

ПРОТЕОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мікробні протеолітичні ферменти гідролізують різноманітні білкові субстрати. В роботі зібрано дані щодо здатності деградувати білки ферментами, виділеними з різних груп мікроорганізмів – бактерій, грибів, актиноміцетів та дріжджів. Розглянуто фізико-хімічні властивості, методи виділення і очистки ферментних препаратів протеаз. Проаналізовано існуючі і можливі шляхи використання цих ферментів у промисловості і медицині.

Ключові слова: протеолітичні ферменти мікроорганізмів, фізико-хімічні властивості, методи виділення і очистки, практичне застосування.

Протеази являють собою клас ферментів, які відіграють важливу роль у фізіологічних процесах, що обумовлено їх високою активністю щодо різних білкових субстратів. Протеази залучені до таких біологічних процесів, як зсідання крові, контроль смерті клітини, диференціація тканин. Вони каталізують ряд процесів при пухлинних захворюваннях та під час інфекцій, які викликані мікроорганізмами і вірусами. Це робить протеази потенційною мішенню для створення нових фармацевтичних продуктів. Протеази беруть участь у катаболізмі білків, у синтезі гормонів і фармакологічно активних пептидів із попередників білків. Вони проводять високоспецифічну і селективну модифікацію білків, наприклад, активацію ферментів шляхом обмеженого протеолізу і участь у транспорті секреторних білків через мембрани. Поряд із цим, протеази є однією із трьох великих груп промислово важливих ферментів, що складає близько 60 % від загальносвітового продажу ензимів. Протеази широко використовують у різних галузях промисловості (м'ясопереробна, сироваріння, косметологія, миючі засоби тощо) і медицині.

Протеолітичні ферменти синтезуються практично всіма живими організмами: тваринами, рослинами і мікроорганізмами. В медицині на сьогодні здебільшого використовуються протеолітичні ферменти тваринного походження [2]. Але, природна сировина може містити інфекційні агенти, проонкогени, нуклеїнові кислоти, пріони. Тому значна частина сучасних наукових досліджень присвячена вивченню різноманітних ферментативних систем мікроорганізмів, в яких відмічені вище недоліки виражені меншою мірою. Короткий цикл розвитку бактерій, довготривале зберігання ферменту без втрати його активності та відсутність перешкод під час очистки, все це робить мікроорганізми перспективними продуцентами ферментів для промисловості і медицині.

Джерела виділення протеаз. В рослинах протеолітичні ферменти містяться як в вегетативних органах – листках, стеблах, коренях, так і в проростаючому насінні. Найбільш детально вивчені ферменти соку і плодів тропічних рослин. Так, тілову протеазу папайн екстрагують з латексу зелених плодів динного дерева (*Carica papaya*), що росте в субтропіках західної і центральної Африки, а також в Індії. Неочищений препарат ферменту має широку специфічність дії, яка обумовлена наявністю декількох ізозимів протеїназ і пептидаз. Фермент активний в діапазоні рН 5-9 і стабільний при температурі до 80-90 °С. Використовують цей фермент в косметології, офтальмології, для лікування шлункових захворювань, для отримання високорозчинних білкових гідролізагів. З латексу рослин роду *Ficus* отримують інший фермент – фіцин, а з родини бромелевих (*Bromeliaceae*) та зі стебел і соку ананасів (*Ananas comosus* L.) – бромелаїн, та інші [62, 76, 94].

Протеолітичні ферменти секретуються також у різних органах тваринного організму і відіграють важливу роль у протіканні всіх біохімічних реакцій. Найбільш відомі протеази тваринного походження: трипсин, ренін, хімотрипсин, пепсин і катепсин. Трипсин – протеолітичний фермент, що виділяється підшлунковою залозою у вигляді трипсиногена, який автокаталітично активується при рН 7-9 або при дії ентерокинази, яка виробляється слизо-

вою оболонкою тонких кишок. Трипсин не є ферментом первинної дії, тобто, або зовсім не розщеплює нативні білки, або діє на них слабо і повільно. Білки, денатуровані нагріванням, обробкою кислот, солей, лугів та пепсином, легко піддаються дії трипсину. Трипсин гідролізує зв'язки (пептидні, амідні, складноєфірні), в яких карбоксильна група належить до основних амінокислот лізину і аргініну [35, 48]. Пепсин – фермент шлункового соку, що виділяється клітинами слизової оболонки шлунку у вигляді неактивного пепсиногену, в присутності соляної кислоти активується і перетворюється в пепсин. Пепсин є ферментом первинної дії, тобто розщеплює майже всі нативні білки. При тривалій дії гідролізує близько 30 % пептидних зв'язків амінокислот, що містять ароматичні кільця в боковому ланцюзі і вільні карбоксильні групи. Пепсин не діє на кератин, протаміни та продукти гідролізу білків з низькою молекулярною масою. Розчин пепсину піддається повільному автолізу [99]. Катепсин – фермент, що знаходиться у вигляді катепсиногену у всіх тканинах тварин. В найбільшій кількості міститься в печінці, селезінці і нирках. Разом із ним присутній природний активатор зоокіназа, який можна відділити від катепсину. Катепсин діє на сполуки, які містять ароматичні амінокислоти, і гідролізує пептиди з N-кінця пептидного зв'язку. Звичайно катепсин каталізує гідроліз білків при автолізі клітин. В лужному середовищі він неактивний, оптимальний рН дії 4-5 [70].

Найбільш перспективним джерелом протеаз слід визнати мікроорганізми. Це викликано рядом факторів: необмеженістю джерел виділення, можливістю підбору умов біосинтезу і отримання суперпродуцентів шляхом селекції і генної інженерії, широким спектром субстратної специфічності ферментних комплексів, а також простотою і відносною дешевизною технологій.

Ферменти, що виділені з мікроорганізмів, характеризуються різноманітними фізико-хімічними властивостями і субстратною специфічністю. Це дозволяє використовувати їх в різних галузях промисловості і медицини. Багато широко розповсюджених мікроорганізмів секретують значну кількість протеолітичних ферментів в навколишнє середовище і є екзоферментами, що значно полегшує задачу їх виділення і очистки. Можливість керувати утворенням ферментів за рахунок підбору відповідних поживних середовищ та умов культивування дозволяє не тільки збільшувати вихід протеолітичних ферментів, але і отримувати препарати з певними властивостями [84].

Продуценти протеолітичних ферментів знайдені серед найрізноманітніших груп мікроорганізмів: бактерій (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*), мікроміцетів (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*), актиноміцетів (*Streptomyces*, *Actinomyces*) [21, 22, 76]. На їх основі створено виробництво багатьох ферментних препаратів протеолітичної дії. Але найбільш активними продуцентами комерційних протеаз двох типів – нейтральної (з оптимумом рН ~ 7.7) та лужної (оптимум рН ~ 9.0) – є представники роду *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. licheniformis*). Серед мікроорганізмів-продуцентів протеаз, не менш важливе місце займають актиноміцети *Streptomyces* (*S. bradia*, *S. griseus*, *S. fradiospiralis*), які синтезують кислі, нейтральні і лужні протеази, що активні в діапазоні рН від 3 до 11, проявляють широку субстратну специфічність, але мають нижчі реакційні швидкості і менш термостабільні, ніж бактеріальні [4, 19, 16].

Останнім часом як потенційні продуценти були запропоновані галофільні бактерії, позаклітинні протеази яких були охарактеризовані, як перспективні щодо технологій ферментного каталізу [39, 83, 97]. Перевагою у використанні галофільних протеаз є їх висока стійкість до підвищеної іонної сили середовища, що супроводжує процеси осадження і денатурації білків [43, 44, 96].

Особливості мікробних протеаз та їх біологічні функції. До особливостей протеолітичних ферментів мікробного походження відносять малу кількість залишків сірковмісних амінокислот і, внаслідок цього, невелику кількість або навіть повну відсутність дисульфідних зв'язків в їх молекулах. Зовсім немає дисульфідних зв'язків у складі таких ферментів, як лужна та нейтральна протеаза *B. subtilis*, аспергілопептидаза *B. A. oryzae* та ряд інших ферментів. Молекула іншого добре вивченого ферменту – аспергілопептидази А з *A. saitoi* – містить один дисульфідний зв'язок.

Низький вміст дисульфідних зв'язків є спільною рисою екзоферментів бактеріального та грибового походження (амілази, протеази тощо). Припускається, що відсутність дисульфідних зв'язків в екзоферментах пов'язана з механізмом їх вивільнення з живої мікробної клітини.

У зв'язку з низьким вмістом дисульфідних зв'язків найбільше значення у підтримці третинної структури мають нековалентні зв'язки, які утворені неполярними (гідрофобними) боковими ланцюгами амінокислотних залишків. Підтвердження важливої ролі гідрофобних взаємодій у підтримці третинної структури субтилізину було отримано за допомогою рентгеноструктурного аналізу, який показав, що ядро молекули ферменту складається з щільно упакованих гідрофобних ланцюгів амінокислот.

Однією з особливостей мікробних протеаз є також стабілізуюча дія на фермент деяких іонів металів, особливо кальцію. Захисна дія кальцію показана щодо великої кількості бактеріальних та грибних протеаз, включаючи такі ферменти, як нейтральна протеаза *B. subtilis*, еластаза *P. aeruginosa*, колагеназа *S. griseus* та багато інших [22].

