

УДК 57.061:577.151

**МЕТАЛЛОПРОТЕАЗЫ БАЦИЛЛ.
КЛАССИФИКАЦИЯ, СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКОВ**

Н.П. Балабан

Аннотация

Обзор посвящен обширному классу протеолитических ферментов – металлопротеазам, в котором рассматривается их классификация, основывающаяся на химической природе и порядке расположения функциональных групп каталитического центра, структурные особенности, энзиматические свойства и субстратная специфичность ферментов. Подробно обсуждается термостабильность металлопротеаз термофильных бацилл, возможности повышения их устойчивости к высоким температурам и действию денатурирующих агентов, а также перспективы использования термостабильных металлопротеаз для решения проблем биотехнологического производства.

Введение

В жизнедеятельности любой клетки, во всем многообразии метаболических процессов, происходящих в ней, белки играют огромную роль, выполняя множество разнообразных функций. Среди белков особая роль отводится протеолитическим ферментам, ответственным за жизненно важные процессы, протекающие в клетке.

Интерес к протеолитическим ферментам, в частности, к протеазам микроорганизмов, объясняется недостаточной способностью уже исследованных протеаз растений и животных полностью удовлетворять текущие жизненные потребности населения планеты. Микроорганизмы представляют прекрасный источник самых разнообразных ферментов благодаря их широкому распространению, простоте культивирования и способности к генетическим преобразованиям. Микробные протеазы составляют приблизительно 40% от мирового объема продажи ферментных препаратов. Большинство коммерческих протеаз, главным образом, нейтральных и щелочных, продуцируются бациллами, стрептомицетами, актиномицетами, аспергиллами и др.

Наряду с практической значимостью, бактериальные протеазы являются идеальной моделью для решения фундаментальных проблем клеточной биологии. В настоящее время получено достаточно информации, указывающей на то, что протеазы играют ключевую роль в процессах клеточной дифференцировки и могут рассматриваться как регуляторные ферменты на посттрансляционном уровне. Кроме того, задача утилизации ненужных клетке белков полностью решается протеолитическими ферментами.

1. Классификация ферментов

Все известные в настоящее время ферменты, включая протеолитические, систематизированы в Международной Классификации ферментов [1]. Согласно этой классификации гидролиз субстратов осуществляется ферментами, которые относятся к классу гидролаз и обозначаются цифрой 3. Ферменты, гидролизующие пептидные связи в белках и пептидах, называются протеазами и обозначаются цифрами 3.4.

Протеазы классифицируются по следующим основным критериям:

- 1 – типу катализируемой реакции;
- 2 – химической природе и структуре каталитического центра;
- 3 – эволюционной связи независимо от структуры.

По типу катализируемой реакции протеазы делятся на пептидазы и протеиназы (рис. 1). Это деление зависит от расположения сайта расщепления пептидной связи. Экзопептидазы (пептидазы) гидролизуют пептидные связи, отщепляя по одной-две аминокислоте, ближайших к N- или C-концу субстрата. Эндопептидазы (протеиназы) гидролизуют внутримолекулярные пептидные связи, отдаленные от концов субстрата.

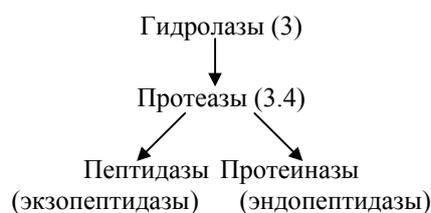


Рис. 1

Классификация протеиназ по структуре активного центра основывается на порядке расположения функциональных групп каталитического центра ферментов. По этому признаку протеиназы подразделяются на четыре основных класса: сериновые – S (КФ 3.4.21), цистеиновые – C (КФ 3.4.22), аспаратные – A (КФ 3.4.23) и металлопротеиназы – M (КФ 3.4.24). Также существует класс U для неизвестных пока протеиназ (КФ 3.4.99). Эта Классификация ферментов утверждена Номенклатурным Комитетом Международного Союза Биохимии и Молекулярной биологии [1].

Все протеиназы представляют собой хорошо изученные белки. Многие ферменты получены в гомогенном состоянии, определены их физико-химические и каталитические свойства, изучено влияние ингибиторов различной природы на активность ферментов, их субстратная специфичность, первичная и пространственная структуры белков. Многие гены протеиназ секвенированы, клонированы, и изучена их экспрессия в мутантных штаммах разных микроорганизмов.

В класс металлопротеаз входят энзимы, выделенные из различных источников: микроорганизмов, растений и высших организмов.

Следует отметить, что металлопротеазы плохо подчиняются общей системе номенклатуры ферментов из-за своего огромного разнообразия и различий в структуре и свойствах. Существующая Классификация ферментов полностью

не отражает как сходство, так и различия отдельных семейств металлопротеаз, и поэтому бывает трудно определить, к какому семейству относится вновь обнаруженная металлопротеаза. Такие сложности приводили к тому, что некоторые металлопротеазы имели свои собственные названия, которые использовались авторами в публикациях. Так, например, металлопротеаза *B. subtilis*, открытая позже термолизина, но похожая на него по структуре и свойствам, была названа авторами бациллолизинном. Металлопротеазы, открытые позднее, их авторы относили либо к термолизинподобным, либо бациллолизинподобным металлопротеазам, что создавало путаницу в классификации этих ферментов.

Первая попытка классифицировать обширный класс металлопротеаз была сделана в 1995 г. [2]. В основу этой классификации положен принцип распределения металлопротеаз по функциональным группам активного центра (кланы MA, MB, MC, MD и ME), содержащим один атом цинка, необходимый для катализа. По типу гидролиза в одном клане могли оказаться ферменты как экзо-, так и эндопептидазы, однако ферменты одного клана имели одинаковое расположение аминокислотных остатков в активном центре.

В 1998 г. Барретт дополнил эту классификацию еще тремя кланами протеаз: MF, MG и MH [3]. Дополнительные кланы отличаются от пяти предыдущих тем, что ферменты этих кланов в активном центре содержат по 2 атома металла: кланы MF и MH – по 2 атома цинка, клан MG – 2 атома кобальта. Известна пространственная структура некоторых ферментов этих кланов, а также изучены физико-химические и каталитические свойства.

