индивидуалност на всяка колагеназа обуславя различен механизъм на ензимно действие, което ще разшири сферата на приложение на колагенолитичните ензими. В хода на тяхното изучаване могат да се разшифроват механизмите на редица заболявания свързани с хиперсекрецията на тъканните колагенази-възпаление на червата, стоматити гингивити, ревматоиден артрит, развитие на някои туморни процеси и много други.

Намирането на подходяща технологична схема за получаването на ензимен препарат с колагенолитично действие и изясняването на свързаните с нея физиологични аспекти може да доведе до повишаване на ензимното производство. Тези факти са предпоставка за провеждане на едно по-пълно и цялостно изследване върху разпространението на колагенолитичната активност сред актиномицетните щамове с цел получаване на високо активни продуценти на колагеназа.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е проучване на мезофилни и термофилни актиномицети за продукцията на колагенази, тяхното изолиране, пречистване и физикохимично охарактеризиране с оглед на практическото им приложение.

За постигане на целта си поставихме следните задачи:

1. Изследване на мезофилни стрептомицети за продукцията на извънклетъчни протеази
 - 1.1. Скрининг за протеолитична активност на мезофилни стрептомицети
 - 1.2. Подбор на шам-продуцент на колагеназа
2. Скрининг на термофилни актиномицети за колагенолитична активност
 - 2.1. Подбор на термофилен шам-продуцент на колагеназа
 - 2.2. Таксономична характеристика на термофилен шам-продуцент на колагеназа
3. Определяне на оптималните условия за продукцията на колагенази от мезофилния и термофилен шам-продуцент на колагенази
 - 3.1. Концентрация на споровата суспензия
 - 3.2. Количество и възраст на вегетативния посевен материал
 - 3.3. Температура на култивиране
 - 3.4. рН на хранителната среда
4. Влияние на компонентния състав на хранителните среди за култивиране на мезофилния и термофилен шам-продуцент на колагенази
5. Оптимизиране състава на ферментационната хранителна среда за култивиране на мезофилния и термофилен шам-продуцент на колагенази
6. Изолиране, пречистване и характеризиране на продуцираните колагенази от шамовете-продуценти
 - 6.1. Разработване на технологични схеми за пречистване на колагенолитични ензими до молекулна хомогенност
 - 6.2. Изучаване на физикохимичните характеристики на пречистените колагенази от шамовете продуценти

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микроорганизми
2. Хранителни среди
3. Режим на култивиране
4. Скрининг и оценка степента на активност на изпитваните актиномицетни шамове
5. Аналитични методи
 - 5.1. Метод за определяне на колагеназна активност на стрептомицетни шамове
 - 5.2. Определяне на Pz пептидазна активност
 - 5.3. Определяне на желатиназна активност
 - 5.4. Определяне на еластазна активност
 - 5.5. Определяне на кератиназна активност
 - 5.6. Определяне на белтъчно съдържание
 - 5.7. Разрушаване на мицел и получаване на безклетъчен екстракт
 - 5.8. Определяне на биомаса
6. Оптимизиране състава на ферментационната хранителна среда чрез математическото планиране на експеримента
7. Методи за изолиране на колагеназа
 - 7.1. Изолиране на колагеназа от мезофилния шам-продуцент
 - 7.2. Изолиране на колагеназа от термофилния шам-продуцент

8. Методи за пречистване на колагеназа

- 8.1. Ультрафилтрация
- 8.2. Лиофилизация
- 8.3. Утаяване с амониев сулфат
- 8.4. Хроматографски анализ
- 8.5. Електрофоретичен анализ

9. Физикохимични свойства на пречистените ензими

- 9.1. Определяне на рН оптимум и рН стабилност на пречистените колагенази от щам *S. cremeus* 3В
- 9.2. Определяне на рН оптимум и рН стабилност на пречистените колагенази от щам *T. sacchari* 21Е
- 9.3. Определяне на температурен оптимум и термостабилност на пречистените колагенази от щам *S. cremeus* 3В
- 9.4. Определяне на температурен оптимум и термостабилност на пречистените колагенази от щам *T. sacchari* 21Е
- 9.5. Изследване влиянието на различни инхибитори и йони върху колагенолитичната активност
- 9.6. Определяне на субстратната специфичност на пречистените колагенази

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Проучвания върху мезофилни стрептомицети - продуценти на извънклетъчни протеази

1. Скрининг на мезофилни стрептомицетни щамове за протеолитична активност

Изпитани са 51 мезофилни стрептомицетни щамове от колекцията на катедрата по Обща и промишлена микробиология за конститутивна биосинтеза на извънклетъчни протеолитични ензими. Изолирани са от почвени проби, взети от различни райони на страната и чужбина. За култивиране на щамовете е използвана течна среда Минерална 1 (Гаузе и сътр, 1957) с неорганичен източник на азот (KNO_3), инокулирана със споров материал от 14-дневни култури. За повечето щамове, секретирани извънклетъчни протеолитични ензими в културалната течност, максимална активност се достига на 96 h на култивиране. Активностите са определяни на млечен агар по дифузионния метод в агарова пластинка като в ямките е накапвано по 100 μl филтрат от културалната течност на щама. Резултатите показват, че само при 19 от проучените 51 мезофилни стрептомицети е установена извънклетъчна протеолитична активност. Останалите щамове не продуцират извънклетъчни протеази или синтезират следи от тях.

За по-нататъшни изследвания са избрани 14 щама, които показаха най-висока протеолитична активност (хидролизна зона над 10 mm). Тяхната ензимна активност е определена качествено като са използвани и сравнени следните два опитни варианта – метода на дифузия по диаметъра на просветлените зони в млечен агар и агар с β казеин при контрола трипсин (mg/ml). В ямките са накапвани по 100 μl културална течност, получена след 96 h култивиране на щамовете (**Фиг. 1**). При двата варианта на дифузионния метод се получават сходни резултати. Хидролиза на двата субстрата се наблюдава при всички щамове, като най-голяма е активността на пробите от щамове 3В и 444-К-Р.



Фигура 1. Протеолитична активност на изследваните мезофилни стрептомицетни щамове, определена на агар с β казеин при контрола Т (трипсин)

За количествен анализ на протеолитичните активности са използвани три спектрофотометрични метода, които взаимно се допълват. Измерена е тоталната протеолитична активност по метода на Ансон (PUK/mg), чрез отчитане на количеството тирозин, отделен от казеина в хода на реакцията. Този метод позволява определянето на хидролизата на всички пептидни връзки в протеини и пептиди до освобождаването на аминокиселини. Използвани са и метода на Kunitz (KU/mg), чрез който се определя хидролизата на пептидни връзки при хидрофобни аминокиселини като левцин, изолевцин и валин, както и метода с използване на специфичния за трипсин-подобните протеази синтетичен субстрат BAPNA. При трите анализа се получават сходни резултати-хидролиза на субстрата казеин се наблюдава при всички щамове, като най-висока е активността на пробите от щам 3B. Получените резултати ни дават основание за понататъшни проучвания да бъде избран щам 3B, показващ най-висока активност при всички използвани анализи. В предходни изследвания щам 3B е таксономично идентифициран като *Streptomyces cremeus* 3B (Кабаджова и Влахов, 1995).

2. Проучване на извънклетъчния протеолитичен комплекс синтезиран от *S. cremeus* 3B. Биохимична оценка на специфичните протеолитични ензимни активности

2.1. Специфичност на действие на протеазите синтезирани от *S. cremeus* 3B

За да изучим специфичността на действие на ензимите от протеолитичния комплекс синтезиран от щам *S. cremeus* 3B използвахме различни белтъчни субстрати.

Резултатите показват, че в използваните условия на култивиране щам *S. cremeus* 3B синтезира многокомпонентен протеолитичен комплекс, който включва протеази с широк спектър на действие. Отчетени са казеиназна, еластазна, колагеназна и желатиназна активност в културалната течност получена след 96 h култивиране на щама на среда Минерална 1 (Гаузе и сътр, 1957) без добавяне на индуктори. Общата протеолитична активност измерена спрямо субстрата казеин е 40 KU/ml, колагенолитичната активност - 502 ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h}$), еластолитичната активност - 18 (mg еластин/ml/h), а желатиназната активност - 110 (mg желатин/ml). Не е отчетена кератиназна активност. Щамът проявява висок афинитет към субстратите колаген и желатин, слаб към еластин и не може да разгражда кератин.

След направените първоначални проучвания върху субстратната специфичност на протеолитичния комплекс установихме, че щам *S. cretensis* 3В притежава присъщия за стрептомицетите богат набор от ензимни активности, от които голямо значение има ензима колагеназа.

2.2. Динамика в активностите на протеолитичните ензими от *S. cretensis* 3В

Изследванията върху динамиката и нивото на ензимната активност показват, че *S. cretensis* 3В продуцира колагеназа с много висока активност при растеж на среда Минерална 1 (Гаузе и сътр, 1957) в отсъствието на индуктор. Колагенолитичната активност измерена в културалната течност е функция от растежа на щама, появява се по време на ранната експоненциална фаза, като достига своя максимум в края на логаритмичната фаза и слабо се понижава през стационарната фаза на растеж. При повечето стрептомицети продуценти на колагенолитични ензими максимална активност е установена в края на логаритмичната фаза от растежа на щама (Kabadjova and Vlahov, 1995; Demina and Lysenko, 1996). Най-висока колагенолитична активност съответстваща на 525.10 $\mu\text{mol/L}$ -левцин/h/ml щамът достига на 72 h на култивиране (Табл. 1). През стационарната фаза на развитие се установяват другите протеолитични активности – желатиназна, еластазна и казеиназна активност. Високата степен на колагенолитично разграждане, конститутивната ензимна синтеза и максималните активности, които щам *S. cretensis* 3В достига за различните компоненти на протеолитичния комплекс, благоприятства схемата за очистване на колагеназа и показва, че притежава потенциал да се превърне в промишлен щам за получаване на препарат с колагенолитично действие.

Таблица 1

Протеолитични активности на щам *S. cretensis* 3В измерени в динамика на среда без индуктори (Минерална 1)

Ензимна активност на културалния филтрат	Динамика на култивиране (h)					
	24	48	72	96	120	144
Колагеназна активност ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h}$)	268.9	475.1	525.1	502.3	470	336.7
Казеиназна активност (KU/mg)	11.04	17.25	29.80	40.20	36.90	31.50
Еластазна активност (μg еластин/ml/h)	1.70	2.45	7.30	18.03	20.20	10.23
Желатиназна активност (μg желатин/ml)	19.50	63.08	87.20	110.05	120.5	93.04
Белтъчно съдържание (mg/ml)	0.32	0.44	0.60	0.66	0.62	0.52

II. Проучвания върху термофилни актиномицети - продуценти на ензими с колагенолитично действие

През последните години много изследователи се насочват към проучване на термофилни микроорганизми, като продуценти на термостабилни ензими, чието изолиране, пречистване и съхранение е по-лесно (Ignatova et al, 1999; Goshev et al, 2005). С цел търсене на термофилен продуцент на колагеназа, вниманието ни беше насочено към групата на термофилните актиномицети.

1. Доказване на колагеназна активност в почвени термофилни актиномицетни щамове

Изследвахме шест щамове почвени термофилни актиномицети с работни наименования 21E, 8E, 6E, 35E, 15E и СС, предоставени ни от д-р Гущерова (И-т по микробиология на БАН).



Фигура 2. Колагеназна активност на изследваните термофилни актиномицетни щамове (хидролизната зона, mm)

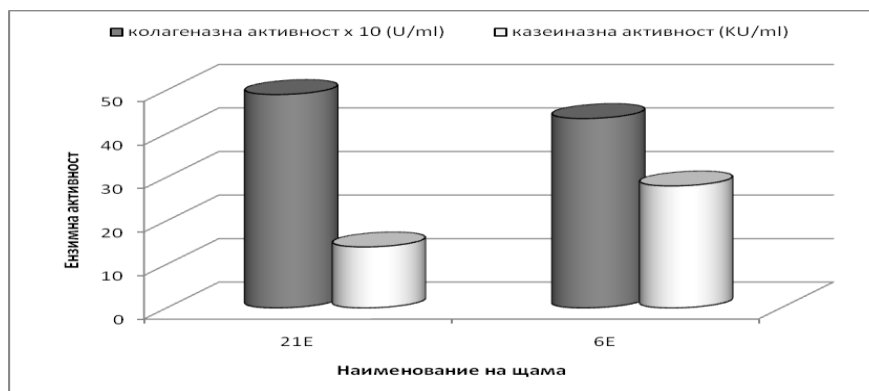
За оценка степента на колагенолитично действие култивирахме щамовете на течна минерално-солева среда (МС-1) за 48 h (Kosmachev, 1954). Активностите са определяни на агаризирана среда МС-1 с наличие на субстрата колаген по дифузионния метод в агарова пластинка, като в ямките е накапвано по 100 μ l от културалната течност на щам. Активността е определяна по диаметъра на зоните на хидролиза (mm). Установихме, че всички щамове притежават колагенолитична активност, тъй като активно разграждат колагеновите частици и ги хидролизират. От тях най-висока активност показаха щамове 21E с хидролизна зона - 25 mm и щам 6E с хидролизна зона – 20 mm (Фиг. 2).