Найбільш важливою функцією екстрацелюлярних протеаз є гідроліз білків та інших високомолекулярних субстратів, які містяться в навколишньому середовищі, та перетворення їх у форму, яка здатна легко проникати всередину клітини. Тому більшість відомих протеаз мікроорганізмів функціонують як позаклітинні ферменти. Важливе значення екзопротеаз в забезпеченні клітин мікроорганізмів низькомолекулярними продуктами розщеплення білка знаходить підтвердження в багатьох експериментальних даних. Наприклад, було продемонстровано, що мутанти *Neurospora crassa*, які втратили здатність виділяти позаклітинну протеазу, не можуть використовувати білок як джерело азоту. В той же час у вихідних штамів синтез екстрацелюлярних протеаз пригнічується в присутності вільних амінокислот, що спостерігалося при синтезі позаклітинної протеази *B. megaterium* та у представників *Arthrobacter* [22]. Протеази відповідають також за руйнування клітинної оболонки та пригнічення росту інших мікроорганізмів. Такі ферменти називаються літичними, вони специфічні до зв'язків, які утворюються аланіном [13]. Протеази можуть виконувати захисні функції, наприклад, в інактивації шкідливих речовин [14]. Так, для збереження життєздатності культури бактерій *B. licheniformis* 749/C велике значення має синтез пеніциліназовивільняючої протеази, яка бере участь у секреції мембранозв'язаної пеніцилінази назовні клітини [31].

У деяких випадках зв'язок між утворенням позаклітинних протеаз та умовами культивування мікроорганізму носить складний характер. Так, за даними [68], утворення протеази *P. aeruginosa* пригнічується на середовищі з високим вмістом білка, який забезпечує найбільш інтенсивний ріст мікроорганізму. Можливо, що при високому вмісті білків в навколишньому середовищі, невеликої кількості позаклітинної протеази достатньо для забезпечення нормального розвитку мікробної культури. Іноді на середовищі, яке містить білок, протеаза утворюється не так інтенсивно, як на середовищі, яке містить еквівалентну кількість продуктів його розпаду. В ряді випадків максимальне виділення протеолітичних ферментів в навколишнє середовище відбувається на постлогарифмічній фазі розвитку культури. Такий характер виділення був показаний для *B. licheniformis* та *A. oryzae*. В таких випадках існує велика ймовірність, що виділення ферменту в навколишнє середовище є результатом автолізу частини мікробних клітин [85, 87].

Протеаза *B. licheniformis* не тільки не виділяється в зовнішнє середовище, але й не синтезується бактеріальними клітинами в логарифмічній фазі росту, а утворюється лише на стадії, яка передє спороутворенню. Ці дані дозволили зробити припущення, що протеолітичні ферменти відіграють певну роль в життєво важливих процесах клітини. Пізніше встановили, що аспорогенний мутант *B. subtilis* не має здатності синтезувати протеазу. Трансформація мутанта до спорогенного штаму приводить до повернення здатності синтезувати протеазу. Є експериментальні дані, які підтверджують участь бактеріальної екзопротеази в перебудові внутрішньоклітинних білків в процесі спороутворення [22].

Таким чином, позаклітинні протеази мікроорганізмів виконують різноманітні функції, тому їх виділення та досконале вивчення є однією з актуальних проблем біохімії мікроорганізмів.

Класифікація протеаз мікроорганізмів. Згідно з Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, протеази відносяться до 4 групи 3 підгрупи (гідролази) і утворюють підклас пептид-гідролаз, або протеаз.

Історично склалося, що протеолітичні ферменти групували декількома шляхами: на основі значень рН, при якому вони активні (кислі, нейтральні, лужні), за специфічною здатністю гідролізувати певні білкові субстрати (кератиназа, еластаза та ін.), або на основі подібності

до добре описаних протеаз, таких як пепсин, трипсин, хімотрипсин або катепсин ссавців. Ос-танній шлях часто виявляється оманливим і лише ускладнює можливість описання ферменту [71].

На сьогодні протеази класифікують, орієнтуючись на три критерії: тип каталітичної реакції, хімічна природа каталітичного сайту, зміни структури молекули в результаті еволюції [54].

Протеази по сайту розщеплення ділять на дві групи : ендопептидази та екзопептидази (рис. 1).

Екзопептидази не можуть гідролізувати пептидні зв'язки, що знаходяться в середині ланцюга, а лише послідовно відщеплюють кінцеві амінокислоти. Залежно від того, з якого кінця вони гідролізують пептиди, їх ділять на: N-кінцеві амінопептидази (КФ 3.4.11) та С-кінцеві карбоксипептидази (КФ 3.4.16-18). Здатність синтезувати амінопептидази зустрічається у широкого кола мікроорганізмів – бактерій та грибів, але ферменти представників різних таксономічних груп відрізняються за субстратною специфічністю, фізико-хімічними властивостями, молекулярними масами та іншим. В основному амінопептидази є внутрішньоклітинними ферментами, наприклад у *Yarrowia lipolytica*, але є й зовнішньоклітинні, наприклад *A. oryzae* [56, 98].

Карбоксипептидази бувають – серинові, цистеїнові, а також металокарбоксидази. Серинові карбоксипептидази (КФ 3.4.16) були ізольовані з представників *Penicillium*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, вони схожі за субстратною специфічністю, але різняться за фізико-хімічними властивостями. Металокарбоксидази (КФ 3.4.17) виділяють із *Saccharomyces* та *Pseudomonas*, ці ферменти потребують іонів цинку або кобальту для прояву активності. Прикладом цистеїнової карбоксипептидази є лізосомальний катепсин (КФ 3.4.18.1), який виділяють із тваринних тканин [70]. Карбоксипептидази можуть також відщеплювати пептиди, які містять приєднані небілкові групи.

Ендопептидази (КФ 3.4.21-25, КФ 3.4.99) розщеплюють пептидний зв'язок всередині пептидного ланцюга. Вони «впізнають» та зв'язують короткі пептидні послідовності субстратів та відносно специфічно гідролізують зв'язки між певними амінокислотними залишками.

Протеази класифікують також за механізмом дії. Залежно від будови функціональної групи каталітичного центру та послідовності амінокислот, що входять до складу ферменту, протеази поділяють на 4 групи: серинові, аспарагінові, цистеїнові (тіолові) і металопротеази. Кожна група позначається певною кодуючою літерою, яка визначає тип каталізу: S, C, A, M та U, що, відповідно, означає серинові, цистеїнові, аспарагінові, метало-, а також протеази з невідомим каталітичним механізмом [76].

Серинові протеази (КФ 3.4.21) виявлені в еукаріотичних і в прокаріотичних організмах, а також у вірусах. Ці протеази мають залишок амінокислоти серина в активному центрі. Каталітичний механізм (рис. 2) складається з двоетапної реакції гідролізу (ацилювання і деацилювання), в якому інтермедіат (комплекс фермент – субстрат) втрачає залишок амінокислоти або цілий пептидний фрагмент. Каталітичну тріаду складають залишки серину, гістидину та аспарагінової кислоти. Залишок серину являє собою нуклеофіл в реакції протеоліза і ацилюється, атакуючи карбонільну групу гідролізуючого пептидного зв'язку. Донором протону для звільненої NH-групи є залишок гістидину. Формування ковалентного зв'язку відбувається на стадії утворення негативно зарядженого інтермедіату. На стадії деацилювання (також за допомогою формування перехідного тетраедричного інтермедіату) проходить гідроліз ацильної похідної серину (з допомогою молекули води) з вивільненням пептиду і регенерацією активного центру ферменту. Первинна специфічність серинових протеаз зумовлена виключно залишками P1 (перша амінокислота від центру з N-кінця), а залишки в інших позиціях впливають на кінетичні параметри ферментативної реакції. Базуючись на первинній субстратній специфічності серинові ендопептидази поділяються на: 1) трипсинподібні, які розщеплюють зв'язки, утворенні виключно позитивно зарядженими амінокислотами, 2) хімотрипсинподібні, специфічні до великих гідрофобних залишків амінокислот, 3) еластазо-подібні, специфічні до малих гідрофобних залишків амінокислот [36, 55, 73, 80]. Відомо [3], що деякі з серинових протеаз інгібуються тіоловими реагентами. Це може свідчити про присутність цистеїнових залишків поблизу активного центру

ферменту. Серинові протеази в основному активні при нейтральних та лужних значеннях рН, з оптимальним дії між 7.0 та 11.0. Їх молекулярні маси коливаються від 15 до 35 кДа, але є й виключення: наприклад, молекулярна маса протеази *Blakeslea trispora* становить 126 кДа [51].

Мікробні *аспарагінові протеази* (КФ 3.4.23) поділяють на дві групи: 1) пепсиноподібні (з *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Neurospora spp.* [59, 88]); 2) рениноподібні (з *Endothia*, *Micor spp.* [34.]). В окрему родину виділяють вірусні протеази (наприклад, СНІДу), що називаються ретропепсини. Оскільки ці протеази активні при низьких значеннях рН, їх ще називають «кислими».

Кристаліграфічні дослідження дозволили продемонструвати, що активний центр аспарагінових протеаз побудований із двох залишків аспарагінової кислоти. Аспарагінові ендопептидази пепсинової родини мають двохдоменну структуру молекул з активним центром, що розташований між двома гомологічними долями. Кожен домен містить по одному залишку аспарагінової кислоти, яка є необхідною для прояву ферментативної активності. Залишки аспарагіну у більшості аспарагінових протеаз розташовані в послідовності Asp-Thr-Gly-Xaa (де Xaa – це Ser або Thr) в обох доменах ферменту. Ретропепсин несе лише один каталітичний залишок аспарагінової кислоти та потребує димеризації для активації ферменту.