Клан MA содержит большое количество хорошо изученных металлопептидаз, продуцентами которых являются прокариотические и эукариотические организмы. Этот клан включает 9 семейств металлопротеаз, которые характеризуются наличием гистидиновых остатков His 142 и His 146 в активном центре (аминокислотная последовательность HEXXH), выполняющих роль лигандов для ионов Zn^{2+} . Ключевая аминокислотная последовательность активного центра (мотив) HEXXH обнаружена во многих цинксодержащих протеазах, включая различные эукариотические цинковые металлопептидазы, и является, по-видимому, систематическим признаком семейств. Исследование третичной структуры термолизина показало, что аминокислотный остаток Glu 143 в составе этого мотива не является цинковым лигандом, а действует как акцептор протона в процессе катализа, а значит выполняет важную каталитическую функцию. В 7 семействах клана MA (M2, M4, M5, M13, M30, M36, M48) обнаружен мотив Glu-(Xaa)₃-Asp, являющийся дополнительным к мотиву HEXXH и позволяющий обнаружить и идентифицировать металлопротеазы, сходные по фолдингу с термолизинном. В этом дополнительном мотиве остаток глутамата (Glu166) является третьим цинксвязывающим лигандом, расположенным на расстоянии 20 аминокислотных остатков от С-конца мотива HEXXH, поэтому расположение аминокислотных остатков в активном центре клана MA более точно записывается как HEXXH + E. Аспартат (Asp 170) в дополнительном мотиве обычно встречается через 4 остатка от С-конца по отношению к цинксвязывающему глутамату (Glu 166) [3].

Все кланы металлопротеаз отличаются друг от друга аминокислотными остатками, входящими в основной и дополнительный мотивы активного центра.

Так, исследование пространственных структур астацина и адамализина семейства M12 клана MB показало, что цинксвязывающими лигандами являются три остатка гистидина, два из которых находятся в таком же основном мотиве, как в клане MA – HEXXH, а третий остаток гистидина находится на расстоянии шести аминокислотных остатков от С-конца основного мотива. Таким образом, аминокислотная последовательность активного центра ферментов клана MB записывается как HEXXH+N, где третий гистидин в некоторых семействах может быть замещен на аспарагин [3].

Члены некоторых семейств клана MA обладают небольшим сходством в аминокислотной последовательности, но имеют другие общие характеристики. Так, анализ аминокислотных последовательностей семейств M4 (термолизин) и M13 (неприлизин) выявил некоторые общие закономерности:

1. Протеазы обладают сходством кластеров гидрофобных остатков.
2. Главным определяющим фактором в субстратной специфичности этих белков является гидрофобный остаток в P1'-положении.
3. Эти пептидазы ингибируются фосфорамидоном – ингибитором, содержащим в S1'-положении фосфорамидатную группу, которая прочно связывает ион цинка активного центра.

2. Термолизин и термолизинподобные протеазы

Термолизин – типичный представитель семейства M4 клана MA (КФ 3.4.24.27) – был первой металлопротеазой, заинтересовавшей исследователей своей экстремальной термостабильностью.

Впервые термолизин был выделен из культуральной жидкости термофильного микроорганизма *B. thermoproteolyticus* в 1962 г. [4]. Фермент был очищен до гомогенного состояния, изучены его энзиматические и каталитические свойства, аминокислотная последовательность и пространственная структура [5–7]. В молекуле фермента имеется один ион Zn^{2+} , необходимый для катализа, и четыре иона Ca^{2+} , которые определяют стабильность фермента [8–11]. В термолизине и его предшественнике отсутствуют цистеиновые остатки, однако это не характерно для семейства M4, так как в псевдолизине (эластаза *Pseudomonas aeruginosa*) обнаружены четыре цистеина, формирующих два дисульфидных мостика [12].

Вторым хорошо исследованным представителем семейства M4 является бациллолизин (клан MA, семейство M4, КФ 3.4.24.28).

Впервые о бациллолизине было сообщено как об экстрацеллюлярном ферменте, выделенном из культуральной жидкости *B. subtilis*. Этот фермент является родственными ферментам, продуцируемым термофильными бактериями *B. thermoproteolyticus*, *B. stearothermophilus*, *B. caldolyticus* и мезофильными бактериями *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. cereus* и др. [3]. Как упоминалось выше, существует путаница в классификации ферментов групп бациллолизина и термолизина. В настоящее время к ферментам под названием «бациллолизин» относятся все металлопротеазы бацилл, которые не вошли в кластер очень термостабильной группы ферментов под названием «термолизин». Анализ литературных данных показал, что такое деление нуждается в пересмотре [3].

Кинетика синтеза металлопротеаз подчиняется следующей закономерности: чем выше скорость роста клеток, тем ниже скорость образования фермента. Наибольшая величина скорости синтеза соответствует периоду замедления скорости роста (конец логарифмической фазы). Прекращение вегетативного роста может способствовать накоплению протеолитических ферментов, синтез которых становится нерепрессированным. Наиболее интенсивное образование металлопротеаз спорообразующими бактериями происходит, как правило, в конце вегетативного роста, в стадии формирования спор [2].

Пептидазы всех каталитических типов обычно синтезируются с сигнальным пептидом, ответственным за транслокацию, и пропептидом, благодаря которому фермент находится в неактивном состоянии до тех пор, пока он не достигнет места своего функционирования *in vivo*. Однако пропептиды выполняют не только функцию поддержания фермента в неактивном состоянии, но принимают участие в формировании функциональной третичной структуры [13]. Для термолизина, а также для некоторых сериновых протеиназ (субтилизин Е, α -литическая протеаза) показано, что нековалентные связи между пропептидом и зрелой последовательностью необходимы для корректного фолдинга, приводящего к продукции активной зрелой формы фермента. Недавно при изучении экспрессии термолизинподобной протеазы *B. stearothermophilus* и ее пропоследовательности были получены интересные данные о том, что (в противоположность общему мнению) корректный фолдинг с образованием зрелой формы белка может происходить в цитозоле *E. coli* в отсутствие пропептида [14]. Последовательность сигнального пептида металлопептидаз семейства М4, как правило, содержит небольшое количество аминокислот (например, 27 аминокислотных остатков у протеаз *B. thermoproteolyticus*, *B. stearothermophilus*, *B. cereus*). Зрелая часть молекул ферментов этого семейства обладает высокой степенью гомологии по аминокислотной последовательности, но их пропептиды могут значительно отличаться друг от друга. Так, например, термолизинподобная протеаза *B. stearothermophilus* является близким гомологом термолизина, отличаясь от него только 44 аминокислотными остатками (аминокислотные последовательности идентичны на 86%). Однако пропоследовательности этих протеаз менее гомологичны, их идентичность составляет около 49%. Пропептиды содержат 204 аминокислотных остатка, что составляет примерно 2/3 длины зрелого белка (316 аминокислот у термолизина и 319 аминокислот у термолизинподобной протеазы *B. stearothermophilus*). Пропоследовательность металлопротеазы *B. megaterium* ATCC 14581 состоит из 221 аминокислотного остатка, а зрелая часть белка – из 317 и имеет 73% гомологии с протеазами *B. thermoproteolyticus* и *B. stearothermophilus* и 84.5% гомологии с протеазой *B. cereus* [15].