2. Динамика на колагеназната активност на изследваните термофилни актиномицети

На следващия етап от проучването проведохме вторичен скрининг на термофилните актиномицети, чието колагенолитично действие е определено посредством ензимологичен анализ в динамика. Щамовете са култивирани дълбочинно на течна минерално-солева среда (МС-1) (Kosmachev, 1954) без добавяне на индуктор. От получените резултати установихме, че щамове 6E и 21E, които продуцират максимални количества ензим на 48 h от началото на ферментационния процес имат най-висока колагенолитична активност в сравнение с останалите щамове. Те показват и най-високите специфични колагенолитични активности в културалните си течности. От направените първоначални проучвания и въз основа на получените експериментални резултати са подбрани като перспективни два термофилни актиномицетни щамове 6E и 21E, показващи най-висока активност на колагеназа.

3. Сравняване на ензимните активности на щамове 6E и 21E

След сравнително изследване на филтрат от културалните течности на щамове 6E и 21E получени след 48 h култивиране на течна МС-1 среда (Kosmachev, 1954) са измерени стойностите на колагеназната и казеиназната ензимни активности съдържащи се в тях.



Фигура 3. Колагеназна ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h}$) и казеиназна активности (KU/ml) на 48 h културални филтрати на щамове 21E и 6E

Резултатите представени на **Фиг. 3** показват, че щам 21E притежава по-висока колагенолитична активност и два пъти по-ниска казеиназна активност от тази на щам 6E. Тъй като съотношението между колагеназната и казеиназната ензимни активности е по-благоприятно при щам 21E и тъй като щам 21E показва най-високата специфична колагеназна активност, получените резултати ни дават основание той да бъде предпочетен за по-нататъшни изследвания, като перспективен продуцент на извънклетъчна термофилна колагеназа.

4. Таксономично проучване на термофилния актиномицетен щам 21E

Хифният растеж характеризира щам 21E като актиномицетна култура. Установеното сегментиране на субстратния и въздушен мицел, оптимумът на растеж в температурния диапазон 55 - 60°C, формирането на спори, които притежават всички характеристики на бактериалните ендоспори и биохимичните свойства определят щам 21E като типичен представител на род *Thermoactinomyces*.

По литературни данни щамът е сравнен с видовете принадлежащи към род *Thermoactinomyces*. На базата на морфологичните, културални и физиолого-биохимични характеристики щам 21E показва най-голямо сходство с видовете *Thermoactinomyces vulgaris* и *Thermoactinomyces sacchari* (**Табл. 2**). Различията на щам 21E във вида на субстратния мицел, усвояването на арабиноза и хидролизата на скорбяла, отсъствието на тирозиназна активност и неспособността за хидролиза на ескулин и хипоксантин, както и наличието на растеж в присъствие на 5 % NaCl в сравнение с *T. vulgaris* ни позволяват да определим щам 21E като значително по-близък до вида *T. sacchari* отколкото до *T. vulgaris*. Получените резултати от таксономичното проучване на термофилния актиномицетен щам 21E ни дават основание да го определим като *T. sacchari* 21E.

Таблица 2

Сравнителна характеристика на морфолого-културалните и физиолого-биохимични свойства на щам 21 Е със сходни видове от род *Thermoactinomyces*

Признак	Щам 21 Е	<i>T. sacchari</i>	<i>T. vulgaris</i>
Въздушен мицел /ВМ/			
Наситен	-	-	+
Преходен /краткотраен/ Лизиз	+	+	-
Цвят на ВМ	наблюдава се на 3-и до 4-и ден бял или кремаво бял	бърз, до 3-ия ден бял	не се наблюдава бял
Субстратен мицел /СМ/			
Цвят на СМ	кремав, бежов до жълто бежов	безцветен до жълто кафяв	безцветен до кафяв
Спори			
Единични спори в/у въздушния/субстратен мицел	+	+	+
Спори – ендоспори с нагъната повърхност	+	+	+
Разтворим пигмент			
Жълто кафяв	-	-	-
Растеж в присъствие на новобиоцин /25µg.ml⁻¹/	+	+	+
Растеж при:			
30 °С	-	-	-
55 °С	+	+	+
Усвояване на С-източници			
D-фруктоза	+	+	+
L-арабиноза	+	+	-
L-рамноза	±	-	-
D-ксилоза	±	-	-
D-малтоза	-	няма данни	няма данни
D-манитол	+	+	+
D-глюкоза	+	+	+
D-рафиноза	±	-	-
Захароза	-	-	+
I-инозитол	±	-	-
Лактоза	-	няма данни	няма данни
Хидролиза на:			
Казеин	+	+	+
Желатин	+	+	+
Скорбяла	+	+	-
Целулоза	-	-	-
Арбутин	±	+	+
Хитин	-	-	-
Ескулин	±	+	няма данни
Тирозин	-	-	+
Ксантин	-	-	-
Хипоксантин	-	-	±
Аденин	-	-	-
Растеж на:			
NaCl (3%)	+	+	+
NaCl (5%)	+	+	-

III. Сравнителни проучвания върху условията за растеж и колагеназна активност на *S. cremeus* 3В и *T. sacchari* 21Е

1. Изследване за вътреклетъчна и извънклетъчна колагеназа

Проведено е паралелно изследване на колагеназната активност в културалната течност и супернатантата на клетъчни лизати от 48 h култура на щам *T. sacchari* 21Е и 72 h култура на щам *S. cremeus* 3В. Резултатите показват, че синтезираните от щамовете ензими с колагенолитично действие се секретират основно извънклетъчно в културалната среда, като относителният дял на извънклетъчния ензим от *S. cremeus* 3В е 80% от общото му количество, а на този от *T. sacchari* 21Е е 83%.

2. Влияние на възрастта и количеството на посевния материал върху растежа и колагенолитичната активност на *S. cremeus* 3В и *T. sacchari* 21Е

Извънклетъчната протеазна секреция от микроорганизмите се повлиява в голяма степен не само от компонентите съставлящи средата за култивиране, но и от културалните условия като рН, температура, скорост на аериране, количество на използвания инокулум (Lima et al, 2009). Според Lee and Lee (1994) съществува количествена връзка между формирането на посевния материал и синтезата на ензими. Експериментите са проведени, чрез изследване влиянието на различни концентрации спори за инокулиране на посевната среда, на различни количества и възраст вегетативен посевен материал върху растежа и колагенолитичната активност на *S. cremeus* 3В и *T. sacchari* 21Е. След направените изследвания получените резултати могат да се обобщят по следния начин: висококачествен вегетативен посевен материал за култивирането на щам *S. cremeus* 3В се получава при използване на 2% спорова суспензия с концентрация на спорите 10^6 - 10^7 спори/ml. Съставът на посевната среда е същият като този на ферментационната. Най-добри резултати се получават при засяване на ферментационната хранителна среда с 48 h инокулум в количество 10%. Висококачествен вегетативен посевен материал за култивирането на щам *T. sacchari* 21Е се получава при използването на 5% спорова суспензия с концентрация на спорите 10^7 - 10^8 спори/ml. Съставът на посевната среда е същият като този на ферментационната. Най-добри резултати се получават при засяване на ферментационната хранителна среда с 12-18 h вегетативен посевен материал в количество 5-10%.

3. Влияние на състава на ферментационната хранителна среда върху растежа и колагеназната активност на *S. cremeus* 3В и *T. sacchari* 21Е. Монофакторни експерименти.

Активността на ензима колагеназа може да се повиши чрез промяна в състава и количеството на компонентите на хранителната среда (Lima et al, 2009). За тази цел изследвахме влиянието на различни въглеродни и азотни източници върху колагеназната активност от щамове *S. cremeus* 3В и *T. sacchari* 21Е. Като основна хранителна среда при мезофилния щам беше използвана Минерална 1 (Гаузе и сътр, 1957), а при термофилния щам – минерално-солева (МС-1) среда на Kosmachev (1954). В тях последователно се заменят и изпитват самостоятелно различни въглеродни и азотни източници, в различни концентрации.

Таблица 3

Влияние на различни въглеродни източници върху растежа и активността на колагеназата от *S. cretensis* 3В

С източник	Концентрация (%)	Колагеназна активност ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h}$)	Биомаса (mg/ml)	Белтък (mg/ml)	Специфична колагенолитична активност ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h/mg}$)
Пентози					
Ксилоза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Арабиноза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Рамноза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Хексози					
Глюкоза	1.25	125	0.45	0.49	255.10
	2.0	-	-	-	-
Фруктоза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Галактоза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Маноза	1.25	153	0.32	0.50	306
	2.0	-	-	-	-
Дизахариди					
Захароза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Рафиноза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Лактоза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Малтоза	1.25	147	0.37	0.47	312.77
	2.0	-	-	-	-
Полизахариди					
Разтворима скорбяла	1.5	520	0.72	0.59	881.36
	2.0	570	0.83	0.62	919.35
Неразтворима скорбяла	1.5	395	0.66	0.52	759.62
	2.0	440	0.75	0.57	771.93
Декстрини	1.5	335	0.70	0.50	670
	2.0	395	0.81	0.55	718.18
Алкохоли					
Манит	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Инозит	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-

Максимално количество биомаса и най-висока колагенолитична активност на щам *S. cretensis* 3В са измерени на среда с въглероден източник 2% разтворима скорбяла. Захарите ксилоза, арабиноза, рибоза, рамноза, фруктоза, галактоза, лактоза, захароза, рафиноза, многовалентните алкохоли манит и инозит не могат да се използват като въглеродни източници от проучвания щам, защото той не ги усвоява. Глюкозата, манозата и малтозата в концентрация 1.25% се усвояват слабо и обезпечават под 26% от

колагенолитичната способност на щама, отчетена на среда с 2% разтворима скорбяла и приета условно за 100% (Табл. 3).

От данните за влиянието на различни въглеродни субстрати върху активността на колагеназата и натрупването на биомаса от шам *T. sacchari* 21E се вижда, че най-висока ензимна активност се установява след развитие на културата в среда с 1.5% разтворима скорбяла. Малтозата, захарозата и лактозата не могат да се използват като източници на въглерод от проучвания шам, защото той не ги усвоява.