Порівняно з сериновими та цистеїновими протеазами, розщеплення аспарагіновими протеазами не включає в себе утворення ковалентного інтермедіату (рис. 3). Нуклеофільна атака досягається за допомогою двох протонів, що одночасно переміщуються: один із молекули води до двох карбоксильних груп і другий від двох карбонільних киснів субстрату, конкуруючи з розщепленням CO-NH ланцюга.

Аспарагінові протеази інгібуються пепстатином. Вони також чутливі до діазокетонних сполук в присутності іонів міді. Мікробні кислі протеази виявляють специфічність до ароматичних амінокислот або амінокислот з великим радикалом [46, 76, 78].

Цистеїнові (тіолові) протеази (КФ 3.4.22) зустрічаються як у еукаріотів, так і у прокаріотів. Розрізняють близько 20 родин цих ферментів. Каталітичні властивості зумовлені наявністю послідовності Cys-His, причому порядок (Cys-His або His-Cys) різний у кожній родині. Найчастіше тіолові протеази активні в присутності відновлюючих агентів, таких як HCN або цистеїн, мають нейтральний рН-оптимум дії, але деякі з них (лізосомальні протеази) активні при кислих значеннях рН. Цистеїнові протеази каталізують гідроліз зв'язку між похідними карбоксикислот, що відбувається за рахунок подвійного переміщення, яке включає формування кислотно-основних похідних і гідроліз ацил-тіолових інтермедіатів (рис. 4). Ініціюючий етап каталітичного процесу включає нековалентне зв'язування ферменту із субстратом. Потім фермент ацилюється і звільняється перший продукт реакції – амін R-NH₂. На наступному етапі ацильований фермент реагує з молекулою води з вивільненням продукту реакції і регенерацією ферменту [29, 37, 72, 79].

В активному центрі *металопротеаз* (КФ 3.4.24) знаходиться двохвалентний іон металу, найчастіше Zn²⁺ (в деяких випадках він замінений на інші метали, такі як кобальт чи нікель), а також залишки гістидину і глутамінової кислоти. Виділяють близько 30 родин металопротеаз, з яких 17 містять ендопептидази (родина М1), 12 – тільки екзопептидази (М2) і 1 родина (М3) містить як ендо-, так і екзопептидази. Всередині цих родин утворюються різні клани (суперродини) залежно від природи амінокислот, які утворюють металзв'язуючий центр. За специфічністю дії, металопротеази поділяють на чотири групи: нейтральні (специфічні до гідрофобних амінокислот); лужні (мають широку специфічність); специфічні до невеликих за розмірами амінокислотних залишків (*Mycobacter* I); специфічні до залишків лізину (*Mycobacter* II). Механізм дії (рис. 5) металопротеаз відрізняється тим, що ці ферменти потребують присутності бівалентних катіонів і можуть інактивуватися під час діалізу або при додаванні хелатуючих агентів, таких як ЕДТА [69, 77].

Більшість металопротеаз містить фрагмент His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH), який формує металзв'язуючий сайт. Ця послідовність забезпечує цинк двома гістидиновими лігандами, в той час як третій ліганд зв'язаний з глутаміновою кислотою (термолізін, аланіламінопептидаза) або гістидином (астацин, серралізін) [65].

Найбільш відомими представниками нейтральних металопротеаз є термолізін *B.*

stearothermophilus [67], колагеназа *Clostridium histolyticum* [12, 53, 89] і *Achromobacter iophagus* [93], еластаза *P. aeruginosa* [52].

Лужні протеази, які виділяють з *P. aeruginosa* і *Serratia sp.*, активні при рН 7-9 [61]. Протеази *Mucobacter I* також проявляють максимум активності при рН 9.0 [76].

Вважається, що найбільш задовільну схему класифікації протеаз, яка базується на каталітичному механізмі і ухвалена Enzyme Commission classification запропонував Хартлі [54]. За цією класифікацією існує чотири типи різних протеаз, що відрізняються одна від одної чутливістю до різних інгібіторів (таблиця). Проте, деякі протеази, звичайно, інгібуються не тільки інгібіторами, специфічними для певного типу протеаз. Наприклад, похідні хлорметилкетону такі, як N- α -тозил-L-лізинхлорметилкетон (TLCK) та L-тозиламід-2-фенілетілхлорметилкетон (TPCK) та мікробний інгібітор лейпептин і антипаїн інгібують деякі серинові протеази, а також деякі цистеїнові протеази. Є частковий збіг останньої класифікації з тою, що базується на залежності активності від рН. Всі аспарагінові протеази є активними при кислих значеннях рН та більшість кислих протеаз відноситься до аспарагінового типу. Проте, було показано існування цистеїнових протеаз, які зазвичай активні при незначних кислих значеннях рН. Металопротеази активні в нейтральному середовищі, а серинові зазвичай більш активні при лужних значеннях рН. Але вважається, що терміни “кисла”, “нейтральна” та “лужна” протеаза треба використовувати лише стосовно рН оптимуму ферменту і не пов'язувати його з механізмом каталітичної дії.

Таблиця

Деякі властивості протеаз

Тип протеази	Специфічний інгібітор	Інші інгібітори	Активатори
Серинові протеази (ЕС 3.4. 21)	ФМСФ, ДПФФ	TLCK, TPCK, антипаїн, лейпептин хімостатин	—
Цистеїнові протеази (ЕС 3.4.22)	Йодацетамід, йод, ацетат, важкі метали, N-етилмалеїмід	<i>n</i> -хлоромеркурібензоат (також інгібітор для деяких серинових протеаз), TLCK, TPCK, антипаїн, лейпептин, хімостатин	Цистеїн, ДТТ, ЕДТА
Аспарагінові протеази (ЕС 3.4.23)	Пепстатин, ацетилпепстатин, метиловий ефір діазоацетилнорлейцин, епоксиди (р-нітрофенокси)пропан, N-діазоацетил-N'-2,4-динітрофенілетиллендіамін	—	—
Металопротеази (ЕС 3.4.245)	Хелатуючі агенти: ЕДТА, етиленгліколь, о-фенантролін, 8-гідросиквінолін, α , α -диперидил, фосфорамідон (для неокислих металопротеаз)	—	—

Примітка: ЕДТА – етилендіамінотетраацетат, ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид, ДПФФ – діпропілфторфосфат, TLCK - N- α -тозил-L-лізинхлорметилкетон, TPCK - L-тозиламід-2-фенілетілхлорметилкетон, ДТТ – дітіолтреїтол, “—”- немає даних.

Використання протеаз. Протеолітичні ферменти відіграють важливу роль в обміні речовин всіх живих організмів, починаючи від бактерій і нижчих грибів і закінчуючи вищими тваринами і людиною. Поряд із своєю основною функцією – розщеплення білків їжі до складових амінокислот, протеолітичні ферменти виконують ряд не менш важливих функцій. Наприклад, протеоліз білків лежить в основі таких процесів як зсідання крові та лізис тромбів, утворення ряду білкових гормонів (інсулін) і інших фізіологічно важливих пептидів. Будучи виділеними з мікроорганізмів, ферменти не втрачають здатності здійснювати каталітичну функцію, завдяки чому їх використовують в різних галузях промисловості [57].

Харчова промисловість. Суттєвим резервом збільшення обсягів продукції, покращання її якості, асортименту, біологічної цінності та вдосконалення смакових якостей в харчовій промисловості є включення в технологічні процеси різних ферментних препаратів.

Традиційно за допомогою протеаз отримують білкові гідролізати, які використовують в

якості поживних добавок в харчовій промисловості [23]. Ендопептидаза *H. halobium* S9, що специфічна до гідрофобних амінокислотних залишків, була рекомендована для усунення гіркоти в харчових продуктах [39]. В хлібопекарській промисловості використовують ферментні препарати, отримані з мікроміцетів, що відносяться до роду *Aspergillus*.

Найбільше значення при обробці м'яса мають ферменти еластолітичної та колагенолітичної дії, які широко розповсюджені серед видів *Bacillus*. В м'ясопереробній промисловості протеази бацил використовуються в процесі дозрівання м'яса та для збільшення виходу м'яса високих сортів на 40–43 % [8]. Для пом'якшення тканин м'яса використовують позаклітинні протеази із *B. subtilis* і *A. oryzae*, що діють на білки сполучної тканини, еластин і колаген, а також на міофібрилярні білки. Нейтральна позаклітинна протеаза бактерії *Variovorax paradoxus* має специфічність не тільки до казеїну, але і до фіброїну (білок шовку), в меншій мірі – до альбуміну і колагену [47].

Ферменти можна вносити наступними методами: посипати м'ясо порошком ферменту, помістити в ферментний розчин, за допомогою ін'єкцій. Пом'якшення м'яса при цьому головним чином проходить при тепловій обробці.

В рибній промисловості використання протеолітичних ферментів прискорює процеси засолки та дозрівання оселедця в 6–6,5 разів, сприяє більш рівномірному розповсюдженню солі по всій тушці. При обробці печінки риб протеазами збільшується вихід з неї жиру [8].

У виробництві сирів мікробні протеази мають велике значення, як замітники сичужного ферменту, виробництво якого потребує забою молодих телят та ягнят, і тому відрізняється високою собівартістю [87].

Препарат протеази *A. flavus* var. *columnaris* використовують в Таїланді для вироблення соєвого соусу [58].