3. Энзиматические свойства металлопротеаз

Оптимум рН-действия большинства металлопротеаз находится в узкой области рН 6.5–7.5 [16]. Обычно такие ферменты называют нейтральными металлопротеазами. Однако в литературе имеются сведения о ферментах, у которых оптимум рН-действия равен 8.0–8.5, и называются они щелочными металлопротеазами. Так, в 2001 г. была обнаружена новая внеклеточная металлопро-

теаза *B. cereus* KCTC 3674 с рН-оптимумом 8.0 [17]. Клетки *B. stearothermophilus* TLS 33 секретируют в среду три металлопротеазы S, N и В с оптимумами рН 8.5, 7.5 и 7.0 и температурными оптимумами 70, 85 и 95°C соответственно. Протеазы S, N и В в присутствии 5 мМ CaCl₂ рН 7.0 при инкубации 30 мин сохраняют 50% своей активности при 72, 78 и 90°C соответственно. Молекулярные массы этих белков, определенные SDS-электрофорезом, составляют 36, 53 и 71 кДа соответственно. Белки ингибируются металлохелаторами ЭДТА и *o*-фенантролином, но активность апоэнзимов восстанавливается добавлением ионов Na⁺, K⁺, Li⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ и Zn²⁺ в концентрации 1 мМ, однако максимальное восстановление активности у всех трех ферментов наблюдается при внесении ионов Ca²⁺ [18].

Все металлопротеазы ингибируются миллимолярными концентрациями *o*-фенантролина и ЭДТА и не ингибируются ингибиторами сериновых протеиназ PMSF и DFP. Экспериментально показано, что ЭДТА связывается с ионом металла этих ферментов и образует прочный хелатный комплекс, который может привести к автолизу фермента [19]. Термолизин ингибируется также фосфатными буферами [20] и высокими концентрациями цинка (более 10 мкМ), который связывается с гистидиновым остатком активного центра [21, 22]. Более специфичными термолизиновыми ингибиторами являются аналоги модифицированных ди- или трипептидов с гидрофобным остатком в S1'-положении и содержащие сильные цинксвязывающие агенты, такие как фосфорамидатную, гидроксаматную или карбоксилатную группу.

Недавно японскими исследователями получена новая бациллолизинподобная металлопротеаза *B. megaterium* A 9542, которая может быть использована для получения ангиостатинподобных плазминогенных фрагментов и активных сериновых протеаз плазмы человека [23]. Определены энзиматические свойства этой протеазы. Оптимум рН действия находится в области рН 7.4, температурный оптимум – 60°C, фермент стабилен в интервале температур 25–60°C, но прогрев в течение 20 мин при температуре 70°C уменьшает активность фермента на 65%. Другие японские исследователи также сообщили о новой металлопротеазе, выделенной из культуральной жидкости *B. subtilis* FP-133, которая для проявления каталитической активности требует ионы двухвалентного железа [24]. Интересно отметить, что активность апоэнзима, полученного при инкубации этой металлопротеазы с 10 мМ ЭДТА, восстанавливалась при добавлении ионов Fe²⁺ на 65%, ионов Fe³⁺ – на 74%, ионов Zn²⁺ – лишь на 14% (табл. 1). Вновь открытая металлопротеаза *B. subtilis* является первой бациллярной металлопротеазой, содержащей ион железа в активном центре и активирующаяся ионами железа.

Молекулярная масса металлопротеаз находится в пределах 35 кДа.

Все исследователи отмечают высокую термостабильность ферментов термолизиновой группы по сравнению с ферментами мезофильных микроорганизмов, однако между протеазами термофильных продуцентов наблюдаются значительные различия в их стабильности. Так, металлопротеазы *B. thermoproteolyticus*, *B. caldolyticus* и *B. stearothermophilus* CU 21 теряют 50% своей активности при 82, 76.7 и 68.8°C соответственно. Металлопротеаза *B. cereus* из группы бациллолизинов на 73% гомологична по аминокислотной последователь-

Табл. 1

Влияние ионов металла на активность металлопротеазы *B. subtilis* FP-133

Ион металла	Остаточная активность, %	Апоэнзим	Активность, %
Контроль (без ионов Me)	100	Контроль (без ионов Me)	0
Fe ²⁺	121	Fe ²⁺	65
Fe ³⁺	83	Fe ³⁺	74
Mn ²⁺	106	Mn ²⁺	0
Mg ²⁺	74	Zn ²⁺	14
Ni ²⁺	60		
Ca ²⁺	97		
Cu ²⁺	38		
Zn ²⁺	81		

ности с термолизом, содержит 1 ион Zn²⁺ и 4 иона Ca²⁺. Однако этот белок менее термостабилен, чем протеазы термолизиновой группы, он сохраняет половину своей активности в течение 1 ч при температуре 60°C [25].

4. Структурные особенности, механизм катализа и субстратная специфичность металлопротеаз

Металлопротеазы *B. thermoproteolyticus* (термолизин) [5], *B. stearothermophilus* [27], *B. subtilis* [28, 29], *B. cereus* [30], *B. polymyxa* [31], *B. caldolyticus* [32], *B. megaterium* [15], *B. amylohydrolyticus* [33], *B. mesentericus* [34], относящиеся к семейству M4, имеют высокую степень гомологии нуклеотидных последовательностей генов. Цинксвязывающие сайты и каталитические остатки этих протеаз являются консервативными. Металлопротеазы клана MA содержат в активном центре аминокислотные остатки His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) и формируют участок, связанный с атомом цинка. В этом пентапептиде X может быть любой аминокислотой, кроме пролина. Изучение пространственной структуры ферментов показало, что мотив HEXXH имеет форму петли, которая будет нарушаться жесткой структурой пролина [2].

На рис. 2 показана пространственная структура термолизина – типичного представителя семейства M4. Зрелая форма фермента состоит из 316 остатков, формирующих двухдоменную структуру, в которой N-концевая область представляет собой преобладающие β-складчатые полосы и C-концевая область состоит в основном из α-спиралей. Каталитически важный атом цинка локализован в глубокой впадине, которая находится между двумя доменами.

На рис. 3 схематически показано расположение атома цинка в активном центре и Ca-связывающих сайтов в молекуле термолизина. Активный центр термолизина содержит мотив His-Glu-Leu-Thr-His (HEALTH, остатки 142–146), который является общим для ферментов группы термолизина и в котором два гистидина являются лигандами цинка. Остаток Glu 166, отстоящий на 20 аминокислот от C-конца этого мотива и молекула воды определяют третий и четвертый лиганды для атома цинка, образуя тетрагональную геометрию.