Таблица 4

Влияние на различни въглеродни източници върху растежа и активността на колагеназата от *T. sacchari* 21E

С източник	Концен трация (%)	Колагеназна активност ($\mu\text{mol L-}$ Leu/ml/h)	Биомаса (mg/ml)	Белтък (mg/ml)	Специфична колагенолитична активност ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h/mg}$)
Пентози					
Ксилоза	1.25	82	0.39	0.42	195.24
	2.0	-	-	-	-
Рамноза	1.25	55	0.33	0.36	152.78
	2.0	-	-	-	-
Арабиноза	1.25	112	0.47	0.50	224
	2.0	-	-	-	-
Хексози					
Глюкоза	1.25	123	0.55	0.53	232.08
	2.0	-	-	-	-
Фруктоза	1.25	98	0.48	0.44	222.73
	2.0	-	-	-	-
Галактоза	1.25	76	0.30	0.51	149.02
	2.0	-	-	-	-
Дизахариди					
Лактоза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Захароза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Малтоза	1.25	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
Тризахариди					
Рафиноза	1.25	45	0.23	0.31	145.16
	2.0	-	-	-	-
Полизахариди					
Разтворима скорбяла	1.5	410	1.05	0.74	554.05
	2.0	345	1.2	0.84	410.7
Неразтворима скорбяла	1.5	310	0.85	0.78	397.44
	2.0	285	0.93	0.87	327.59
Декстрини	1.5	224	0.69	0.75	298.67
	2.0	293	0.75	0.82	357.32
Алкохоли					
Инозит	1.25	48	0.22	0.29	165.52
	2.0	-	-	-	-
Манит	1.25	118	0.59	0.50	236
	2.0	-	-	-	-

Захарите ксилоза, рамноза, галактоза, рафиноза и алкохола инозит в концентрация 1.25% се оказват неподходящи източници на въглерод, тъй като осигуряват едва 10-20% от колагенолитичната активност на щама, отчетена на среда с 1.5% разтворима скорбяла и приета условно за 100%. При култивиране на *T. sacchari* 21E на среди съдържащи 1.25% глюкоза, фруктоза, арабиноза и манит растежът на щама е слаб и се реализират под 30% от потенциалните възможности на щама-продуцент. По-високите концентрации на тези захари (2%) потискат растежа и развитието на щама (Табл. 4)

Таблица 5

Влияние на различни N-съдържащи съединения върху растежа и активността на колагеназата от *S. cretensis* 3B

N източник	Концентрация (%)	Колагеназна активност ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h}$)	Биомаса (mg/ml)	Белтък (mg/ml)	Специфична колагенолитична активност ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h/mg}$)
Неорганични азотни източници					
KNO ₃	0.05	444	0.53	0.58	853.85
	0.1	570	0.83	0.62	919.35
NaNO ₂	0.05	205	0.50	0.56	366.07
	0.1	259	0.71	0.66	392.42
Ca(NO ₃) ₂	0.06	293	0.35	0.66	444
	0.12	350	0.69	0.80	437.5
NH ₄ NO ₃	0.03	195	0.63	0.59	330.5
	0.06	241	0.95	0.69	349.28
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1	83	0.92	0.54	153.7
	0.2	102	1.10	0.65	157
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.1	81	0.93	0.52	155.77
	0.2	111	1.15	0.68	163.24
NH ₄ Cl	0.04	198	0.94	0.57	347.37
	0.08	269	1.12	0.69	390
N-съдържащи високомолекулни съединения					
Казаминови	0.1	-	-	-	-
киселини	0.3	-	0.29	0.12	-
Казеинов	0.1	218	0.72	0.64	340.625
хидролизат	0.3	253	0.85	0.82	308.54
Желатин	0.1	323	1.15	0.72	448.61
	0.3	455	1.36	0.98	464.29
Специфични N-съдържащи източници					
Нативен колаген	0.1	613	0.95	0.53	1156.6
	0.3	805	1.25	0.67	1201.5
Киселинно разтворим колаген	0.1	432	0.85	0.68	635.3
	0.3	765	1.05	0.85	900

От всички изпитвани специфични и неспецифични азот-съдържащи субстрати се оказва, че субстратът на ензимната реакция - нативният колаген създава най-благоприятни условия, както за растеж и развитие на щам *S. cretensis* 3B, така и за максимална колагенолитична активност. В нашите експерименти установихме, че при усвояването на 0.1% KNO₃ щам-продуцентът проявява 70% от потенциалните си възможности в сравнение със среда с нативен колаген и приета условно за 100%, но високата

специфична колагеназна активност го поставя на второ място по значимост след нативния колаген (Табл. 5). Останалите съединения се оказват неподходящи източници на азот.

Повечето описани в литературата продуценти на колагеназа синтезират извънклетъчно индуцируема колагеназа само в присъствието на високомолекулен белтъчен източник (Hamdy, 2008; Baehaki et al, 2012). Предварителните изследвания, показаха, че щам *S. cretensis* 3В може да синтезира колагеназа в условията на пълно отсъствие на белтъчен източник. Трябваше да проучим дали ензимната синтеза се индуцира под действието на някои комплексни органични съединения. Получените резултати показаха, че използването на тези съединения е неизгодно поради противоположния ефект, който оказват, те насочват синтезата към неспецифични протеази, тъй като измерената специфична колагеназна активност в културалната течност на щама е ниска.

Таблица 6

Влияние на различни N-съдържащи субстрати върху растежа и активността на колагеназата от *T. sacchari* 21E

N източник	Концентрация (%)	Колагеназна активност ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h}$)	Биомаса (mg/ml)	Белтък (mg/ml)	Специфична колагенолитична активност ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h mg}$)
Неорганични азотни източници					
KNO ₃	0.05	318	0.71	0.70	454.29
	0.1	350	0.80	0.75	466.67
NaNO ₂	0.05	219	0.70	0.65	336.92
	0.1	248	0.79	0.72	344.44
Ca(NO ₃) ₂	0.06	292	0.72	0.72	405.56
	0.12	315	0.85	0.78	403.85
NH ₄ NO ₃	0.03	193	0.86	0.60	321.67
	0.06	231	0.94	0.68	339.71
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1	195	1.08	0.63	309.52
	0.2	218	1.20	0.68	320.59
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.1	275	0.91	0.70	392.86
	0.2	270	1.02	0.77	350.65
NH ₄ Cl	0.04	212	0.96	0.65	326.15
	0.08	253	1.09	0.70	361.43
N-съдържащи високомолекулни съединения					
Казаминови киселини	0.1	225	0.75	0.64	351.56
	0.3	280	0.93	0.72	388.89
Казеинов хидролизат	0.1	380	0.80	0.80	475.00
	0.3	412	1.09	0.89	462.92
Желатин	0.1	441	0.95	0.83	531.33
	0.3	483	1.18	0.90	536.67
Специфични N-съдържащи източници					
Нативен колаген	0.1	742	0.92	0.80	927.50
	0.3	825	1.03	0.86	959.30
Киселинно разтворим колаген	0.1	600	0.89	0.79	759
	0.3	719	0.98	0.88	817.05

От изпитваните азот-съдържащи субстрати най-силен ефект върху активността на колагеназата от *T. sacchari* 21E оказва субстратът на ензимната реакция. Максимална ензимна активност е установена след култивиране на щама в среда с 0.3% нативен колаген. Всички останали азотни съединения се оказват неподходящи източници на азот за проучвания шам, защото обезпечават под 58% колагенолитична активност в сравнение с тази получена в среда с 0.3% нативен колаген и приета условно за 100% (Табл. 6).

В заключение може да се отбележи, че от изследваните неспецифични и специфични азот-съдържащи съединения най-силно стимулиращо действие върху колагеназната активност от двата проучвани щама оказва нативната форма на колагена. Използването на този субстрат е икономически неизгодно поради високата му търговска цена, а получаването му в лабораторни условия е трудоемък процес, криещ сериозни рискове за нарушаване целостта на нативната колагенова молекула. Това налага като азотен източник в средата за култивиране на шам *S. cremeus* 3B да се използва 0.1% KNO_3 , който в комбинация с разтворима скорбяла осигурява много висока конститутивна синтеза на колагеназа. В резултат на тези изследвания е избрана изходна хранителна среда в състав (g/l): KNO_3 -1.0, K_2HPO_4 -0.5, NaCl-0.5, $MgSO_4$ -0.5, $FeSO_4$ -0.001, разтворима скорбяла-20.0 осигуряваща висока колагенолитична активност от шам *S. cremeus* 3B.

Тъй като на този етап от проучванията не беше открит подходящ източник на азот за култивиране на шам *T. sacchari* 21E се наложи да се задълбочат изследванията в търсенето на азотен източник, гарантиращ нормално развитие на актиномицета и възможна максимална активност на колагенолитичен ензим. За развитието си термофилните актиномицети се нуждаят от добавянето на допълнителни хранителни субстрати към средата за култивиране, особено на смес от комплексни органични съединения, които са източници на азот и въглерод. Редица изследователи препоръчват средата за култивиране на термофилни актиномицети да съдържа екстракти от естествени субстрати - пептон, казеинов хидролизат, дрождев екстракт. Във връзка с това проучихме самостоятелното и комбинирано влияние на пет комплексни органични съединения (дрождев екстракт, пептон, царевичен екстракт, рибено брашно, соево брашно) най-широко използвани при култивиране на термофилни актиномицети.

В резултат на направените експерименти установихме, че комбинирането на пептон с царевичен екстракт, в концентрация 0.3% в хранителната среда (в съотношение 1:1) повишава ензимната синтеза и достига 67% от максималната получена на среда с нативен колаген. Измерената специфична ензимна активност е най-високата отчетена на този етап от проучването (64%). Комбинираното използване на останалите субстрати също води до повишаване на колагенолитичната активност, в сравнение с тяхното самостоятелно използване, но се оказва недостатъчно от гледна точка на измерената специфична колагенолитична активност на щама-продуцент, т.к. получените стойности показват, че синтезата е насочена към друг тип екзоензими.

Анализът на получените резултати ни дава основание да направим извод, че на този етап от проучванията, най-подходяща за култивиране на шам *T. sacchari* 21E е хранителна среда, която съдържа в качеството на азотни и въглеродни източници комбинация от пептон, царевичен екстракт и разтворима скорбяла. В резултат на направените проучвания е съставена емпирично хранителна среда за култивиране на шам *T. sacchari* 21E в следния състав (g/l): пептон-3.0, царевичен екстракт-3.0, NaCl-5.0, $CaCO_3$ -3.0, Na_2HPO_4 -1.0, $MgSO_4$ -0.5, разтворима скорбяла-15.0, на която се постига най-добро развитие на щама-продуцент и максимална колагеназна активност.

4. Оптимизиране на състава на ферментационните хранителни среди за култивиране на *S. cremeus* 3В и *T. sacchari* 21Е чрез метода на математическото планиране на експеримента

Определянето на оптималния състав на средата за култивиране е задължително условие и се извършва с помощта на математически методи, които позволяват не само едновременно да се изучи действието на няколко фактора върху синтезата на ензима, но и количествено да се определи степента на тяхното влияние. Оптимизирането на състава на хранителната среда на проучваните от нас щамове е осъществено чрез използване на математически метод за планиране на експеримента.

4.1. Оптимизиране на хранителната среда за култивиране на *S. cremeus* 3В

Изхождайки от установените данни за влиянието на различни азотни и въглеродни източници върху развитието и колагенолитичната активност на щам *S. cremeus* 3В е направен опит чрез метода на пълния факторен експеримент да бъде уточнен оптималния състав на култивационната среда.

През първия етап са варирани концентрациите на три от най-важните компоненти на хранителната среда - скорбяла (X1), KNO_3 (X2) и K_2HPO_4 (X3). Проведен е пълен факторен експеримент – ПФЕ (2^3), изследващ влиянието на тези три компонента на средата на две нива. След направената оптимизация от първия етап и полученото уравнение на регресия, което позволи продължаване по метода на стръмното нарастване (Box, Wilson, 1951) може да се отбележи, че е разработена ферментационна хранителна среда за получаване на максимална колагенолитична активност от *S. cremeus* 3В със следния състав (g/l): KNO_3 – 1.10, MgSO_4 – 0.5, NaCl – 0.5 K_2HPO_4 – 0.55, FeSO_4 – 0.001, скорбяла – 22.5.

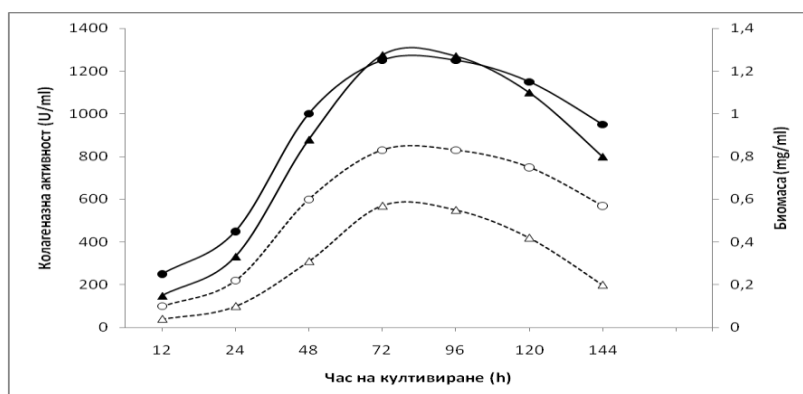
4.2. Оптимизиране на хранителната среда за култивиране на *T. sacchari* 21Е

За оптимизиране на хранителната среда за култивиране на *T. sacchari* 21Е е проведен пълен факторен експеримент- ПФЕ 2^4 с четири фактора: разтворима скорбяла (X1), пептон (X2), царевичен екстракт (X3) и CaCO_3 (X4) на две нива. В съответствие с уравнението на регресия и с резултатите, получени от първия и втория етап - метода на стръмното нарастване е установено оптималното количество на ingredientите на средата за култивиране на щам *T. sacchari* 21Е. Максимална активност на колагеназа от изследвания щам може да бъде получена при култивирането му в хранителна среда със следния състав (g/l): пептон – 5.0, царевичен екстракт – 5.0, NaCl – 5.0, CaCO_3 – 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.5, Na_2HPO_4 - 1.0, разтворима скорбяла- 10.