У виробництві соків добре зарекомендували себе іммобілізовані протеази, які дозволяють видаляти з соку білкові сполуки, що надають розчинам мутність, але найбільш ефективними при цьому є протеази з оптимумом дії в слабо кислому середовищі (рН 4,5), які практично не зустрічаються серед представників роду *Bacillus*, але широко розповсюджені у дріжджів, наприклад представників роду *Yarrowia* [7]. Кислі протеази дріжджів використовують також для видалення винного осаду [62].

Медицина і фармакологія. Комплексні ферментні препарати широко використовуються в різних галузях медицини як протизапальні, протинабрякові та імуномодулюючі засоби. Основними компонентами комбінованих ензимних препаратів є гідролізуючі білок ферменти, які при введенні частково всмоктуються в кров та проявляють системний вплив на організм. Протеолітичні ферменти беруть участь не тільки в неспецифічному гідролізі білкових молекул, але й мають регуляторне значення, виконуючи біологічний контроль функцій органів та тканин в організмі. В реакціях обмеженого протеолізу за допомогою каскадного механізму вони регулюють такі важливі процеси, як звернення крові, фібриноліз, утворення та розпад пептидів, які контролюють тонус судин, артеріальний тиск, діяльність мозку [20].

Протеолітичні ферменти мають фібринолітичну і коагулазну дію, що може деякою мірою вирішити проблему створення тромболітичних препаратів [5, 75]. Перспективною в цьому плані стала гемолітична стафілокіназа та тіолзалежна серинова протеаза *B. intermedius* 3-19, однак використання таких препаратів на практиці ускладнюється наявністю в них пірогенної і антигенної дії [15].

Протеолітичні ферменти використовуються також для дезінтеграції сполучної тканини, отримання суспензії клітин або клітинних новоутворень, оскільки при збереженні життєздатності клітини необхідне вибіркоче руйнування позаклітинного матриксу без ушкодження поверхні живих клітин. Механічні засоби в даному випадку неефективні через високу стійкість матриксу порівняно з клітинами [24]. Група вчених запропонувала препарат, одержаний з *B. licheniformis* ZJUEL31410 з високою еластазною активністю [41, 42].

Протеолітичні (колагенолітичні та еластолітичні) ферменти мікроорганізмів можуть бути використані в медицині для терапії деяких захворювань печінки, грижі інвертебрального диску хребта, опіків, обморожувань, для прискорення відторгнення відмерлих тканин, трофічних виразок, для прискорення очищення гнійно-некротичних нальотів [18]. Виділені за допомогою мікробних протеаз життєздатні клітини острівків Лангерганса застосовуються для лікування діабету.

Протеолітичні ферменти застосовують в терапії опікових ран. В наш час широко використовують серинові протеази для лізису компонентів позаклітинного матриксу в зоні коагуляційного некрозу опікової рани [24, 30].

За допомогою протеаз можна також з успіхом лікувати розтягнення зв'язок колінного суглобу або розриву м'язів. А у пластичній хірургії ці препарати використовуються для більш швидкого загоєння та зменшення лінії рубця.

Терапія комплексними ферментними препаратами рекомендується при всіх запальних процесах ротової порожнини, а також після видалення зубів та операцій на їх корінні [24].

Високоочищені препарати протеаз знаходять своє застосування в приготуванні медичних діагностичних середовищ, лікувальних сироваток та вакцин, а також в ензимодіагностиці та ензимотерапії [9].

Протеолітичні комплекси є також незамінними в антибактеріальних засобах для обробки хірургічних інструментів та медичних поверхонь. Для реалізації цього завдання найбільш придатними є іммобілізовані ферменти, які завдяки своєму носію стають більш зручними у використанні [10, 27]. Показано, що іммобілізація протеолітичних ферментів дозволяє усунути недоліки, які властиві нативним протеолітичним ферментам [11]. Ефективність застосування матеріалу, що містить іммобілізований протеолітичний фермент, може бути збільшена також шляхом додаткового введення до цього матеріалу біологічно активних речовин іншого типу (наприклад антимікробних) [26, 28]. Так, деякі дослідники [6], пропонують при іммобілізації ферменту додавати сечовину, яка здатна підвищувати активність іммобілізованих протеолітичних препаратів, в той час як на нативні протеолітичні ферменти вона діє як сильний інгібітор.

Комплекс бактеріальних протеаз, іммобілізованих на водорозчинному полімері (поліетиленоксиді), представляє препарат «Імозімазу». Це лікарський засіб з високою протеолітичною активністю має здатність очищати поверхню шкіри від нежиттєздатних, пошкоджених патологічними процесами тканин, селективно видаляючи нежиттєздатні білки. Препарат не викликає алергії, його використання зменшує в 1,5–2 рази час лікування порівняно з традиційними способами [18].

Використання ферментів в косметичній галузі надає можливості для створення засобів лікувально-профілактичного напрямку, які не мають побічної дії (подразнення, алергії, токсикози). Колагеназа ефективна в складі очищаючих кремів і масок, оскільки прискорює процес гідролізу старого колагену в шкірі, не ушкоджуючи новий, завдяки чому епідерміс має можливість синтезувати новий колаген незалежно від віку шкіри.

Протеолітичні ферменти протидіють процесам старіння, які спричиняються мутаціями. Плазматична мембрана та цитоплазма здорових клітин містить достатню кількість інгібіторів для захисту від ендогенних протеаз, присутність яких була в багатьох випадках показана на культурі клітин [30]. В мутантних клітинах інгібіторів менше, що зумовлює вибіркочутливість таких клітин до дії ендогенних протеаз. Таким чином, організм захищений від утворення та накопичення дефектних тканин. В крові та лімфі молодих людей міститься значна кількість протеаз, достатня для того, щоб зруйнувати всі виникаючі мутантні клітини. З віком протеолітичний потенціал сироватки знижується, що призводить до утворення багатьох патологічних станів, які характерні для старіння. У зв'язку з чим пропонується, починаючи з деякого віку, наприклад з 40 років, вводити в організм екзогенні протеази [2].

Відомо, що існують розробки лікарських препаратів для лікування СНІДу та цукрового діабету на основі протеаз [20, 100].

Шкіряна промисловість. В шкіряній промисловості протеази використовуються в двох процесах: для видалення волосяного покриву та для дублення (пом'якшення) шкіри [90]. Видалення шерсті традиційними методами передбачає обробку її вапном і сульфідом натрію. Ця процедура не є бажаною, оскільки призводить до утворення токсичного сірковуглецю. А це, в свою чергу, створює проблему утилізації стічних вод, що містять луѓи, сульфідів і волосяні залишки. У ферментативному процесі шкіру обробляють протеазами з додаванням сульфідів при температурі 30–35 °С і за лужного значення рН. На етапі пом'якшення сировини потрібні протеази еластолітичної та колагенолітичної дії. Відкриття високолужних протеаз дозволило інтенсифікувати цей процес (наприклад, термостабільною протеазою *Alcaligenes faecalis*). Процес включає обробку шкір розчином 8 %-ого вапняку і 0,1 %-ого розчину ферменту про-

тягом 18–24 год. Під час такої обробки руйнуються шкірні пігменти, збільшується поверхня шкіри. Шкіру присипають або нерозбавленим ферментним препаратом, або його сумішшю з деревинним борошном. В результаті скорочується час протікання технологічного процесу і виключається проблема забруднення навколишнього середовища токсичними речовинами [92].

Виробництво детергентів. В процесі прання детергент диспергує і розчиняє більшу частину забруднення, однак білкові забруднення часто коагулюють на тканині і не диспергуються. Добавки препаратів серинових протеаз збільшують ефективність прання за рахунок гідролізу білкових молекул. Ферменти, що додаються до миючих засобів, ефективно працюють у температурному режимі до 60°C. Серинові протеази інгібуються катіонними детергентами, але проявляють відносну стійкість щодо неіонних (не піддаються іонізації в водному розчині) і аніонних миючих засобів [52]. Наприклад, пропонується у виробництві детергентів використовувати серинову лужну протеазу *Bacillus* sp. KSM-KP43 [82].

Імобілізована на поліаміді лужна протеаза гриба *Conidiobolus macrosporus* зберігала активність при 50 °C і в присутності 8 М сечовини, а також деяких детергентів, що робить її перспективною для використання в якості компонента миючих засобів [91].

Вважається, що в досконалому вигляді процес прання повинен складатися з двох стадій: перша – обробка протеазами для розчинення білкових забруднень, що важко змиваються, друга стадія – саме прання з використанням різних миючих засобів [33].

Існують також дані щодо використання протеаз роду *Bacillus* для пригнічення активності популяцій ризобіальних нематод [64]. Штам *Bacillus* sp. 739 продукує позаклітинну протеазу, яка деградує *in vitro* клітинну стінку значного загалу фітопатогенних та сапрофітних грибів [1].

Характеристика продуцентів та шляхи підвищення біосинтезу мікробних протеаз. Протеолітичні ферменти відіграють ключову роль в процесах регуляції та обміну речовин на різних рівнях існування організмів [60, 101].

Традиційно промисловістю використовуються протеази, ізольовані з представників родів *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*), а також штамів грибів *Mucor*, *Aspergillus*, *Endothea* [25].

Галофільні бактерії, які були охарактеризовані як перспективні продуценти позаклітинних протеаз, переважають інших завдяки високій стійкості до осадження та денатурації внаслідок підвищеної іонної сили середовища [39, 40, 43, 44, 95, 96]. Галофільні організми існують в середовищах з високим вмістом солі. До них відносять представників еукаріотів і більшою мірою – прокаріотів, що мають здатність регулювати осмотичний тиск і протистояти денатуруючому ефекту солей.