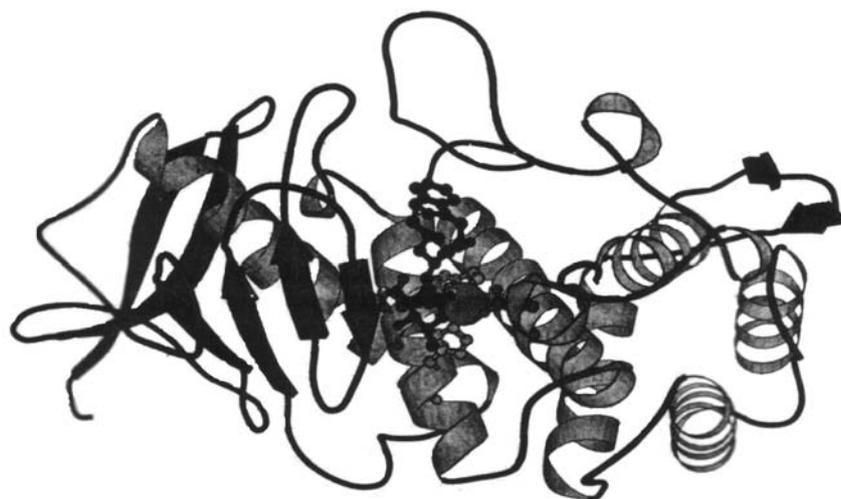


Рис. 2. Пространственная структура термолизина

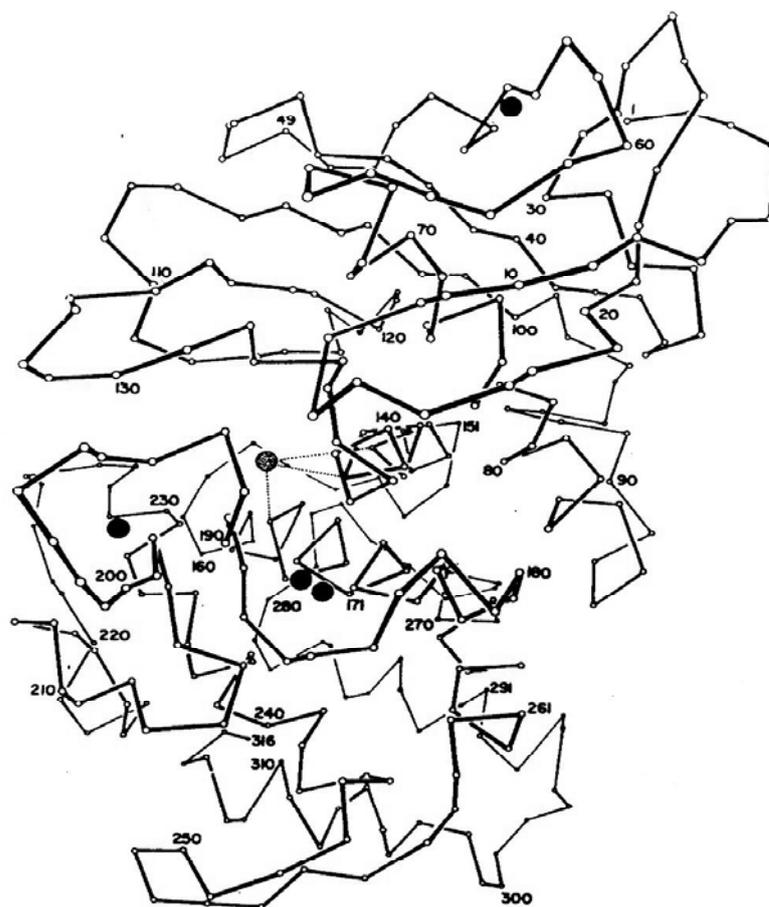


Рис. 3. Схема расположения атома цинка в активном центре и Са-связывающих сайтов в молекуле термолизина: ○ – атом цинка, ● – атомы кальция в Са-связывающих сайтах

Термолизин связан с четырьмя атомами кальция, два из которых (Ca1 и Ca2) находятся в двойном Ca-связывающем сайте рядом с впадиной активного центра, а Ca3 и Ca4 расположены в открытых выступающих петлях на N- и C-концах доменов соответственно (рис. 3) [3]. Ионы кальция не играют каталитическую роль, но защищают фермент от автолиза, они также могут быть заменены на различные другие ионы.

Механизм катализа в принципе не отличается от такового для ферментов других классов протеаз. Он представляет собой двухступенчатую реакцию гидролиза. Первая ступень – ацилирование, во время которого происходит образование промежуточного продукта фермент-пептид. На второй ступени – при деацилировании – этот промежуточный продукт подвергается нуклеофильной атаке молекулой воды, что приводит к гидролизу субстрата [16]. Кристаллографические исследования термолизина, проводимые параллельно с исследованиями цинковой эндопептидазы А, выявили общий механизм действия, существующий предположительно для семейства цинковых пептидаз [3].

На рис. 4 показаны сайты фермента и субстрата, которые важны для катализа. Звездочкой обозначен основной каталитический сайт фермента. По обе стороны каталитического сайта располагаются субсайты специфичности, каждый из которых способен взаимодействовать с боковой цепью одного аминокислотного остатка субстрата. Эти субсайты пронумерованы от каталитического сайта фермента в направлении N-конца от S1 до Sn и от S1' до Sn' в направлении C-конца. На субстрате аминокислотные остатки пронумерованы, соответственно, от P1 до Pn и от P1' до Pn' [16].

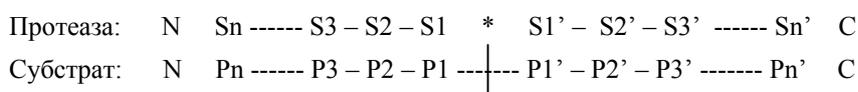


Рис. 4. Схема расположения активных сайтов термолизина [16]

Важно отметить, что для протеолитических ферментов, не относящихся к классу металлопротеаз, место гидролиза пептидной связи (так называемая первичная специфичность) определяется исключительно аминокислотным остатком в P1-положении. Для нейтральных протеаз первичная специфичность определяется по P1'-остатку, а аминокислотные остатки в положении P2, P3, P2', P3' влияют на скорость гидролиза. Субстратная специфичность большинства членов семейства M4 определяется, главным образом, гидрофобным остатком в P1'-положении.