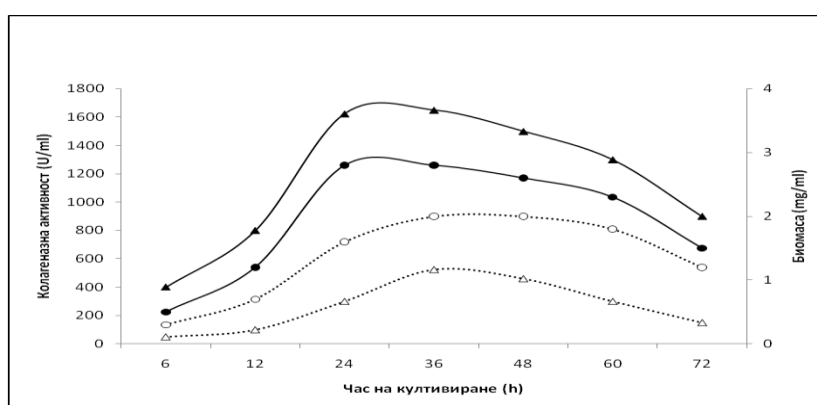
4.3. Сравнително изследване в динамика на растежа и колагенолитичните активности на *S. cremeus* 3В и *T. sacchari* 21Е при култивиране на изходната и оптимизираната хранителна среда

При проследяване динамиката на растежа и колагенолитичната активност от двата щам-продуценти установихме, че колагеназната активност е най-висока през интензивния период на растеж на щамовете. От **Фиг. 4** се вижда, че след направената оптимизация на хранителната среда за култивиране на *S. cremeus* 3В количеството на биомасата се е увеличило близо един път и половина. Активността на колагеназата измерена в началния етап на експеримента и след извършената оптимизация е увеличена два пъти, като достига най-висока стойност на 72 h на култивиране. Измерените специфични ензимни активности

в културалната течност на изходната среда и на оптимизираната са съответно: 919.35 μmol L-Leu/ml/h/mg и 1392.47 L-Leu/ml/h/mg, т.е. наблюдава се един път и половина повишение.



Фигура 4. Динамика на натрупване на биомаса на изходната (--○--) и на оптимизираната (-●-) хранителни среди и колагеназна активност (μmol L-Leu/ml/h) на изходната (--△--) и на оптимизираната (-▲-) хранителни среди от *S. cretensis* 3B



Фигура 5. Динамика на натрупване на биомаса на изходната (--○--) и на оптимизираната (-●-) хранителни среди и колагенолитична активност (μmol L-Leu/ml/h) на изходната (--△--) и на оптимизираната (-▲-) хранителни среди от *T. sacchari* 21E

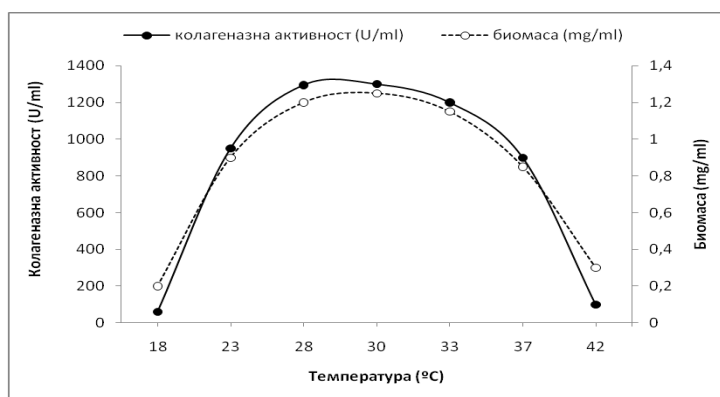
Резултатите от сравнителното изследване на растежа и колагеназната активност от щам *T. sacchari* 21E на изходната и оптимизирана хранителни среди са отразени на **Фиг. 5**. Най-високи нива на биомаса са измерени на 36 h от началото на култивационния процес, както на изходната, така и на оптимизираната хранителна среда. Биомасата след оптимизиране на средата се е увеличила един път и половина. Максимална колагеназна активност се отчита след 36 h култивиране на изходната хранителна среда, а след направената оптимизация е изместен часът на нейната максимална синтеза - 24 h (**Фиг. 5**). Установено е трикратно повишаване на общата и двукратно повишаване на специфичната колагенолитична активност - от 613.33 μmol L-Leu/ml/h/mg на изходната хранителна среда достига стойност 1225 μmol L-Leu/ml/h/mg на оптимизираната хранителна среда.

5. Влияние на температурата

Известно е, че температурата е един от най-критичните параметри, които трябва да бъдат контролирани в биопроцеса (Chi and Zhao, 2003). Затова проучването на нейното влияние е задължителен етап при оптимизиране на условията на култивиране и синтеза на ензими от микроорганизми.

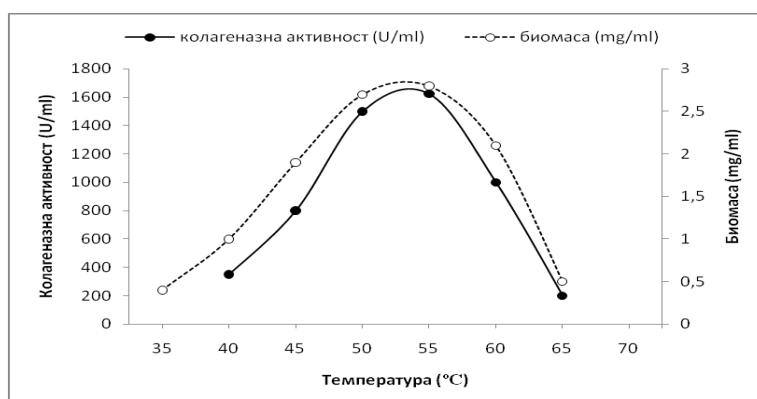
5.1. Влияние на температурата върху растежа и колагенолитичната активност на *S. cretensis* 3B

Максимално количество биомаса се установява при растеж на щама в температурен диапазон 28° - 33°C. Температури над 37°C се отразяват неблагоприятно върху растежните процеси. Промените в температурния режим оказват влияние и върху активността на ензима колагеназа. Оптималната температура за култивиране на щама-продуцент съвпада с максималната активност на колагеназа - 30°C (Фиг. 6)



Фигура 6. Влияние на температурния режим на култивиране върху колагеназната активност (U/ml – $\mu\text{mol L-Leu/ml/h}$) и растежа на *S. cretensis* 3B

5.2. Влияние на температурата върху растежа и колагенолитичната активност на щам *T. sacchari* 21E



Фигура 7. Влияние на температурния режим на култивиране върху колагеназната активност (U/ml – $\mu\text{mol L-Leu/ml/h}$) и растежа на *T. sacchari* 21E

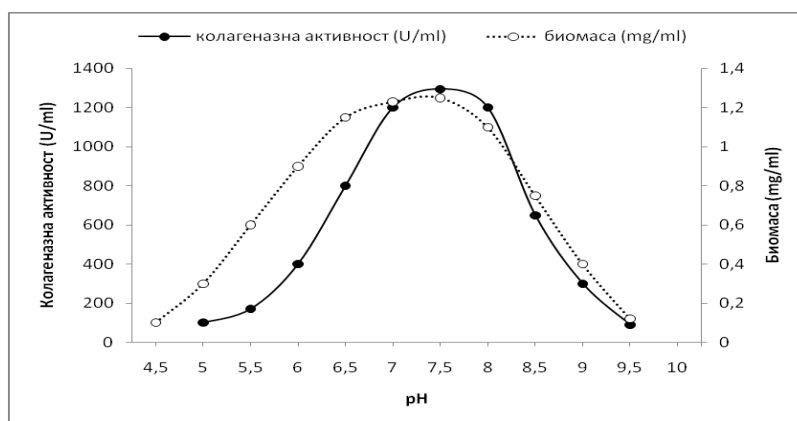
За изследване на температурните особености на щама култивирането е проведено в диапазон от 35° до 70°C. Получените данни са представени на Фиг. 7. Най-висока

колагеназна активност е установена след култивиране на щама-продуцент при температура 55°C. В температурен интервал 50° - 55°C се наблюдава оптимален растеж на щама. По-високите температури водят до постепенно понижаване на растежните процеси, като се наблюдава понижаване на ензимната активност. Тези резултати ни дават основание да определим проучвания актиномицет като термофилен микроорганизъм.

6. Влияние на рН на хранителната среда

Всеки микроорганизъм има свой рН-оптимум, при който се развива най-добре. Ето защо при оптимизиране на култивационния процес е необходимо да се проучат изискванията на шам-продуцента към рН на средата.

6.1. Влияние на рН върху растежа и колагенолитичната активност на *S. cretensis* 3В

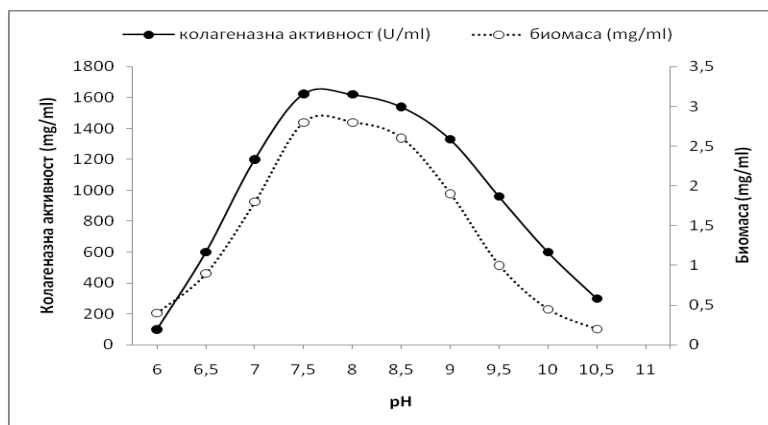


Фигура 8. Зависимост на колагеназната активност (U/ml– $\mu\text{mol L-Leu/ml/h}$) и растежа на *S. cretensis* 3В от рН на култивиране

Известно е, че повечето стрептомицети са неутрофили, като се развиват при рН 5.0 - 9.0 с оптимум близо до неутралната област. Изследването е проведено чрез култивиране на *S. cretensis* 3В в интервал на рН от 4.5 до 10.0. От **Фиг. 8** се вижда, че най-подходящите стойности на рН за растеж на щама и ензимна активност се намират в интервал на рН 7.0 – 8.0. При начална стойност на рН на средата 7.5 се създават оптимални условия за развитие на щама и максимална колагенолитична активност.

6.2. Влияние на рН върху растежа и колагенолитичната активност на *T. sacchari* 21Е

Влиянието на изходното рН на средата върху растежа и активността на колагеназата продуцирана от *T. sacchari* 21Е е проучено след култивиране на щама в диапазон на рН от 6.0 до 11.0. От **Фиг. 9** се вижда, че шамът показва данни за растеж и ензимна активност при долна граница на рН 6.0 и горна при рН 10.5. Стойности на рН 7.5 – 9.0 се оказват най-подходящи за развитие на *T. sacchari* 21Е, като оптималното рН, осигуряващо най-висока активност на ензима се намира в същия интервал. Максимална колагенолитична активност и биомаса в културалната течност на щама се наблюдават при рН 7.5.



Фигура 9. Зависимост на колагеназната активност ($U/ml - \mu mol L\text{-}Leu/ml/h$) и растежа на *T. sacchari* 21E от pH на култивиране

IV. Изолиране, пречистване и охарактеризиране на колагенази от *S. cremeus* 3B и *T. sacchari* 21E

1. Получаване на ензим с колагенолитично действие от щам *S. cremeus* 3B

1.1. Изолиране и пречистване на колагеназа от културалната течност на *S. cremeus* 3B

За получаване на ензимен препарат с колагенолитично действие е използвана културалната течност, получена след 72 h култивиране на щам *S. cremeus* 3B, при температура 30°C. Избраната от нас схема за изолиране и пречистване на ензима включва шест последователни етапа (**Схема 1**).