Залежно від оптимальної для росту концентрації солі в середовищі галофілів умовно поділяють на три типи: легкі (м'які) – 0,2-0,85 моль/л (2-5%) NaCl; помірні – 0,85-3,4 моль/л (5-20%) NaCl; екстремальні – 3,4-5,1 моль/л (20-30%) NaCl. Оптимальне середовище для негалофільних мікроорганізмів складає менше ніж 0,2 моль/л NaCl. Унікальну групу складають галотолерантні мікроорганізми, котрі здатні існувати як на середовищах з підвищеною, так і нормальною концентрацією солі [81]. Наприклад, з рибної пасти виділений галотолерантний штам *B. subtilis* FP – 133, який здатний рости при концентраціях NaCl від 0 до 12,5% [86].

Галофільний штам *Bacillus* sp. Po2 (пізніше ідентифікований як *B. pseudofirmus*), який був виділений з морської води західного узбережжя Індії, здатний продукувати позаклітинну лужну протеазу за присутності 15 % NaCl та pH 8,0 [74]. Є також дані щодо біосинтезу субтилізиноподібної протеази *B. intermedius* в умовах сольового стресу при рості на середовищі, яке містить 1 М NaCl або 0,25 М цитрат натрію [17].

Штам *Bacillus* sp. АН-6, охарактеризований [45] як солезалежний, зберігає свою білкову структуру при обробці хімічними денатуруючими агентами: сечовиною та гуанідинхлоридом. Була продемонстрована висока стійкість неочищеного ферменту до дії 8 М розчину сечовини протягом 72 год, але після очистки фермент ставав більш чутливим до сечовини та руйнувався після 2 год обробки. При цьому було показано, що очищений фермент відновлює свою стійкість до хімічних денатуруючих агентів в присутності NaCl. Такі дані є важливими не лише з погляду характеристики ферментів галофільних бактерій, але також збагачують

нас знаннями щодо стабільності білків до денатурації та є важливими для вивчення біокаталізу в жорстких умовах довкілля.

Синтез позаклітинних протеаз найчастіше контролюється шляхом репресії. Але лишається нез'ясованим, чи викликана вона пригніченням кінцевим продуктом, чи вмістом джерела азоту. Відомо, що деякі пептиди та амінокислоти, наприклад, глютамін та аспаратат, репресують синтез протеаз у *B. licheniformis*. А секреція протеолітичних ферментів у цього виду спостерігається лише при лімітуванні азотом, що свідчить про азотну регуляцію [25]. Тому питання регуляції синтезу протеаз, як правило, обговорюється індивідуально для кожного з продуцентів.

Дріжджі виду *Y. lipolytica* залежно від рН середовища культивування секретують кислі або лужні протеази, синтез яких регулюється джерелами вуглецю, азоту і сірки [50]. Протеолітична активність штаму *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 зростає при низькому вмісті іонів амонію і додаванні сахарози в концентрації 30–50 г/л. При культивуванні з нітратом у ролі єдиного джерела азоту (24,7 мМ) спостерігається підвищення протеолітичної активності культуральної рідини [66].

При рості на багатому поживному середовищі в умовах лімітування вмісту вуглецю, азоту і сірки, у дріжджів *Y. lipolytica* індукується синтез протеаз трьох типів – кислої, нейтральної і лужної. Шляхом зміни рН середовища можна досягти синтезу тієї чи іншої протеази [49]. Аналогічна залежність продукції лужної серинової протеази від зміни рН була досліджена у культури *B. licheniformis* [38].

Активність позаклітинної протеази *A. faecalis* підвищується в присутності 2 мМ хлоридів кальцію та магнію, в той час як іони Fe^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} не дають чітко вираженого ефекту, при цьому інгібуючу дію виявляють у іонів Cu^{2+} та Hg^{2+} . Лужні протеази *B. thermoruber* та *B. stearothermophilus* F1 інгібуються солями міді та ртуті, відповідно [63].

Таким чином, дані літератури свідчать про те, що на сьогодні протеолітичні ферменти виділені у значній кількості мікроорганізмів, але пошук нових продуцентів, розробка методів виділення і очистки протеаз як широкої специфічності, що гідролізують декілька білкових субстратів, так і високоспецифічних, що діють виключно на певний субстрат, є актуальним і має великі перспективи практичного застосування.

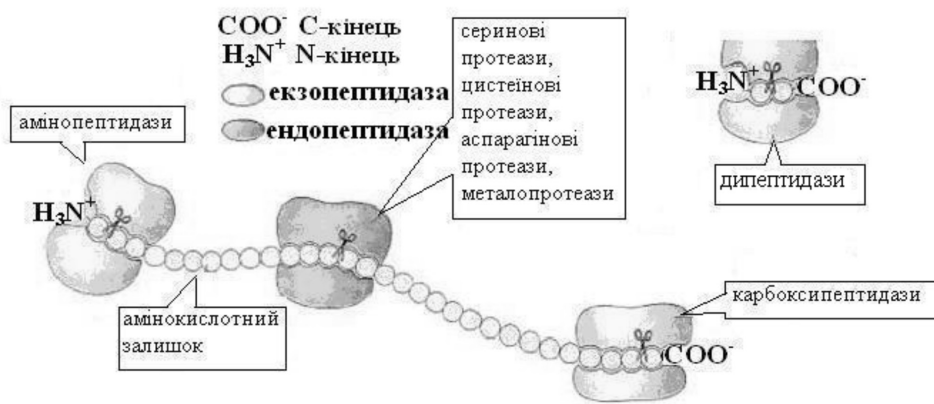
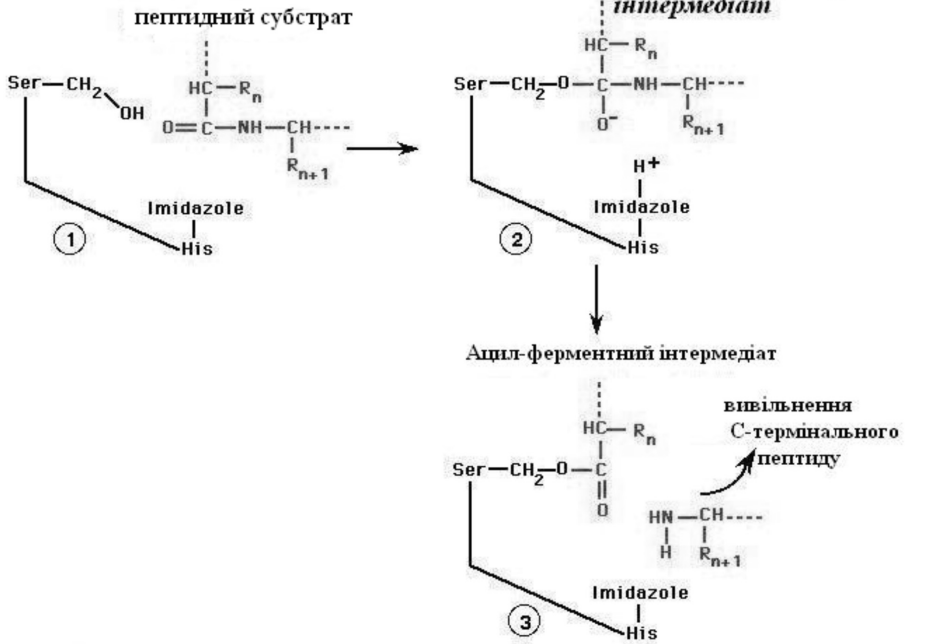