Специфичность термолизина была изучена по гидролизу различных пептидов и модельных пептидных субстратов [3]. Главным специфическим сайтом фермента является сайт S1', который взаимодействует с большим гидрофобным остатком субстрата. Поэтому термолизин предпочтительно расщепляет пептиды и белки по Leu, Phe, Ile и Val. Порядок предпочтения термолизина к аминокислотам в положении P2 и P2' таков: Leu > Ala > Phe > Gly.

Активность термолизина может быть определена по гидролизу неспецифических субстратов, таких как казеин, но специфические субстраты являются предпочтительными. Используются также флуоресцентные и радиоактивные субстраты.

5. Термостабильность металлопротеаз

Нативные активные белки характеризуются внутримолекулярным тонким балансом нековалентных сил, таких как водородные связи, ионные пары, гидрофобные и ван-дер-ваальсовские взаимодействия. Высокая температура разрушает нековалентные взаимодействия, возникают локальные денатурированные области, что приводит к необратимой автолитической деградации белков (автолизу) [35, 36]. Автолиз представляет собой кинетику первого порядка, т. е. его скорость определяется локальным анфолдингом. Чем больше раскручивается цепь белка, тем быстрее инактивируется фермент.

Стабилизация белковой молекулы может быть повышена увеличением стабилизирующих и уменьшением дестабилизирующих взаимодействий. Среди различных стабилизирующих эффектов следует отметить высокую гидрофобность, более плотную упаковку молекулы, аминокислотные замены, формирование дополнительных водородных и дисульфидных связей, солевых мостиков и др. [37, 38]. Гидрофобный эффект является доминирующим фактором в белковом фолдинге. Особое значение для понимания проблемы стабилизации белковых молекул имеют работы Аргоса с соавторами, которые не только определили большинство стабилизирующих замен, но и указали на чрезвычайную важность, и возможно, ключевую роль регулярных пространственных структур (α -спиралей и β -складок), нарушение которых приводит к уменьшению количества водородных связей [39]. Использование компьютерного моделирования позволило авторам определить ряд универсальных аминокислотных замен: Lys/Arg, Ser/Ala, Gly/Ala, Ser/Thr, Ile/Val, Lys/Ala, Thr/Ala, Lys/Glu, Glu/Arg, Asp/Arg. Для увеличения стабильности белков иногда используют замены, приводящие к образованию дополнительных дисульфидных связей или вводят остатки пролина в петлевые области молекулы, расположенные на некотором расстоянии от активного центра. Стабилизирующее действие большинства введенных замен подтверждается генно-инженерными исследованиями.

Стабильность белковых молекул можно оценить величиной температуры плавления T_m , соответствующей температуре, при которой 50% молекул находится в денатурированной форме. Однако в настоящее время при изучении термостабильности белков исследователи все чаще используют величину T_{50} – температуру, при которой после определенного времени инкубации (30 или 60 мин) сохраняется 50% протеолитической активности.

В последние годы термолизинподобную протеазу *B. stearothermophilus* и бациллолизинподобную протеазу *B. cereus* используют как модели для изучения влияния аминокислотных замен на термостабильность фермента. На этих моделях было показано, что мутации, оказывающие наибольшее влияние на термостабильность фермента, находятся в области незащищенной петли N-концевого домена, которая вовлечена в формирование β -складчатой структуры и является критической для термостабильности [40, 41]. Так, в результате введения цистеиновых замен между остатками 8 и 60 были получены одиночные и двойные цистеиновые мутанты, у которых спонтанно *in vivo* сформирован дисульфидный мостик. Высокая стабильность такого фермента является редким примером успешной стабилизации молекулы белка при введении дополнительной дисульфидной связи. По-видимому, этот успех определяется тем, что му-

тация введена в вовлекаемую в частичный анфолдинг область, которая определяет термостабильность молекулы [40].

С помощью сайт-специфического мутагенеза был получен мутантный белок *B. stearothermophilus*, в молекулу которого введена метильная группа с помощью замены глицина 144 на аланин. Gly 144 располагался в α -спиральном участке, но не функционировал как каталитический сайт. В результате замены увеличивалась термостабильность мутантного белка и его специфическая активность, которая оказалась в 1.5 раза выше, чем у фермента дикого типа [42].

Эйсинк с соавторами методом сайт-направленного мутагенеза получили мутантный ген металлопротеиназы *prg B. stearothermophilis*, несущий мутацию Asn241/Leu в С-концевом домене. Остаток Asn241 присутствует во всех бациллярных нейтральных протеазах и находится в самом консервативном регионе молекулы. Изучение экспрессии мутантного гена *prg* показало, что белки дикого и мутантного типа имели одинаковый уровень продукции, однако замена полярного аспарагина на неполярный лейцин привела к повышению термостабильности белка на 0.7°C [43].

Были проведены эксперименты по введению нескольких аминокислотных замен в различные участки молекулы белка. Показано, что увеличение количества замен не всегда приводит к увеличению стабильности белка, иногда получали даже отрицательный эффект, что подтверждает предположение о том, что для термостабильности решающее значение имеют определенные структурные области белковой молекулы [36].

Применение стратегии использования аминокислотных замен для изучения стабильности белковых молекул позволило сформулировать следующие важные положения [36].

1. Влияние мутаций на стабильность протеаз зависит, по-видимому, не столько от природы аминокислотных остатков, сколько от области их локализации.

2. Стабилизирующее влияние нескольких аминокислотных замен может оказаться ниже, чем расчетная сумма их индивидуальных эффектов.

Итак, введение индивидуальных аминокислотных замен в различные регионы структуры белка и оценка влияния этих замен на изменение величины T_{50} позволяет определить те области молекулы, которые вовлечены в начальные этапы локальной денатурации.

Высокая термостабильность термолизина может определяться, по-видимому, связыванием с ионами кальция, поскольку в молекуле белка отсутствуют остатки цистеина и дисульфидные связи. Ионы кальция защищают молекулу белка от необратимого процесса термической инактивации, которая является причиной локального раскручивания белка, ведущего к быстрому автолизу. В процессе термальной денатурации могут высвободиться один или два атома кальция. В зависимости от условий проведения денатурации этими атомами могут оказаться Ca3 и/или Ca4. В молекуле менее стабильного бациллолизина отсутствуют ионы кальция (Ca3 и Ca4) в кальцийсвязывающих сайтах, что, возможно, является определяющим фактором в наблюдаемых различиях в стабильности ферментов группы бациллолизина по сравнению с ферментами группы термолизина [41]. Важность ионов кальция для стабильности белковой молеку-

Табл. 2

Термостабильность металлопротеаз мутантных штаммов *B. stearothermophilus* (TLP-ste)

CaCl ₂ , mM	TLP-ste <i>T</i> ₅₀ , °C	D57S <i>T</i> ₅₀ , °C	T63F – A69P <i>T</i> ₅₀ , °C	D57S – T63F – A69P <i>T</i> ₅₀ , °C
0.5	67.5	67.3	80.9	75.4
5.0	75.2	68.2	87.2	76.5
12.5	77.9	69.4	90.2	77.2

лы, в частности, термолизина, была подтверждена с помощью хелатора ЭДТА, присутствие которого приводило к быстрой аутолитической деградации [10].