Първият етап от пречистването на ензима включва концентриране на отделената от мицела културална течност с едновременно отстраняване на нискомолекулните примеси и белтъци с молекулна маса под 50 kDa. Концентрирането е осъществено чрез тристепенна ултрафилтрация с помощта на Millipore ултрафилтрационна система, снабдена с мембрана Amicon с различен размер на порите 10, 30 и 50 kDa. Получените на всяко стъпало пермеат (P1, P2, P3) и концентрат (C1, C2, C3) са подлагани на анализ за колагеназна, еластазна, казеиназна активност и белтъчно съдържание. Чрез ултрафилтрационния метод е постигнато отделяне на съпътстващите ензими - казеиназа и еластаза, които се отстраняват с белтъчните фракции, притежаващи молекулна маса съответно между 10 и 30 kDa и между 30 и 50 kDa.

През втория етап от пречистването на ензима колагеназа, към концентрат (C3) от последното стъпало на ултрафилтрация е добавен $NH_4(SO_4)_2$ при 70% насищане. След престой от 12 h при 4°C суспензията се центрофугира при 20 000 об/мин за 60 min и диализира.

През третия етап от пречистването, диализираната проба е нанесена на колона с DEAE-Sephadex A-25 (2.2x50), калибрирана с 50 mM/L Tris-HCl буфер с pH 7.5, 4 mM/L $CaCl_2$. Елуирането на белтъчните фракции е осъществено с помощта на линеен градиент на 0.8 M/L NaCl, със скорост на потока 0.5 ml/min. На **Фиг. 10** е показан профилът на елуиране.

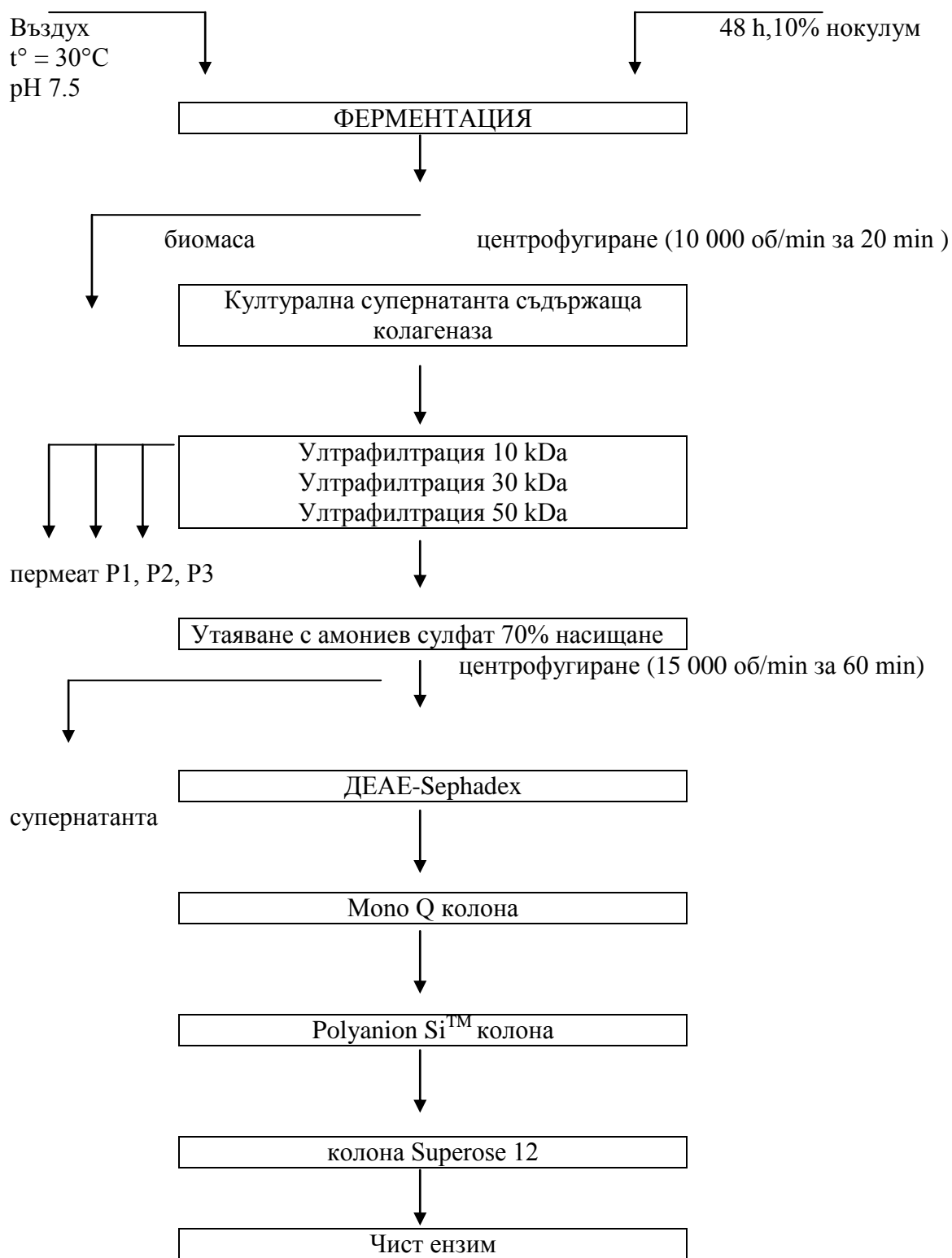
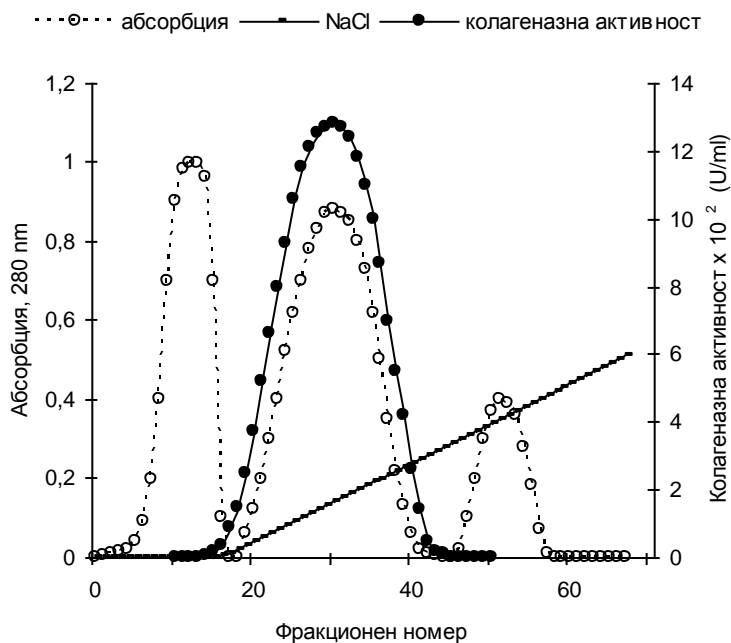
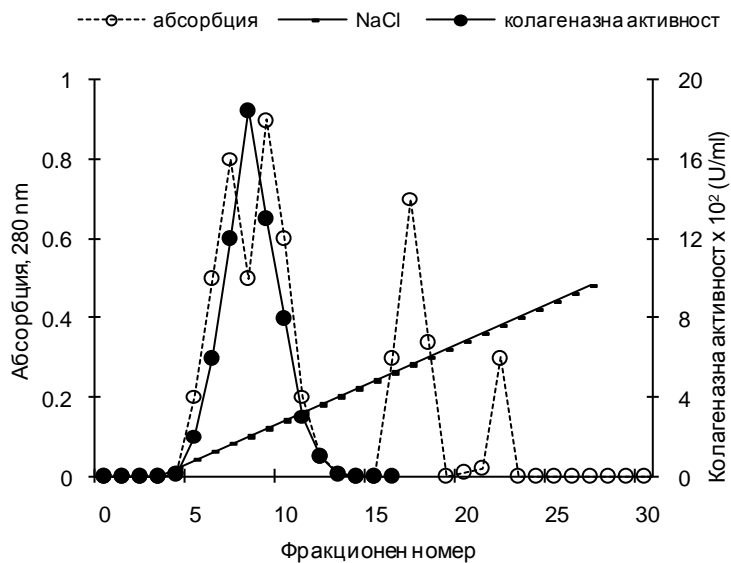


Схема 1. Схема за изолиране и пречистване на колагеназа от *S. cretensis* 3B



Фигура 10. Хроматография на колона DEAE-Sephadex A-25 на ензимната проба след насищане с амониев сулфат

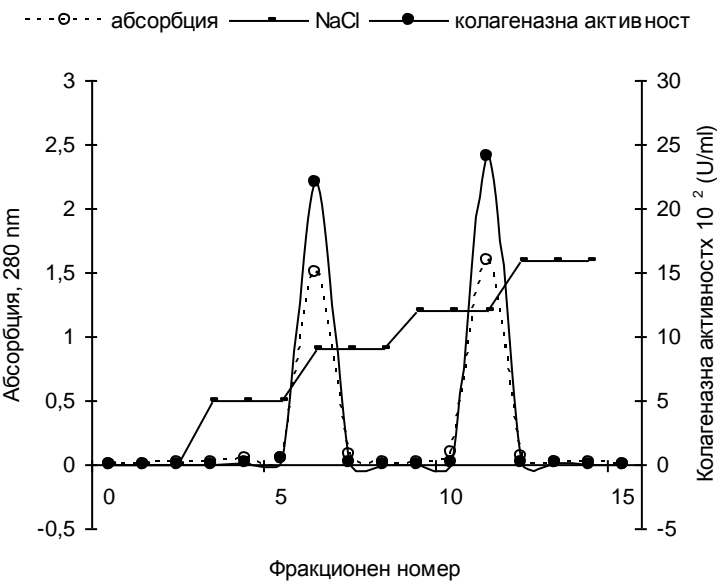


Фигура 11. FPLC хроматография на колона Mono Q на активната фракция след DEAE-Sephadex A-25

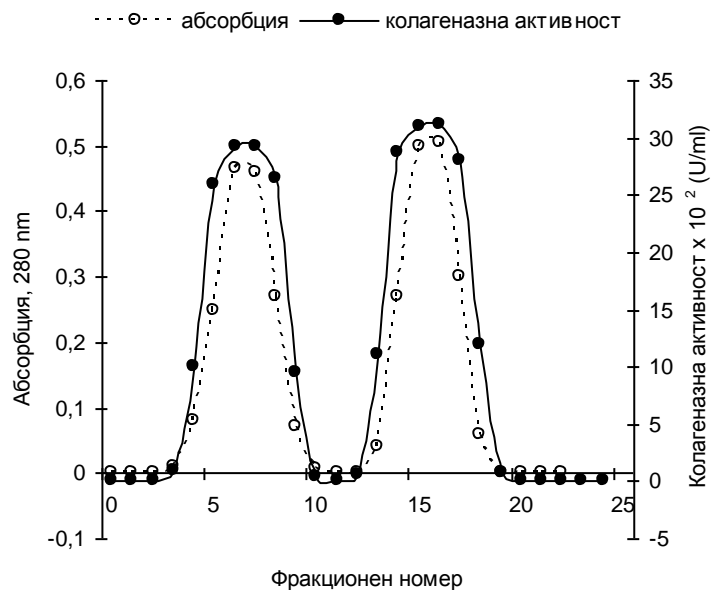
От нея се вижда, че активността на пробата се разпределя между три пика. Първият пик е неадсорбиран върху колоната и два адсорбирани пика. Висока колагенолитична активност е измерена само във фракциите от втория пик.

За да бъде изучен по-пълно синтезираният колагенолитичен ензимен комплекс, в следващия етап на пречистване са използвани предимствата на FPLC хроматографията като са оптимизирани няколко програмни метода. Използвани са два вида колони с носители Mono Q и Polyation SiTM. Активните фракции се подлагат на хроматографиране върху колона Mono Q, калибрирана с 25 mM/L Tris-HCl буфер, 4 mM/L CaCl₂ (pH 9.0). След елуиране на белтъчните фракции с линеен градиент на 1 M/L NaCl са получени четири белтъчни пика. Първите два пика, които притежават висока колагеназна активност имат близък заряд на молекулите и при тези условия не могат да бъдат разделени (**Фиг. 11**). Останалите два пика макар да имат по-добре изразен поляризационен профил не показват активност към субстрата колаген.