Рис. 1. Схема дії ендопротеаз та екзопротеаз

Ацилювання



Деацилювання

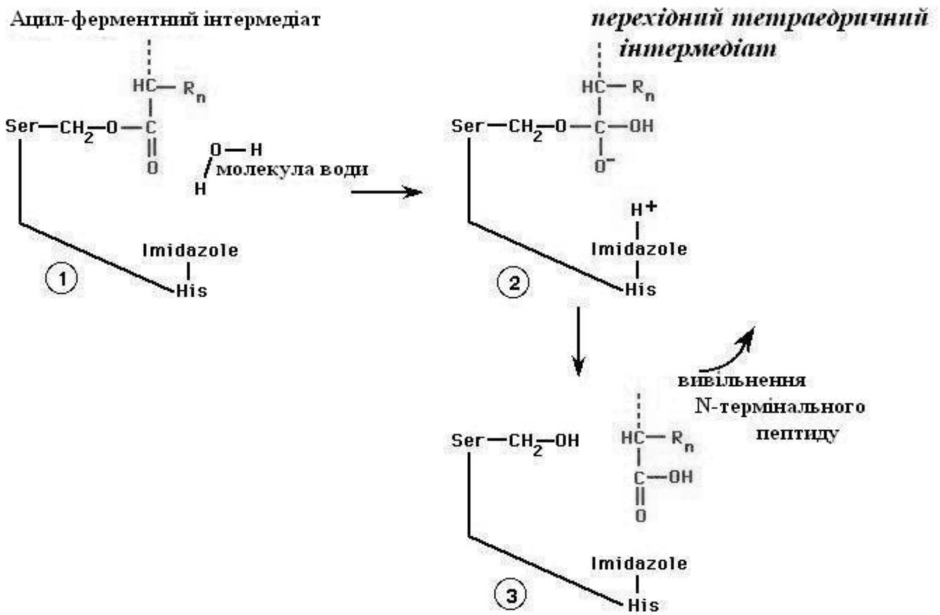
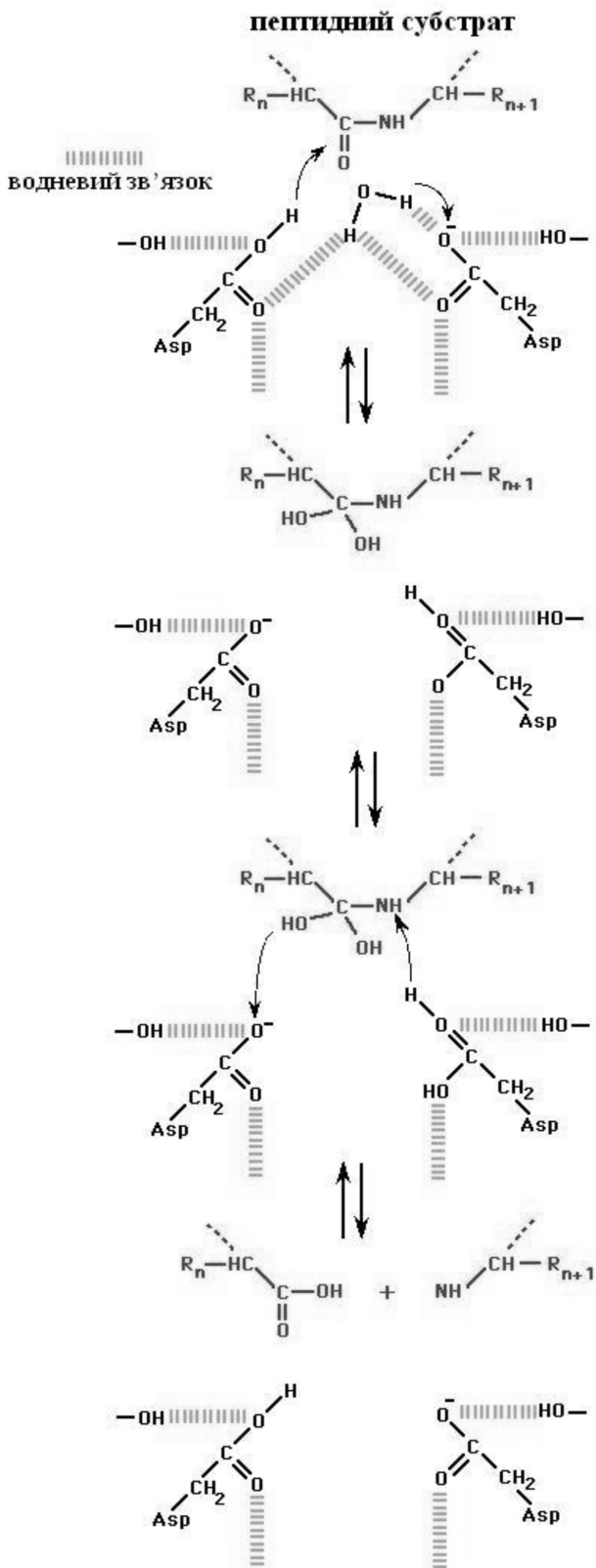


Рис. 2. Механізм дії серинових протеаз



Ацилювання

Деацилювання

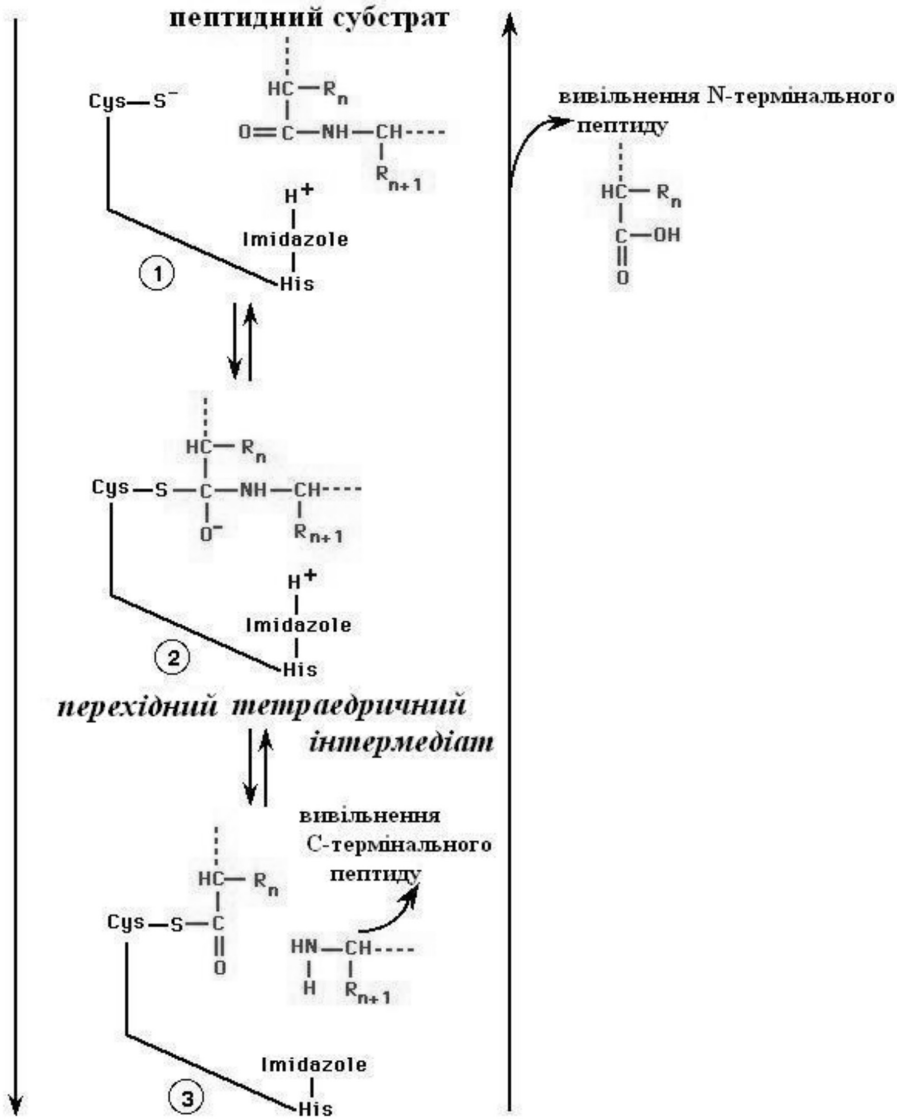


Рис. 4. Механізм дії цистеїнових протеаз

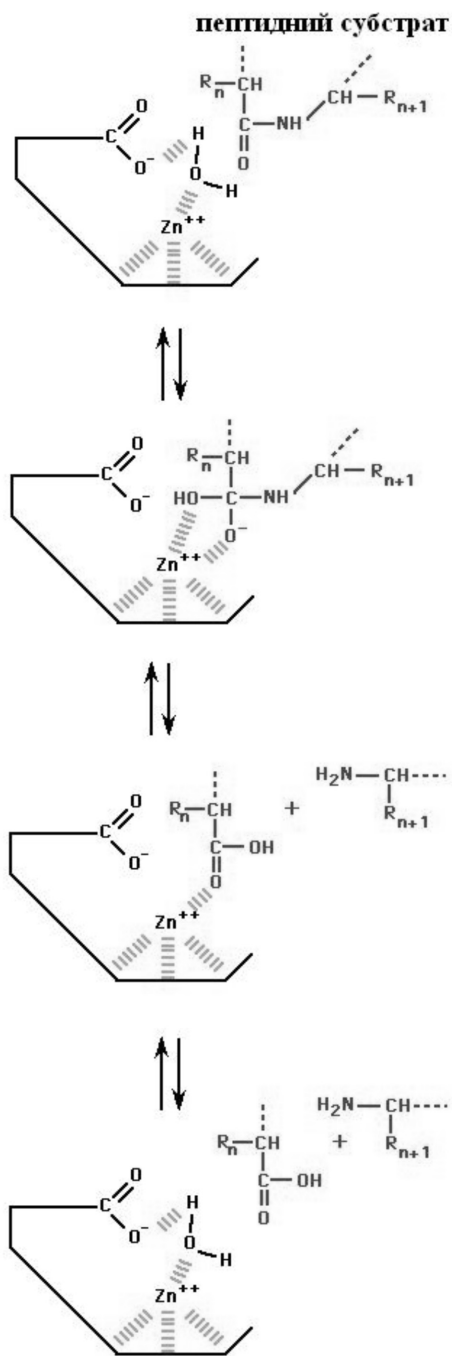


Рис. 5. Механізм дії металопротеаз

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Резюме

Микробные протеолитические ферменты гидролизуют разнообразные белковые субстраты. В работе собраны данные о способности расщеплять белки ферментами, которые выделены из разных групп микроорганизмов – бактерий, грибов, актиномицетов и дрожжей. Рассмотрены физико-химические свойства, методы выделения и очистки ферментных препаратов протеаз. Проанализированы существующие и возможные пути использования этих ферментов в промышленности и медицине.

Ключевые слова: протеолитические ферменты микроорганизмов, физико-химические свойства, методы выделения и очистки, практическое применение.