Работы Вельман по изучению влияния ионов кальция на стабильность термолизинподобной протеазы *B. stearothermophilus* (TLP-ste), показали, что степень инициирования термальной инактивации зависит от освобождения одного иона Ca²⁺ из Ca-связанного сайта, и этим ионом может оказаться скорее Ca3, чем Ca4 [44]. Существует мнение, что сайты Ca3 и Ca4 более важны для термостабильности протеаз, чем ионы кальция, находящиеся в двойном Ca-связывающем сайте. Однако этот сайт, присутствующий во всех термолизинподобных протеазах, тоже важен для стабильности, так как без Ca1 невозможен правильный фолдинг молекулы, в то время как Ca2, вероятно, является менее важным, чем Ca1 [44]. Исследования по мутагенезу протеазы *B. stearothermophilus* обнаружили область рядом с Ca3-сайтом (остатки 55–69 в N-концевом домене), являющуюся критической для термальной стабильности [45, 46]. Для увеличения стабильности протеазы в этой критической области Asp57 заменили на Ser, так как в не термостабильных протеазах аминокислотный остаток в позиции 57 представляет собой серин. Asp57 образует две водородные связи в отличие от Asp59 и, по-видимому, является более важным для связывания с ионом кальция, чем Asp59. В табл. 2 представлены результаты по определению термостабильности металлопротеаз мутантного штамма *B. stearothermophilus* (TLP-ste). Мутация D57S уменьшала величину *T*₅₀ у мутантного белка *B. stearothermophilus* на 8.5°C (с 77.9 до 69.4°C). Кроме одиночного мутанта D57S в критической области 56–69 был получен двойной мутант T63F – A69P, который показал высокую стабильность белка (*T*₅₀ = 90.2°C против 77.9°C для дикого типа), вероятно, за счет введения гидрофобных остатков фенилаланина и пролина в регион, важный для потенциального анфолдинга и автолиза. Затем в этот двойной мутант ввели дополнительно одиночную мутацию D57S, которая привела к потере стабильности белка: *T*₅₀ уменьшилось с 90.2 до 77.2°C. Это снижение было значительнее, чем показано для единичной мутации D57S (13°C против 8.5°C). Проведенные исследования показали, что причиной уменьшения стабильности мутантного белка *B. stearothermophilus* являются структурные нарушения мутацией D57S в Ca3-связывающем сайте, приводящие к частично раскручиванию молекулы и, как следствие, к автолизу. Таким образом, эти эксперименты подтвердили, что сайт Ca3 является критическим для термальной стабильности фермента [44, 46].

В 1998 г. была опубликована работа, в которой описывалось получение уникального мутантного белка *B. stearothermophilus*, устойчивого к кипячению [47]. Стратегия получения гиперстабильного мутанта включала замещение

Табл. 3

Стабильность термолизинподобных протеаз

Протеаза	$T_{\text{опт}}$, °C	Время полужизни (t_{50}), мин		
		80°C	90°C	100°C
TLN	77	> 200	12.5	1
TLP-ste	74	17.5	1.5	< 0.5
Boilysin	95	стабилен	стабилен	170

Табл. 4

Влияние денатурирующих агентов* на активность восьмикратного мутанта *B. stearothermophilus* (Boilysin)

Gnd HCl, М	Остаточная активность, %		Urea, М	Остаточная активность, %		SDS, %	Остаточная активность, %	
	TLP-ste	Boilysin		TLP-ste	Boilysin		TLP-ste	Boilysin
0	100	100	0	100	100	0	100	100
1.0	99	95	1.0	87	91	0.5	37	81
2.0	62	83	2.0	7.5	93	1.0	0	40
3.0	0	68	3.0	3	86	1.5	0	22
4.0	0	50	4.0	0	72	2.0	0	0
5.0	0	40	5.0	0	63			

* Gnd HCl – гуанидинхлорид, Urea – мочевины, SDS – додецил сульфат Na.

аминокислотных остатков в молекуле белка дикого типа на остатки, которые обнаружены в соответствующих положениях у термостабильного термолизина в области 55–69: Ala4/Thr, Thr56/Ala, Gly58/Ala, Thr63/Phe, Ser65/Pro, Ala69/Pro. Кроме того, были введены две замены Gly8/Cys и Asn60/Cys, которые образовали дисульфидный мостик, лежащий в основе β -шпильки. Полученный восьмикратный мутантный белок, названный бойлизином (Boilysin), обладал устойчивостью к кипячению и денатурирующим агентам, что делало его похожим на белки термофильных штаммов *Archaea* и *Eubacteria*. Время его полужизни (t_{50}) равно 170 мин при 100°C, в то время как в этих же условиях белок дикого типа *B. stearothermophilus* имел t_{50} менее чем 0.5 мин, термолизин (TLN) – 1 мин (табл. 3).

Однако следует отметить, что, несмотря на экстремальную стабильность мутантного белка, его активность по гидролизу казеина и синтетических пептидных субстратов изменялась незначительно по сравнению с ферментом дикого типа. При температуре ниже 70°C его активность и активность исходного фермента были очень близкими. С увеличением температуры активность мутантного белка увеличивалась, а активность исходного фермента уменьшалась вследствие термической инактивации. Кроме того, восьмикратный мутант обладал высокой устойчивостью к действию денатурирующих агентов. Так, в присутствии гуанидинхлорида и мочевины в концентрации 4 М белок сохраняет свою активность на 50 и 72% соответственно, в присутствии 1% SDS активность сохраняется на 40% (табл. 4). Белок выделен, очищен и охарактеризован. РН-оптимум действия мутантного белка при 37°C находится в интервале 6.0–7.2, температурный оптимум 90°C [48].