За да разделим добре комплекса от първите два пика се наложи да направим рехроматография при по-различни условия. Получените активни колагенолитични фракции се подлагат на разделяне на колона Polyation SiTM, калибрирана с 25 mM/L Tris-HCl буфер (pH 9.0), 4 mM/L CaCl₂. За пълно разделяне на комплекса от първите два пика, показващи колагенолитична активност, при хроматография на колона с Polyation SiTM се наложи да използваме стъпаловиден градиент на NaCl в 25 mM/L с насищане съответно 30%, 45%, 52% и 70%. От **Фиг. 12** се вижда, че е получено пълно разделяне на двата компонента на пиковите.



Фигура 12. FPLC хроматография на колона Polyaniion Si™ на активните фракции след Mono Q



Фигура 13. Гел-филтрационна хроматография на колона Superose 12

Резултатите от хроматографското разделяне на колагеназния ензимен комплекс се потвърждават и от гел-филтрационна колона със Sepharose 12, уравновесена с 67 mM/L фосфатен буфер с рН 7.4 и елуирана със същия буфер. Профилите на елуиране показват два пика, които притежават колагеназна активност (**Фиг. 13**). Те са означени като колагеназа I и колагеназа II.

Резултатите получени от отделните етапи на пречистване на колагенолитичните ензими от *S. cretensis* 3B са обобщени в **Табл. 7**.

Таблица 7

Етапи на пречистване на колагеназа от *S. cretensis* 3B

Етапи	Общ белтък (mg)	Колагеназна активност		Добив (%)	Степен на пречистване
		Обща (μmol L-Leu/ml)	Специфична (μmol L-Leu/ml/mg)		
Културален филтрат	2880	224 000	77.8	100	1
Ултрафилтрация 50 kDa	1390	178 000	128	79	1.65
Утаяване с 70% амониев сулфат	162	147 000	909	66	11.7
DEAE-Sephadex A-25	58	85 200	1470	38	18.9
Mono Q	17	34 000	2125	15	27.3
Polyaniion Si™	7.63	20 900	2740	9	35.2
Superose 12					
колагеназа I	3.18	10 650	3350	5	43.1
колагеназа II	3.47	12 500	3600	6	46.2

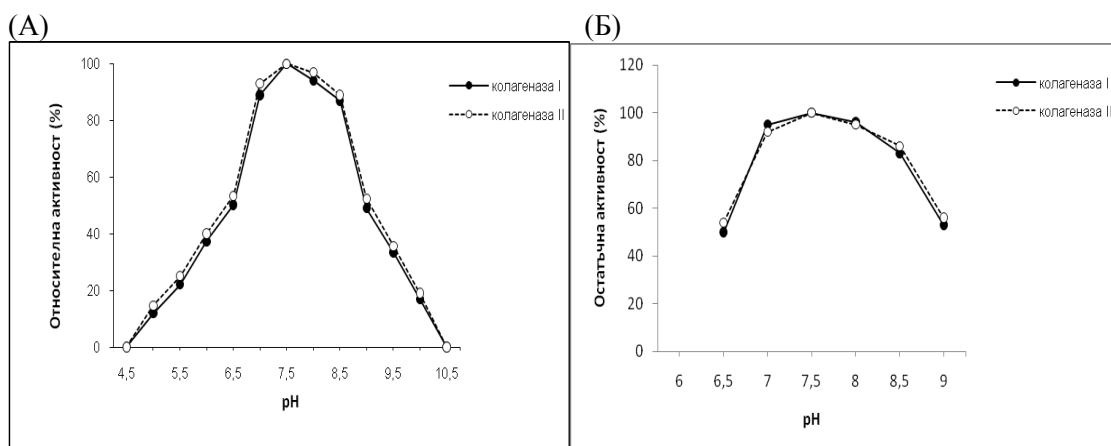
1.2. Свойства на колагеназа I и колагеназа II

1.2.1. Доказване на молекулната хомогенност и определяне на молекулните маси на пречистените ензими

Продуцираният от щам *S. cretensis* 3В колагенолитичен ензимен комплекс е представен от две активни колагенолитични фракции означени съответно като колагеназа I и колагеназа II, но с различно молекулно тегло. Молекулната хомогенност на колагеназа I и колагеназа II и определянето на молекулните им маси е осъществено с помощта на SDS-PAGE по метода на Laemmli, чрез добавяне на 0.1% желатин. От електрофореграмата се вижда, че на двата ензима отговаря по една белтъчна ивица, а измерените молекулни маси са приблизително 116 kDa и 97 kDa. Наличието на две колагенолитични фракции в културалната среда на *S. cretensis* 3В поставя въпроса дали те се явяват изоформи на колагеназата или пък са самостоятелни ензими отговарящи на различни типове колагенази. Резултатите до момента не са достатъчни за да се направят изводи в тази посока.

1.2.2. Определяне на рН стабилността и рН оптимума на действие колагеназа I и колагеназа II

Резултатите представени на **Фиг. 14 А** показват, че двете колагенази имат еднакви рН оптимуми на ензимно действие разположени в неутралната област. Ензимните реакции протичат с голяма скорост при стойности на рН от 7.0 до 8.5, като най-висока активност и за двата ензима се наблюдава при рН 7.5. Следователно колагеназите на *S. cretensis* 3В могат да бъдат отнесени към групата на неутралните протеази. Двете колагенази запазват повече от 50% от максималната си активност в интервал на рН между 6.5 и 9.0 след 30 min инкубиране на разтворите при различни рН стойности (**Фиг. 14 Б**).

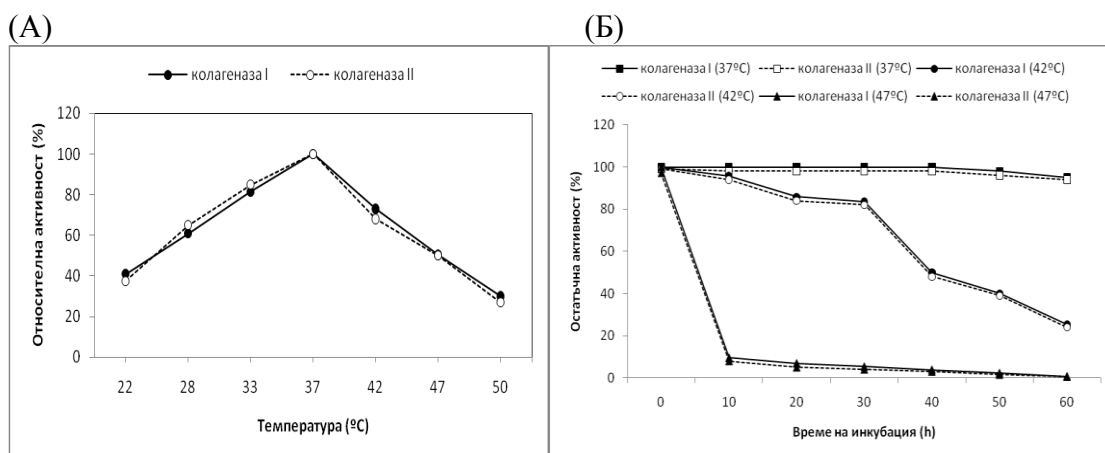


Фигура 14. рН оптимум (А) и рН стабилност (Б) на колагеназа I и колагеназа II

1.2.3. Определяне на термостабилността и температурния оптимум на действие на колагеназа I и колагеназа I

Изследването за определяне на температурния оптимум и термостабилността на колагеназа I и колагеназа II е осъществено в интервал от 18°C до 60°. В тези експерименти е използван желатин като субстрат, тъй като нативният колаген се денатурира при температури над 50°C. Температурата, при която колагеназите проявяват максимална

каталитична активност е 37°C (**Фиг. 15 А**). Температурната стабилност е определена чрез измерване на остатъчната активност след 60 min инкубация на ензимните разтвори в 10 mM/L Tris-HCl буфер (pH 7.5) при температури 37°C, 42°C и 47°C с помощта на нативен колаген като субстрат по стандартната методика.



Фигура 15. Температурен оптимум (А) и термостабилност (Б) на колагеназа I и колагеназа II

От **Фиг. 15 (Б)** се вижда, че двете колагенази показват добра стабилност в отговор на 60 min третиране при температура 37°C, като активността им се запазва напълно за дълъг период от време. След 40 min инкубиране при температура 42°C ензимната активност на двете колагенази спада приблизително с 50%. Пълна загуба на активност се наблюдава след 20 min инкубиране на ензимите при температура 47 °C.

1.2.4. Влияние на различни инхибитори и метални йони върху активността на колагеназа I и колагеназа II

За определяне чувствителността на колагеназа I и колагеназа II към различни инхибитори, разтвори на пречистените ензими се инкубират на стайна температура за 15 и 30 min в 10 mM/L Tris-HCl буфер (pH 7.5) с различни инхибитори или йони. Остатъчната активност е измерена като процент от активността на контролната проба без реагент. Резултатите показват пълно инхибиране на ензимната активност от EDTA и 1,10 “o”-фенантролин, известни като инхибитори на металопротеази. PMSF, DFP, TPCK, TLCK и пепстатин нямат инхибиращ ефект върху активността на колагеназите. Инхибиторите на сулфхидрилни протеази, IA, IAA и pCMB инактивират проучваните ензими в незначителна степен. Резултатите ни дават основание да отнесем колагеназа I и колагеназа II към семейството на металопротеазите (EC 3.4.24.3).

От бивалентните метални йони, пълен инхибиторен ефект оказват Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и Hg^{2+} . Силни инхибитори на ензимната активност са Sn^{2+} и Pb^{2+} , а Mn^{2+} - умерен. При наличие на Mg^{2+} , Co^{2+} и Ba^{2+} йони в инкубационна среда ензимната активност не се променя. Ca^{2+} се явява активатор на ензимното действие.

1.2.5. Субстратна специфичност на колагеназа I и колагеназа II

Колагеназа I и колагеназа II разграждат нативен колаген, киселинно разтворим колаген и желатин (**Табл. 8**), но нативният колаген (тип I) се оказва най-подходящ субстрат за двата ензима. Колагеназите показват висока активност към специфичния за

колагеназите синтетичен пептид Pz-PLGPR. Пречистените ензими не проявяват активност към субстратите казеин и еластин. Получените резултати потвърждават принадлежността на двете колагенази към групата на „истинските” колагенази.

Таблица 8

Субстратната специфичност на колагеназа I и колагеназа II (U/mg)

Субстрат	Колагеназа I	Колагеназа II
колаген, тип I	3351	3596
киселинно разтворим колаген	2831	2180
желатин	3168	2965
Pz-PLGPR	1560	2288

2. Получаване на термостабилна колагеназа от щам *T. sacchari* 21E

2.1. Изолиране и пречистване на колагеназа от културалната течност на *T. sacchari* 21E

Като изходен материал за изолиране и пречистване на ензима е използвана културалната течност на щама след 24 h култивиране, при 55°C. Избраната от нас схема за пречистване на термостабилна колагеназа включва пет последователни етапа (**Схема 2**). Първият етап представлява топлинно третиране на културалната супернатанта при 70 °C. Резултатите показват, че прилагането на 4 h топлинно третиране на културалната течност на щама при 70°C е най-подходяща като начален етап от процеса на изолиране и пречистване на термостабилна колагеназа. Активността на ензима се запазва около 90% и същевременно се освобождава от други неспецифични протеази - отстранява се цялата еластазна и около 80% от казеиназната активност. На следващия етап ензимът се концентрира с помощта на ултрафилтрационен метод, като се пропуска през мембрана с големина 20 kDa. След ултрафилтрацията, колагеназата се съдържа изцяло в концентрата. Третият етап от пречистването на ензима включва двустепенно утаяване на ензимния белтък с амониев сулфат. Към концентрата, получен от етапа на ултрафилтрация се прибавя амониев сулфат до 30 % насищане. След престой от 12 h при 4 °C суспензията се центрофугира при 15 000 об/min за 60 min. Получената утайка съдържаща високомолекулни белтъци се отстранява, а към супернатантата се добавя амониев сулфат до 70 % насищане. Суспензията престоява 16 h при 4 °C, след което се центрофугира при 15 000 об/min за 60 min.