O.V.Matselyukh, A.S.Levishko, L.D.Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

PROTEOLYTIC ENZYMES OF MICROORGANISMS

S u m m a r y

Microbial proteolytic enzymes are able to hydrolyze various protein substrates. Data concerning the ability to degrade proteins amongst various groups of microorganisms, such as bacteria, fungi, actinomycetes and yeasts, are collected in this article. The physical and chemical properties of proteolytic enzyme preparations and methods of their separation and purification have been examined. The possible ways of these enzymes application in industry and medicine have been discussed.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s: microbial proteolytic enzymes, physical and chemical properties, methods of isolation and purification, practical application.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Matselyukh O.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю.* Внеклеточные гидролазы штамма *Vacillus* sp. 739 и их участие в лизисе клеточных стенок микромицетов // *Микробиология*. – 2007. – **76**, № 4. – С. 471–479.
2. *Белоусова Е.А., Златкина А.Р., Морозова Н.А., Тишкина Н.Н.* Старые и новые аспекты применения ферментных препаратов в гастроэнтерологии // *Фарматека*. – 2003. – № 7. – С. 39–44.
3. *Бондаренко В.М., Мавзютов А.Р., Агапова О.В.* Сериновые протеазы грамотрицательных бактерий: структура, механизм секреции, биологическая активность // *Журн. микробиол.* – 2002. – № 6. – С. 80–85.
4. *Василевская И.А.* Актиномицеты – продуценты биологически активных веществ: Текст лекции. – Киев: Вища школа. – 1979. – 35 с.
5. *Веремеенко К.Н., Коваленко В.Н., Кизим А.И., Терзов А.И.* Влияние полиензимных препаратов на фибриноген и фибрин // *Укр. кардиол. журн.* – 1999. – № 2. – С. 46–50.
6. *Вирник А.Д., Скокова И.Ф., Юданова Т.Н., Хомяков К.П., Гостищев В.К., Толстых П.И., Арутюнян Б.Н., Дадашова А.И.* Получение волокнистых материалов, содержащих иммобилизованный протеолитический фермент и мочевины // *Прикл. биох. микробиол.* – 1999. – **35**, № 1. – С. 72–74.
7. *Гаина Б.С.* Применение иммобилизованных протеаз в производстве виноградных напитков // *Тез. 2-го Всес. сов. по ферментам микроорганизмов*. – Минск, 1978. – С. 145.
8. *Грачева И.М.* Технология ферментных препаратов. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – С. 496.
9. *Гребешова Р.Н., Сальседо-Торрес Л.Э., Идальго М.А.* Сериновая протеаза *B. subtilis* R // *Приклад. биох. микроб.* – 1999. – **35**, № 2. – С. 150–154.
10. *Давиденко Т.И.* Иммобилизация ферментных препаратов // *Вісник ОНУ*. – 2003. – **8**, № 4. – С. 135–147.
11. *Давиденко Т.И., Романовская И.И., Чуманова М.А.* и др. Литическая активность иммобилизованной стерилизы (литического ферментного комплекса *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*) // *Хим.-фарм. журнал*. – 2001. – **35**, № 10. С. 14–17.
12. *Демина Н.С., Лысенко С.В.* Коллагенолитические ферменты микроорганизмов // *Микробиология*. – 1996. – **65**, № 3. – С. 293–304.
13. *Егоров Н.С., Лория Ж.К., Брюкнер Б.В.* Регуляция синтеза внеклеточных протеолитических ферментов у микроорганизмов // *Успехи микробиологии*. – 1977. – **12**. – С. 59–79.
14. *Емцева Т.В., Коновалов С.А.* Щелочные протеазы микробного происхождения // *Приклад. биох. микробиол.* – 1978. – **14**, № 5. – С. 661–676.

15. Ицкович Е.Л., Лотова Л.И., Балабан Н.П., Марданова А.М. и др. Тромболитические и антикоагулянтные свойства тиолзависимой сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* 3-19 // Вопросы медицинской химии – 1999. – № 5. – С. 18–24.
16. Иванко О.В. Колагеназа і кератиназа стрептоміцетів : Автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук. : спец. «03.00.07 Мікробіологія». – Київ, 2003. – 20 с.
17. Каюмов А.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Костров С.В., Шарипова М.Р. Биосинтез субтилиноподобной сериновой протеазы *Bacillus intermedius* в условиях солевого стресса // Микробиология. – 2006. – 75, № 5. – С. 1–7.
18. Коган А.С., Шантуров В.А., Гумеров Р.Р., Григорьев Е.Г. 30-летний опыт использования иммобилизованных протеиназ в лечении гнойно-очаговых процессов / Вторая международная научная телеконференция «Новые технологии в медицине». Россия, Санкт – Петербург. – 2005. – С. 43–45.
19. Крестьянова И.Н., Васильева Л.И., Бартошевич Ю.Э., Ахпаров В.Л., Наханетян Л.А. Изоэлектрическое фокусирование препарата протеолитических ферментов из *Streptomyces* 771 // Приклад. биохимия и микробиология. – 1983. – 19, № 2. – С. 217–225.
20. Кулаев И.С. Бактериологические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 3. – С. 23–31.
21. Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д. Кератинолітичні ферменти мікроорганізмів // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 5. – С. 54–64.
22. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. – М.: Наука. – 1971. – 404 с.
23. Неклюдов А.Д. Пищевые волокна животного происхождения. Коллаген и его фракции как необходимые компоненты новых и эффективных пищевых продуктов // Прикл. биох. микробиол. – 2003. – 39, № 3. – С. 261–272.
24. Полиферментные препараты в гнойной хирургии: Методические рекомендации / Под ред. член-корр. РАМН Н. А. Ефименко. – Москва. – 2005. – 32 с.
25. Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов / Ф. Прист. пер. с англ. Плакунова, М., «Мир» – 1987. – 117 с.
26. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Иммобилизация литического ферментного комплекса лизорицефина // Прикл. биох. микробиол. – 1999. – 35, № 1. – С. 68–71.
27. Романовська І.І., Декіна С.С. Розробка раневого гідрогелевого покриття з імобілізованою лужною протеазою *Bacillus subtilis* на основі модифікованого полі-N-вінілпіролідону // Досягнення біології та медицини. – 2007. – № 1. – С. 88–91.
28. Романовська І.І., Тагунова І.К., Пухлік С.М., Чаланова Р.І. Імобілізація літичного ферментного комплексу *Streptomyces rectifensis* var. *lyticus* // Одеський мед. журн. – 2007. – 99, № 1. – С. 19–23.
29. Руденская Г.Н., Пунов Д.В. Цистеиновые протеиназы микроорганизмов и вирусов // Биохимия. – 2008. – 73, № 1. – С. 1–13.
30. Халили А.С., Домоземский С.П., Рууге Э.К. Ограничение активности протеолитического фермента, используемого для лечения ожоговых ран, потоком специфического ингибитора, содержащегося в экссудате // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. – 2003. – 44, № 1. – С. 31–35.
31. Айярра P.S., Трафicante L.J., Лампен J.O. Penicillinase-releasing protease of *Bacillus licheniformis*: purification and general properties // J. Bacteriol. – 1977. – 129, N 1. – P.191–197.
32. Antão C.M., Malcata F.X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features // Plant. Physiol. Biochem. – 2005. – 43, N 7. – P. 637–650.
33. Aunstrup K. Proteinases // Microb. Enzymes and Bioconverts. – 1980. – 5. – P. 49–114.
34. Barrett A.J. Proteolytic enzymes: aspartic and metalloproteases // Meth. Enzymol. – 1995. – 248. – P. 183–197.
35. Barrett A.J. Proteases // Curr. Protoc. Protein. Sci. – 2001. – Chapter 21: Unit 21.1.
36. Barrett A.J., Rawlings N.D. Families and clans of serine peptidases // Arch. biochem. biophys. – 1995. – 318. – P. 247–250.
37. Barrett A.J., Rawlings N.D. Families and clans of cysteine peptidases // Perspect. Drug. Discov. Design. – 1996. – 6, N 6. – P. 1–11.
38. Calik P., Bilir E., Calik G., Özdamar T.H. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* // Enzyme Microbial Technol. – 2002. – 31, N 5. – P. 685–697.
39. Capiralla H., Hiroi T., Hirokawa T., Maeda S. Purification and characterization of a hydrophobic amino acid-specific endopeptidase from *Halobacterium halobium* S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates // Process Biochemistry. – 2002. – 38, N 4. – P. 571–579.
40. Chang L.S., Hicks P.M., Kelly R.M. Protease I from *Pyrococcus furiosus* // Methods Enzymol. – 2001. – 330. – P. 403–413.
41. Chen Q.H., He G.O. Optimization of elastolysis conditions and elastolytic kinetic analysis with elastase from *Bacillus licheniformis* ZJUJEL31410 // J. Zhejiang. Univ. Sci. B. – 2006. – 7, N 6. – P. 482–490.
42. Chen Q.H., Ruan H., Zhang H.F. et al. Enhanced production of elastase by *B. licheniformis* ZJUJEL31410: optimization of cultivation conditions using response surface methodology // J. Zhejiang. Univ. Sci. B. – 2007. – 8, N 11. – P. 845–852.