Получение ферментов из термофильных микроорганизмов, которые могут выживать в экстремальных условиях, является важным для производства биокатализаторов. Часто ферменты не могут адаптироваться к экстремальным условиям, поэтому полученный восьмикратный мутантный белок с гиперустойчивостью к высоким температурам может найти применение в некоторых отраслях промышленности и в научных исследованиях. Так, была исследована возможность применения бойлизина в пептидном синтезе по сравнению с уже известным катализатором синтеза пептидных связей – термостабильным термолизином. Показано, что оба фермента ведут себя очень похоже в реакциях синтеза пептидных связей. Различия между этими ферментами проявляются при высоких температурах в отсутствие или при низких концентрациях ионов Ca^{2+} , причем бойлизин характеризуется более высокой скоростью реакции [49].

Доступность биокатализаторов и возможность их использования в настоящем и будущем является весьма привлекательной, так как благодаря своей высокой специфичности и экологической безопасности они становятся единственно возможными средствами биотехнологического производства. Однако, несмотря на их огромные экономические преимущества по сравнению с химическими катализаторами, производство термостабильных ферментов в необходимых для промышленности количествах все еще остается сложной задачей [50]. Поэтому всестороннему исследованию ферментов сегодня уделяется все больше внимания.

Заключение

В обзоре рассмотрены принципы классификации большого класса металлопротеаз, их структурные особенности, энзиматические свойства и стратегия повышения термостабильности белков. Анализ большого количества работ позволяет сделать несколько обобщающих выводов.

1. Классификация металлопротеаз, предложенная Барреттом, основывается на химической природе аминокислотных остатков и их расположении в активном центре. Это дает возможность определить, к какому клану и семейству относится вновь обнаруженный фермент.

2. Главным определяющим фактором в субстратной специфичности металлопротеаз является гидрофобный остаток в $\text{P1}'$ -положении.

3. Почти все металлопротеазы являются цинксодержащими ферментами и имеют рН-оптимум в нейтральной области рН, однако это правило не является универсальным.

4. В молекуле металлопротеазы может находиться от 2-х до 4-х атомов кальция, которые не участвуют в катализе, но защищают ее от необратимого процесса термической инактивации, приводящей к локальному анфолдингу и быстрому автолизу.

5. Металлопротеазы термофильных микроорганизмов обладают высокой термостабильностью, которая, однако, различна у разных видов бацилл.

6. Области регулярных пространственных структур (α -спирали и β -шпильки) являются критическими для стабильности белковых молекул.

7. Стабильность белковых молекул металлопротеаз может быть повышена за счет увеличения стабилизирующих эффектов, к которым относится высокая

гидрофобность, аминокислотные замены, формирование дополнительных водородных и дисульфидных связей, солевых мостиков и др.

8. Термостабильные металлопротеазы микроорганизмов, сохраняющие высокую специфичность в экстремальных условиях, являются экологически безопасными, экономически выгодными и эффективными средствами биотехнологического процесса и поэтому имеют огромные перспективы для промышленного применения.

В заключение необходимо отметить, что возможности современной генной инженерии в перспективе позволяют создавать ферменты, не существующие в природе, но максимально отвечающие требованиям биотехнологического производства и необходимые для обеспечения жизненно важных потребностей человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 05-04-48182а).

Summary

N.P. Balaban. Metalloproteases of bacilli. Classification, structure features and protein thermostability.

Current approach to classification of metalloproteases is based on chemical structure and the position of functional groups within active center. This review describes aspects of classification of this group of proteins, their unique crystal structure features, enzymatic properties and substrate specificity. Thermostability of bacillar metalloproteases, ways to improve their stability at higher temperatures and in the presence of denaturing agents, as well as their potential for biotechnology are also discussed.

Литература

1. Enzyme nomenclature 1992: recommendation of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. – San Diego, 1992. – P. 862.
2. *Rawlings N.D., Barrett A.J.* Proteolytic enzymes: aspartic and Metallopeptidases // *Methods in enzymology.* – 1995. – V. 248. – P. 183–228.
3. *Handbook of proteolytic enzymes / Eds. A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner.* – L.: Academic Press, 1998. – P. 992–1416.
4. *Endo S.* The protease produced by thermophilic bacteria. – *Hakko Kogaku Zashi*, 1962. – V. 40. – P. 346–347.
5. *Titani K., Hermodson M.A., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H.* Amino-acid sequence of thermolysin // *Nature new biology.* – 1972. – V. 238. – P. 35–37.
6. *Matthews B.W., Jansonius J.N., Colman P.M., Schoenborn B.P., Dupourque D.* Three-dimensional structure of thermolysin // *Nature new biology.* – 1972. – V. 238. – P. 37–41.
7. *Matthews B.W., Colman P.M., Jansonius J.N., Titani K., Walsh K.A., Neurath H.* Structure of thermolysin // *Nature new biology.* – 1972. – V. 238. – P. 41–44.
8. *Latt S.A., Holmquist B., Vallee B.L.* Thermolysin: a zinc metalloenzyme // *Biochem. And Biophys. Res. Commun.* – 1969. – V. 37, No 2. – P. 333–339.
9. *Feder J. Garrett L.R., Wildi B.S.* Studies of the role of calcium in the thermal stability of thermolysine // *Biochemistry.* – 1972. – V. 10, No 24. – P. 4554–4556.