Ензимната проба се обезсолява на гел-филтрационна колона Econo-Pac® 10 и се хроматографира на колона Sephadex G-75 (2.5 x 65) калибрирана с 10 mM/L Tris-HCl буфер, 4 mM/L CaCl₂ (pH 9.0). Елуирането на белтъчните фракции се проследява спектрофотометрично с Uvicord детектор чрез измерване на абсорбцията при 280 nm. Получената хроматограма има два пика. Колагенолитична активност е установена във втория пик (**Фиг. 16**). За концентриране на ензимния белтък, фракциите от втория пик се подлагат на 70% насищане с амониев сулфат. След престой от 16 h при 4 °C следва центрофугиране, супернатантата се отстранява. Полученият преципитат след обезсоляване на колона Econo-Pac® 10DG (BioRad) се рехроматографира на колона със Sephadex G-75 при същите условия. Колагеназата се елуира в един единствен пик (**Фиг. 17**). Обобщените данни от пречистването на термостабилна колагеназа от *T. sacchari* 21E са представени в **Табл. 9**.

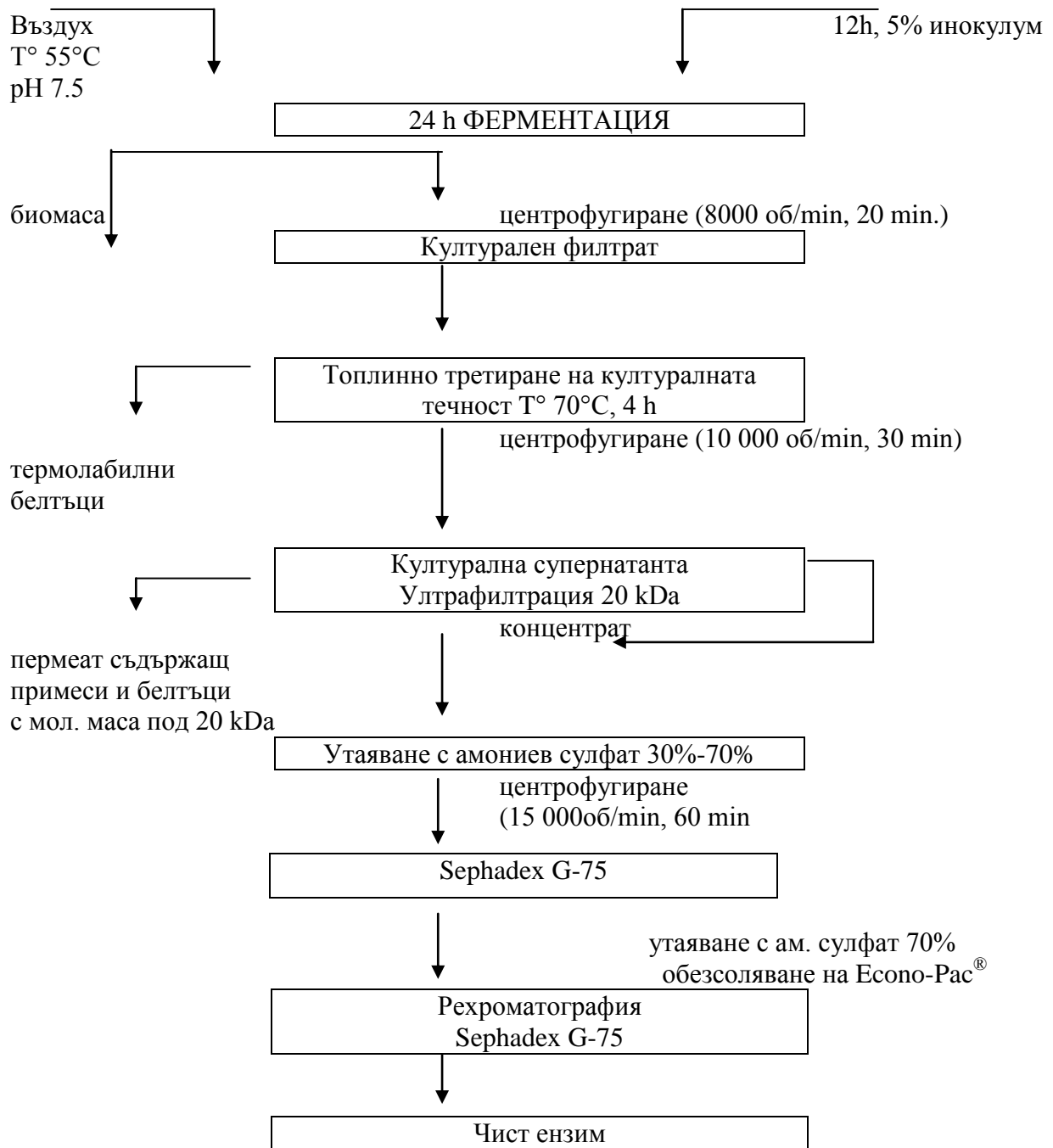
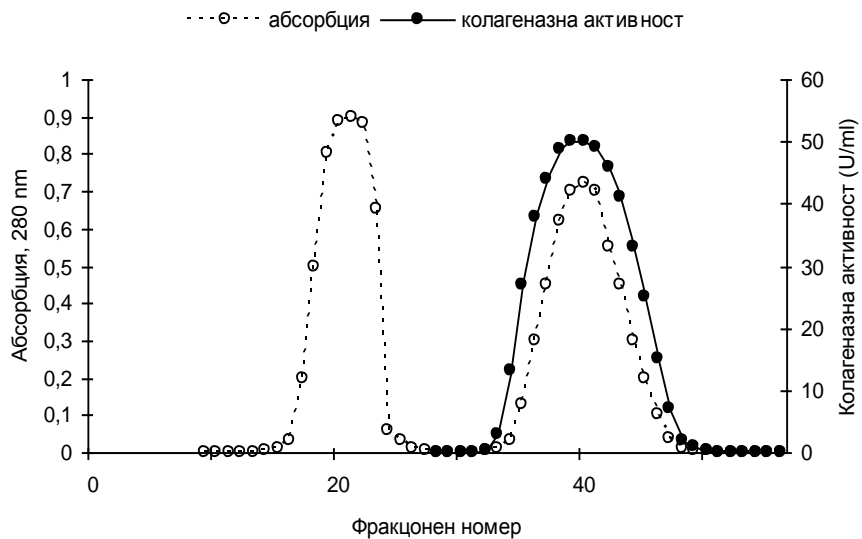
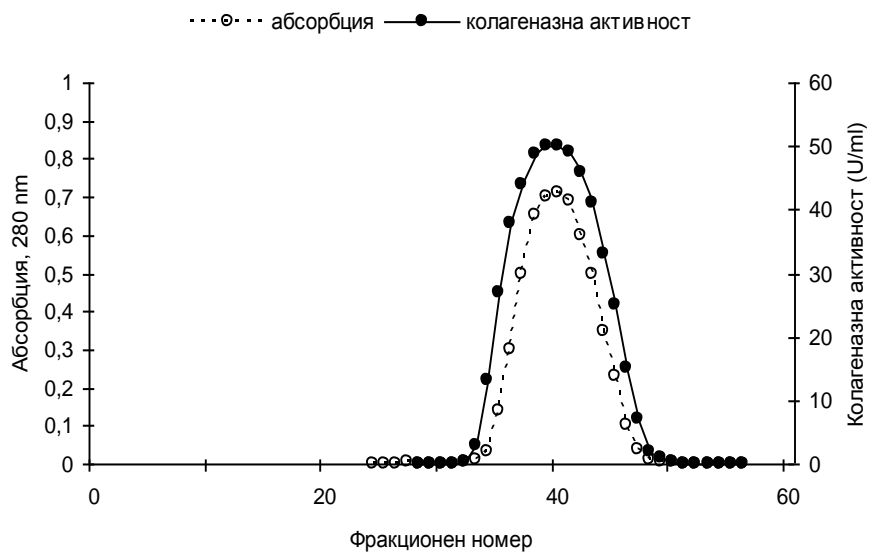


Схема 2. Схема за изолиране и пречистване на колагеназа от *T. sacchari* 21E



Фигура 16. Sephadex G-75 хроматография на колагенолитично активната фракция



Фигура 17. Рехроматография на Sephadex G-75 на колагенолитично активната фракция

Таблица 9

Етапи на пречистване на колагеназа от *T. sacchari* 21E

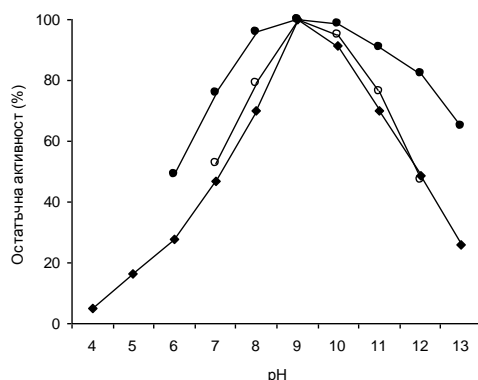
Етапи	Общ белтък (mg)	Обща колагеназна активност ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h}$)	Специфична колагеназна активност ($\mu\text{mol L-Leu/ml/h/mg}$)	Добив (%)	Степен на пречистване
Културален филтрат	7500	200000	26.7	100	1.0
Топлинно третиране на култ. филтрат (70°C, 4h)	3018.87	160000	53	80	2
Ултрафилтрация, 20 kDa (концентрат)	2047.78	150000	73.25	75	2.7
30-70% насищане с амониев сулфат	248	124000	500	62	18.7
Sephadex G-75	37.50	80000	2133.3	40	79.9
Рехроматография на Sephadex G-75	15.54	42000	2703.5	21	101.25

2.2. Свойства на пречистената колагеназа от *T. sacchari* 21E

2.2.1. Доказване на молекулната хомогенност и определяне на молекулната маса на пречистената колагеназа от *T. sacchari* 21E

Молекулната хомогенност на ензима е определена с помощта на 12.5 % полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE). На единичния пик, получен след рехроматографията, отговаря една единствена белтъчна ивица на полиакриламидния гел. Измерената молекулна маса на ензима е приблизително 50 кДа.

2.2.2. Определяне на рН стабилността и рН оптимума на действие на пречистената колагеназа от *T. sacchari* 21E

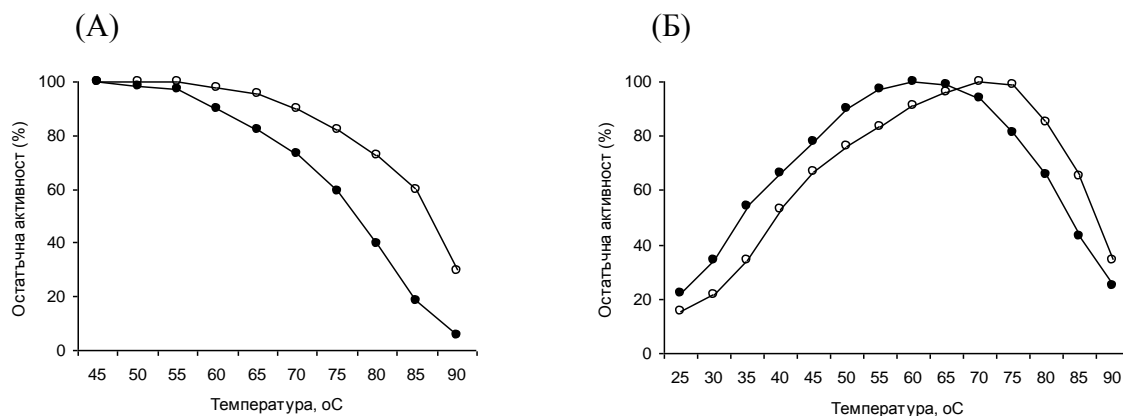


Фигура 18. рН оптимум (■) и рН стабилност: 1 h, 70 °C (●); 6 h, 70 °C (○) на пречистената колагеназа

Резултатите за определяне на рН оптимума и рН стабилността на действие на колагеназата от *T. sacchari* 21E са представени на **Фиг. 18**. От нея се вижда, че колагеназата проявява максимална каталитична активност при рН 9.0. Ензимът е стабилен в интервал на рН 7.5 – 12.5 след 1 h инкубация при 70 °С, тъй като запазва повече от 50 % от максималната активност. След по-продължително 6 h инкубиране колагеназата показва стабилност в интервал на рН от 8.5 до 10.5.