43. DasSarma S., Arora P. Halophiles, encyclopedia of life sciences. – London: Nature Publishing Group, 2002. – 8. – P. 458–466.
44. Demirjian D.C., Moris-Varas F., Cassidy C.S. Enzymes from extremophiles // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2001. – 5, N 2. – P. 144–151.
45. Dodia M.S., Bhimani H.G., Rawal C.M. et al. Salt dependent resistance against chemical denaturation of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* // Bioresour. Technol. – 2008. – 99, N 14. – P. 6223–6277.
46. Dunn B.M. Overview of pepsin-like aspartic peptidases /Dunn B.M. // Curr. Protoc. Protein Sci. – 2001. – Chapter 21 : Unit 21.3.
47. Forlani G., Maria S.A., Ciferri O. A bacterial extracellular proteinase degrading silk fibroin // Int. Biodeter. Biodegrad. – 2000. – 46, N 4. – P. 271–275.
48. Fruton J.S. A history of pepsin and related enzymes // Q. Rev. Biol. – 2002. – 77, N 2. – P. 127–147.
49. Glover D.J., McEwen R.K., Thomas C.R., Young T.W. pH-Regulated expression of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica* // Microbiology. – 1997. – 143, N 9. – P. 3045–3054.
50. Gonzales-Lopez C.I., Szabo R., Blanchin-Roland S., Gaillardin C. Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica* // Genetics. – 2002. – 160, N 2. – P. 417–427.
51. Govind N.S., Mehta B., Sharma M., Modi V.V. Protease and carotenogenesis in *Blakeslea trispora* // Phytochemistry. – 1981. – 20, N 11. – P. 2483–2485.
52. Gupta A., Roy I., Khare S.K., Gupta M.N. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA // J. Chromatogr. – 2005. – 1069, N 2. – P. 155–161.
53. Gupta S.P., Kumaran S. A quantitative structure-activity relationship study on *Clostridium histolyticum* collagenase inhibitors: roles of electrotopological state indices // Bioorg. Med. Chem. – 2003. – 11, N 14. – P. 3065–3071.
54. Hartley B.S. Proteolytic enzymes // Annu. Rev. Biochem. – 1960. – 29. – P. 45–72.
55. Hedstrom L. An overview of serine proteases / Hedstrom L. – Curr. Protoc. Protein. Sci. – 2002. Feb; Chapter 21 : Unit 21.10.
56. Hernández-Montañez Z., Araujo-Osorio J., Noriega-Reyes Y. et al. The intracellular proteolytic system of *Yarrowia lipolytica* and characterization of an aminopeptidase // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – 268, N 2. – P. 178–186.
57. Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1999. – 63, N 4. – P. 735–750.
58. Impoolsup A., Bhumiratana A., Flegel T.W. Isolation of alkaline and neutral proteases from *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, a Soy Sauce Koji Mold // Appl. Environ. Microbiol. – 1981. – 42, N 4. – P. 619–628.
59. James M.N., Hsu I.N., Delbaere L.T. Mechanism of acid protease catalysis based on crystal structure of penicillopepsin // Nature. – 1977. – 267. – P. 808–813.
60. Khan A.R., James M.N. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes // Protein Sci. – 1998. – 7, N 4. – P. 815–836.
61. Kim H.S., Golyshin P.N., Timmis K.N. Characterization and role of a metalloprotease induced by chitin in *Serratia sp.* KCK // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – 34, N 11. – P. 715–721.
62. Lagace L.S., Bisson L.F. Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction // Am. J. Enol. Vitic. – 1990. – 41, N 2. – P. 147–155.
63. Lee A.Y., Tsay S.S., Chen M.Y., Wu S.H. Identification of a gene encoding Lon protease from *Brevibacillus thermoruber* WR-249 and biochemical characterization of its thermostable recombinant enzyme // Eur. J. Biochem. – 2004. – 27, N 1. – P. 834–844.
64. Lian L.H., Tian B.Y., Xiong R. et al. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations // Lett. Appl. Microbiol. – 2007. – 45, N 3. – P. 262–269.
65. Lipka D., Boratynski J. Metalloproteinases. Structure and function // Postepy Hig. Med. Dosw. (Online). – 2008. – 62. – P. 328–336.
66. Lourenco P.M.L., de Castro S., Martins T.M. et al. Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose // Enzyme Microb. Technol. – 2002. – 31, N 3. – P. 242–249.
67. Mansfeld J., Ulbrich-Hofmann R. The stability of engineered thermostable neutral proteases from *Bacillus stearothermophilus* in organic solvents and detergents // Biotechnol. Bioeng. – 2007. – 97, N 4. – P. 672–679.
68. Miyajima Y., Hata Y., Fukushima J. et al. Long-range effect of mutation of calcium-binding aspartates on the catalytic activity of alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* // J. Biochem. (Tokyo). – 1998. – 123, N 6. – P. 24–27.
69. Nagase H. Metalloproteases // Curr. Protoc. Protein. Sci. – 2001. – Chapter 21: Unit. 21.4
70. Nägler D.K., Zhang R., Tam W. et al. Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity // Biochemistry. – 1999. – 273, N 27. – P. 12648–12654.
71. North M.J. Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms // Microbiol. Rev. – 1982. – 46, N 3. – P. 308–340.
72. Otto H.-H., Schirmeister T. Cysteine proteases and their inhibitors // Chem. Rev. – 1977. – 97, N 1. – P. 133–172.

73. Page M.J., Di Cera E. Serine peptidases: classification, structure and function // Cell. Mol. Life. Sci. – 2008. – **65**, N 7–8. – P. 1220–1236.
74. Patel R.K., Dodia M.S., Joshi R.H., Singh S.P. Production of extracellular halo-alkaline protease from a newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from seawater in western India // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – **22**, N 4. – P. 375–382.
75. Peng Y., Yang X., Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes; an overview of source, production, and trombolytic activity in vivo // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – **69**, N 2. – P. 126–132.
76. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge S.M., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – **62**, N 3. – P. 598–635.
77. Rawlings N.D., Barrett A.J. Evolutionary families of metallopeptidases // Methods Enzymol. – 1995. – **248**. – P. 183–228.
78. Rawlings N.D., Barrett A.J. Families of aspartic peptidases, and those of unknown mechanism // Methods Enzymol. – 1995. – **248**. – P. 105–120.
79. Rawlings N.D., Barrett A.J. Families of cysteine peptidases // Methods Enzymol. – 1994. – **244**. – P. 461–486.
80. Rawlings N.D., Barrett A.J. Families of serine peptidases // Methods Enzymol. – 1994. – **244**. – P. 19–61.
81. Ryu K., Kim J., Dordick J.S. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile // Enzyme Microb. Technol. – 1994. – **16**, N 4. – P. 266–275.
82. Saeki K., Ozaki K., Kobayashi T., Ito S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties genes, and crystal structures // J. Biosci. Bioeng. – 2007. – **103**, N 6. – P. 501–508.
83. Sanchez-Porro C., Mellado E., Bertoldo C. et al. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76 // Extremophiles. – 2003. – **7**, N 3. – P. 221–228.
84. Sandhya C. Nampoothiri K.M., Pandey A. Microbial proteases // Methods in Biotechnol. – 2005. – **17**. – P. 165–179.
85. Sareen R., Mishra P. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – **79**, N 3. – P. 399–405.
86. Setyorini E., Kim Y.J., Takenaka S. et al. Purification and characterization of a halotolerant intracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133 // J. Basic. Microbiol. – 2006. – **46**, N 4. – P. 294–304.
87. Shata H.M. Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* // Pol. J. Microbiol. – 2005. – **54**, N 3. – P. 241–247.
88. Spreer A., Rüchel R., Reichard U. Characterization of an extracellular subtilisin protease of *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during invasive rhinoorbital mycosis // Med. Mycol. – 2006. – **44**, N 8. – P. 723–731.
89. Tamai E., Miyata S., Tanaka H. et al. High-level expression of his-tagged clostridial collagenase in *Clostridium perfringens* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – **80**, N 4. – P. 627–635.
90. Tang X.M., Lakay F.M., Shen W. et al. Purification and characterization of an alkaline protease used in tannery industry from *Bacillus licheniformis* // Biotechnol. Lett. – 2004. – **26**, N 18. – P. 1421–1424.
91. Tanksale A., Chandra P.M., Rao M., Deshpande V. Immobilization of alkaline protease from *Conidiobolus macrosporus* for reuse and improved thermal stability // Biotechnol. Lett. – 2001. – **23**, N 1. – P. 51–54.
92. Thangam E.B., Rajkumar G.S. Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis* / E.B.Thangam, G.S.Rajkumar // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2002. – **35**, N 2. – P. 149–154.
93. Tong N.T., Tsugita A., Keil-Dlouha V. Purification and characterization of two high-molecular-mass forms of *Achromobacter* collagenase // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – **874**. – P. 296–304.
94. Van der Hoorn R.A. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms // Annu. Rev. Plant. Biol. – 2008. – **59**. – P. 191–223.
95. Vázquez S.C., Hernández E., Mac Cormack W.P. Extracellular proteases from the Antarctic marine pseudoalteromonas sp. P96-47 strain // Rev. Argent. Microbiol. – 2008. – **40**, N1. – P. 63–71.
96. Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – **62**, N2. – P. 504–544.
97. Voorhorst W.G., Eggen R.I., Geerling A.C. et al. Isolation and characterization of the hyperthermostable serine protease, pyrolysin, and its gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* // J. Biol.Chem. – 1996. – **271**, N 34. – P. 20426–20431.
98. Watanabe J., Tanaka H., Akagawa T. et al. Characterization of *Aspergillus oryzae* aspartyl aminopeptidase expressed in *Escherichia coli* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2007. – **71**, N 10. – P. 2557–2560.
99. Whitcomb D.C., Lowe M.E. Human pancreatic digestive enzymes // Dig. Dis. Sci. – 2007. – **52**, N 1. – P. 1–17.
100. Wondrak E.M., Nashed N.T., Haber M.T. et al. A transient precursor of the HIV-1 protease. Isolation, characterization, and kinetics of maturation // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, N 8. – P. 4477–4481.
101. Yang J., Tian B., Liang L., Zhang K.Q. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – **75**, N1. – P. 21–31.

Отримано 15.04.2009