2.2.3. Определяне на термостабилността и температурния оптимум на действие на пречистената колагеназа от *T. sacchari* 21E

За определяне на температурният оптимум и термостабилност на ензима, в качеството на субстрат е използван желатин, тъй като нативният колаген се денатурира при температура над 50 °С. Изследването е проведено чрез вариране на инкубационната температура от 25° до 90°С. Известно е, че Ca^{2+} са един от факторите, които играят основна роля за термостабилността на много ензими (Coolbear et al, 1992; Wilson et al, 1993). Затова експериментите са изведени в два варианта: в отсъствие и в присъствие на Ca^{2+} .



Фигура 19. Температурен оптимум (А) и термостабилност (Б): в отсъствие (●) и в присъствие (○) на Ca^{2+} на пречистената колагеназа

Получените резултати показват, че колагеназата проявява максимална каталитична активност при 60° - 65°С в отсъствие на Ca^{2+} . В присъствие на 10 mM CaCl_2 максимална активност ензимът се измества и достига максимум при 70° - 75°С, което демонстрира термостабилизиращия ефект на Ca^{2+} (**Фиг. 19 А**).

Температурната стабилност на колагеназата е определена, чрез инкубиране на ензима в продължение на 30 min при различни температури. Изследването е проведено както в присъствие, така и в отсъствие на 10 mM CaCl_2 . Отчетена е остатъчната активност на ензима при 60 °С по класическата процедура. Пречистената колагеназа запазва над 80% от максималната си активност при достигане на инкубационна температура 65°С в отсъствие на Ca^{2+} . При наличие на 10 mM Ca^{2+} в инкубационната среда температурата, при която ензимът запазва 80% активност е 75°С. Приблизително 40% от максималната активност на колагеназата остава след инкубирането ѝ при 85°С в присъствие на Ca^{2+} (**Фиг. 19 Б**).

2.2.4. Влияние на различни инхибитори и метални йони върху активността на пречистената колагеназа от *T. sacchari* 21E

Колагеназата се инхибира напълно от PMSF и DFP. Това са едни от най-широко използваните инхибитори на серинови протеази. По-слаб инхибиторен ефект оказват TLCK и TPCK, инхибитори на трипсинови и химотрипсинови протеази. Соевият трипсинов инхибитор не влияе върху активността на ензима. Инхибиторите на сулфхидрилни протеази IA, IAA и pCMB, както и на металопротеази EDTA и “o“-фенантролин не инхибират активността на колагеназата. Тези резултати дават основание да предположим, че ензимът принадлежи към семейството на сериновите протеази.

В повечето случаи тестваните метални йони не оказват влияние върху ензимната активност (Ba^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+}). Някои от тях като Ca^{2+} , Mg^{2+} и Co^{2+} повишават и стабилизират колагеназната активност. От друга страна, Hg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{2+} йони предизвикват пълно инхибиране на ензима. Като умерен инхибитор се явява Zn^{2+} , който понижава активността на колагеназата с близо 50%.

2.3.5. Субстратна специфичност на пречистената колагеназа от *T. sacchari* 21E

От всички тествани белтъчни субстрати нативният колаген тип I се оказва най-подходящ субстрат за действието на ензима от *T. sacchari* 21E, макар че колагеназата хидролизира в най-голяма степен субстрата желатин (Табл. 10). Ензимът проявява сравнително висока активност към Pz-PLGPR пептида субстрат, който е специфичен за колагеназите. Пречистената колагеназа е неактивна към другия неразтворим белтък – еластин. Активността ѝ към казеина е незначителна. Редът на предпочитанията на термостабилната колагеназа към различните субстрати е следният: желатин > тип I колаген > Pz-PLGPR пептид.

Този анализ доказва, че пречистеният колагенолитичен ензим от *T. sacchari* 21E може да бъде отнесен към групата на “истинските” колагенази.

Таблица 10

Субстратна специфичност на колагеназата от *T. sacchari* 21E

Субстрат	Специфична колагенолитична активност (U/mg)
Нативен колаген (тип I)	2700
Киселинно разтворим колаген	2320
Желатин	3100
Pz-PLGPR	1890

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фактът, че стрептомицетите и термофилните актиномицети са безвредни почвени микроорганизми, срещащи се нормално в природни условия и не продуциращи токсини, често срещани при кластридиалните и други бактериални култури, прави продукцията на колагеназа от *S. cretensis* 3B и *T. sacchari* 21E атрактивни от клинична и индустриална гледна точка. *S. cretensis* 3B и *T. sacchari* 21E се култивират лесно, при аеробни условия и растат сравнително бързо за 72 h и 24 h съответно, където се наблюдава максимална активност на колагенолитичен ензим, а съпътстващите неспецифични протеази се отстраняват лесно чрез подходящи процедури, при които получаваме пречистени ензими с много високи специфични активности.

ИЗВОДИ

1. Конститутивна синтеза на извънклетъчни протеолитични ензими е присъща на 19 от скринираните 51 мезофилни стрептомицетни щамове.
2. Най-висока протеолитична активност притежава *S. cretensis* щам 3В, който синтезира многокомпонентен протеолитичен комплекс.
3. *S. cretensis* щам 3В синтезира конститутивно колагеназа с максимална продукция на 72 h на култивиране.
4. Най-подходящите източници на въглерод и азот за активността на колагеназата от *S. cretensis* щам 3В са съответно разтворима скорбяла и KNO_3 ; оптималната концентрация на споровата суспензия е 2%, 10^6 - 10^7 спори/ml; количеството и възрастта на вегетативния посевен материал е 10%, 48 h; изходното рН на средата – 7.5 и температурата на култивиране - 30 °С
5. Изолираните и характеризирани колагенази I и II от *S. cretensis* 3В имат температурен оптимум – 37 °С, рН оптимум - 7.5, инхибират се от инхибитори на металопротеази (EDTA и “o” фенантролин); постигната е степен на пречистване за колагеназа I – 43 и колагеназа II – 46 и добивът е съответно 5% и 6%.
6. Термофилният актиномицетен щам 21Е идентифициран на базата на морфологични и физиолого-биохимични признаци като *T. sacchari* синтезира екстрацелуларна колагеназа със сравнително висока активност и максимална продукция на 24 h на култивиране.
7. Най-подходящите източници на въглерод и азот за активността на колагеназата от *T. sacchari* щам 21Е са съответно разтворима скорбяла, пептон и царевичен екстракт; оптималната концентрация на споровата суспензия е 5%, 10^7 - 10^8 спори/ml; количеството и възрастта на вегетативния посевен материал 5-10%, 12-18 h; изходното рН на средата –7.5 и температурата на култивиране - 55°С.
8. Изолираната и характеризирана колагеназа от *T. sacchari* има температурен оптимум – 60-65°С, инхибира се от инхибитори на серинови протеази (PMSF и DFP); постигната е степен на пречистване - 101 и добивът е 21%.
9. Термофилната колагеназа от *T. sacchari* щам 21Е е с по-висока термостабилност от известните в литературата микробни термофилни колагенази. Тя запазва своята стабилност при температура 75°С в присъствие на Ca^{2+} .
10. На базата на физиолого-биохимичните свойства изолираните колагенази от *S. cretensis* 3В и *T. sacchari* 21Е се класифицират като истински колагенази, принадлежащи към семейството на колагенолитичните металопротеази за първия вид и към семейството на сериновите колагенолитични протеази за втория.

ПРИНОСИ

1. Установен е стрептомицетен щам *Streptomyces cremeus* 3В продуцент на конститутивна колагеназа с висока активност.
2. Разработени са достъпни и евтини методи за изолиране и висока степен на пречистване на колагенази от мезофилен стрептомицетен щам *Streptomyces cremeus* 3В и термофилен актиномицетен щам *Thermoactinomyces sacchari* 21Е.
3. За първи път се изолира, пречиства и характеризира термофилна колагеназа от вида *Thermoactinomyces sacchari*.
4. Предложени са оптимизирани хранителни среди за култивиране на щамове-продуценти на колагенази, които биха могли да се използват в подобни изследвания.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД И ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ ПО ТЯХ

1. **Petrova D., Shishkov S., Vlahov S. (2006). Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: purification and some properties. *Journal of Basic Microbiology*, 46 (4): 275-285 IF: 0.722**

Цитати:

1. Wang L., Cheng G., Ren Y., Dai Z., Zhao Z.-S., Liu F., Li S., Wei Y., Xiong J., Tang X.-F., Tang B. (2015) Degradation of intact chicken feathers by *Thermoactinomyces* sp. CDF and characterization of keranolytic protease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 3949-3959.
2. Bakheit S. E. A., Saadabi A. M. (2014). Antagonistic affects of Actinomycetes isolated from Tuti island farms (Central Sudan) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* a phytopathogenic fungus. *Int. J. Adv. Res.*, 2 (2), 114-120.
3. Duarte A. S., Correia A., and Esteves A. C. (2014). Bacterial collagenases. *Critical reviews in Microbiology*, 0, 1-21.
4. Kumar R., Biswas K., Soalnki V., Kumar P., Tarafdar A. (2014). Actinomycetes: Potential Bioresource for Human Welfare: A review. *Res. J. Chem. Environ. Sci.*, 2 (3), 5-16.
5. Lima L. A., Cruz Filho R. F., Santos J. G., Silva W. C. (2014) Production of collagenolytic protease by *Bacillus stearotermophilus* from amazonian soil. *Acta Amazonica*, 44 (4), 403-410.
6. Sharma A. K. and Beniwal V. Actinomycetes: Secondary metabolites, antifungal potential and iron regulation.
7. Maataoni H., Iraqui M., Ibsouda S., Haggoud A. (2013). Isolation and characterization of a *Streptomyces* strain endowed with antifungal activity. *J. Pure and Appl. Microbiol.* 7 (spec. issue), 23-24.

8. Abdel-Fattah A. M. (2013). Production and partial characterization of collagenase from marine *Nocardioopsis dassonvillei* NRC2aza using chitin wastes. Egypt Pharmaceut. J., 12, 109-114.
 9. Mohseni M. and Norouzi H. (2013). Antifungal activity of Actinomycetes isolated from sediments of the Caspian Sea. J. Mazand. Univ. Med. Sci., 23 (104), 80-87.
 10. Baehaki A, M.Suhartono, Sukarno, D.Syah, AB.Sitanggang, S.Setyahadi, F. Meinhard (2012). Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4. African Journal of Microbiology Research, 6 (10): 2373-2379
 11. Wu Q, C.Li, C.Li, H.Chen. (2010). Purification and characterization of a novel collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. Appl. Biochem. Biotechnol., 160: 129-139
 12. Liu L, M.Ma, Z.Cai, X.Yang, W.Wang. (2010). Purification and properties of a collagenolytic protease produced by *Bacillus cereus* MBL13 strain. Food Technol. Biotechnol., 48 (2): 151-160
 13. Bharti A, V.Kumar, O.Gusain, GS.Bisht. (2010). Antifungal activity of actinomycetes isolated from Garhwal region. J. Sci. Engg. & Tech. Mgt., 2 (2): 3-9
 14. Mukherjee J., N.Webster, LE.Liewellyn. (2009). Purification and characterization of a collagenolytic enzyme from a pathogen of the Great Barrier Reef sponge, *Rhopaloeides odorabile*. PLoS ONE, 4 (9): e7177 www.plosone.org
 15. Jain R, SC.Agrawal, PC.Jain. (2008-2009). Proteolytic actinomycetes from Indian habitats, Journal of culture collection, 6: 28-37.
 16. Мацелюх ОВ, ЛД. Варбанець. (2008). Колагенолитичні ферменти мікроорганізмів. Біотехнологія, том 1, № 3, 13-25
2. **Petrova D., Vlahov S. (2006). Optimization of the fermentation medium for cultivation of *Streptomyces cremeus* 3B- producer of extracellular collagenase. Comptes rendus de L'Academie bulgare des Sciences, 59 (5), 557-561**

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Петрова Д., С. Влахов Д. Иванова.** Влияние на въглеродни и азотни източници върху биосинтезата на колагеназа от щам *Streptomyces cremeus* 3Б. Ninth congress of the Bulgarian microbiologists with foreign participation. "Applied Microbiology and Virology", proceedings, vol. 2, 15-17 october 1998, Sofia

Изказвам искрени благодарности на моят научен ръководител проф. Влахов за помощта и подкрепата, която ми оказва при разработването на дисертационния труд.

Изказвам дълбока благодарност на колектива на катедрата по Обща и промишлена микробиология за неocenимата помощ, ценните съвети и огромната подкрепа, която ми оказва при подготовката, оформянето и реализирането на настоящата дисертация.

Сърдечно благодаря на всички колеги и приятели за тяхната помощ и подкрепа.