10. Dahlquist F.W., Long J.F., Bigbee W.L. Role of calcium in the thermal stability of thermolysin // *Biochemistry*. – 1976. – V. 15, No 5. – P. 1103–1111.
11. Roche R.S., Voordouw G. The structure and function roles of metal ions in thermolysin // *CRC Crit. Rev. Biochem.* – 1978. – V. 5. – P. 1–23.
12. Thayer M.M., Flaherty K.M., McKay D.B. Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5 Å resolution // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266, No 5. – P. 2864–2871.
13. Серкина А.В., Шевелев А.Б., Честухина Г.Г. Структура и функции предшественников бактериальных протеиназ // *Биоорг. Химия*. – 2001. – Т. 27, № 5. – С. 323–340.
14. Mansfeld J., Peterman E., Durrschmidt P., Ulbrich-Hofman R. The propeptide is not required to produce catalytically active neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* // *Protein expression and purification*. – 2005. – V. 39. – P. 219–228.
15. Kühn S., Fortnagel P. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding a calcium-dependent exoprotease from *Bacillus megaterium* ATCC 14581 // *J. Gen. Microbiol.* – 1993. – V. 139, No 1. – P. 39–47.
16. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – V. 62, No 3. – P. 597–635.
17. Kim S.S., Kim Y.J., Rhee I.-K. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674 // *Arch. Microbiol.* – 2001. – V. 175. – P. 458–461.
18. Sookkheo B., Sinchaikul S., Phutrakul S., Chen S.-T. Purification and characterization of the highly thermostable protease from *Bacillus stearothermophilus* TLS 33 // *Protein expression and purification*. – 2000. – V. 20. – P. 142–151.
19. Fontana A. Structure and stability of thermophilic enzymes // *Biophys. Chem.* – 1998. – V. 29. – P. 181–193.
20. Feder J. A spectrophotometric assay for neutral protease // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1968. – V. 32. – P. 326–332.
21. Holmquist B., Vallee B.L. Metal substructure and inhibition of thermolysin: spectra of the cobalt enzyme // *J. Biol. Chem.* – 1974. – V. 249. – P. 4601–4607.
22. Holland D.R., Hausrath A.C., Juers D., Matthews B.W. Structural analysis of zinc substitutions in the active site of thermolysin // *Protein Sci.* – 1995. – V. 4, No 10. – P. 1955–1965.
23. Narasaki R., Kuribayashi H., Shimizu K., Imamura D., Sato T., Hasumi K. Bacillolysin MA, a novel bacterial metalloproteinase that produces angiostatin-like fragments from plasminogen and activates protease zymogens in the coagulation and fibrinolysis system // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, No 14. – P. 14278–14287.
24. Setyorini E., Takenawa S., Murakami S., Aoki K. Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular proteases from *Bacillus subtilis* strain FP-133 // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2006. – V. 70, No 2. – P. 433–440.
25. Feder J., Keay L., Garrett L.R., Cirulis N., Moseley M.H., Wildi B.S. *Bacillus cereus* neutral protease // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1971. – V. 251. – P. 74–78.
26. Stark W., Paupit R.A., Wilson K.S., Jansonius J.N. The structure of neutral protease from *Bacillus cereus* at 0.2-nm resolution // *Eur. J. Biochem.* – 1992. – V. 207. – P. 781–791.
27. Kubo M., Imanaka T. Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* // *J. Gen. Microbiol.* – 1988. – V. 134. – P. 1883–1892.

28. Yang M.Y., Ferrari E., Henner D.J. Cloning of the neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of the cloned gene to create an in vitro-derived deletion mutation // J. Bacteriol. – 1984. – V. 160, No 1. – P. 15–21.
29. Tran L., Wu X.C., Wong S.L. Cloning and expression of a novel protease gene encoding an extracellular neutral protease from *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 1991. – V. 173, No 20. – P. 6364–6372.
30. Wetmore D.R., Wong S.-L., Roche R.S. The role of the pro-sequence in the processing and secretion of the thermolysin-like neutral protease from *Bacillus cereus* // Mol. Microbiol. – 1992. – V. 6, No 12. – P. 1593–1604.
31. Takekawa S., Uozumi N., Tsukagoshi N., Udaka S. Proteases involved in generation of β - and α -amylases from a large amylase precursor in *Bacillus polymyxa* // J. Bacteriol. – 1991. – V. 173, No 21. – P. 6820–6825.
32. Van den Burg B., Enequist H.G., van den Haar M.E., Eijsink V.G., Stulp B.K., Venema G. A highly thermostable neutral protease from *Bacillus caldolyticus*: cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis* and characterization of the gene product // J. Bacteriol. – 1991. – V. 173, No 3. – P. 4107–4115.
33. Vasanta N., Thompson L.D., Rhodes C., Banner C., Nagle J., Filpula D. Genes for alkaline protease neutral protease from *Bacillus amyloliquefaciens* contain a large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein // J. Bacteriol. – 1984. – V. 159, No 3. – P. 811–819.
34. Stoeva S., Kleinschmidt T., Mesrob B., Braunitzer G. Primary structure of a zinc protease from *Bacillus mesentericus* strain 76 // Biochemistry. – 1990. – V. 29, No 2. – P. 527–543.
35. Vieille C., Zeikus G.J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2001. – V. 65, No 1. – P. 1–43.
36. Демидюк И.В., Заболотская М.В., Сафина Д.П., Костров С.В. Молекулярные механизмы стабилизации протеолитических ферментов. Модель термолизиноподобных микробных металлопротеиназ // Биоорг. химия. – 2003. – Т. 29, № 5. – С. 461–469.
37. Häse C.C., Finkelstein R.A. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases // Microbiol. Rev. – 1993. – V. 57, No 4. – P. 823–827.
38. Kumar S., Tsai C.-J., Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability // Protein engineering. – 2000. – V. 13, No 3. – P. 179–191.
39. Argos P., Rossman M.G., Grau U.M., Zuber H., Frank G., Tratshin J.D. Thermal stability and protein structure // Biochemistry. – 1979. – V. 18. – P. 5698–5703.
40. Mansfeld J., Vriend G., Dijkstra B.W., Veltman O.R., Van den Burg B., Venema G., Ulbrich-Hofman R., Eijsink V.G. Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272, No 17. – P. 11151–11156.
41. Paupit R.A., Karlsson R., Picot D., Jenkins J.A., Niclaus-Reimer F.-S., Jansonius L.N. Crystal structure of neutral protease from *Bacillus cereus* refined at 3.0 Å resolution and comparison with the homologous but more thermostable enzyme thermolysin // J. Mol. Biol. – 1988. – V. 199. – P. 525–537.
42. Takagi M., Imanaka T. Addition of a methyl group changes both the catalytic velocity and thermostability of the neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* // FEBS Lett. – 1989. – V. 254, No 1, 2. – P. 43–46.
43. Eijsink V.D.H., van der Zee J.R., Van den Burg B., Vriend G., Venema G. Improving the thermostability of the neutral protease of *Bacillus stearothermophilus* by replacing a buried asparagines by leucine // FEBS Lett. – 1991. – V. 282, No 1. – P. 13–16.
44. Veltman O.R., Vriend G., Berendsen H.J.C., Van den Burg B., Venema G., Eijsink V.G.H. A single calcium binding site is crucial for the calcium-dependent thermal stability of thermolysin-like proteases // Biochemistry. – 1998. – V. 37. – P. 5312–5319.

45. *Eijsink V.G.H., Veltman O.R., Auceta W., Vriend G., Venema G.* Structural determination of the stability of thermolysin-like proteinases // *Nature Struct. Biol.* – 1995. – V. 2. – P. 374–379.
46. *Veltman O.R., Vriend G., Van den Burg B., Hardy F., Venema G., Eijsink V.G.H.* Engineering thermolysin-like proteases whose stability is largely independent of calcium // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 405. – P. 241–244.
47. *Van den Burg B., Vriend G., Veltman O.R., Venema G., Eijsink V.G.H.* Engineering an enzyme to resist boiling // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1998. – V. 95. – P. 2056–2060.
48. *Van den Burg B., de Kreij A., Van der Veek P., Mansfeld J., Vriend G.* Characterization of a novel stable biocatalyst obtained by protein engineering // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1999. – V. 30. – P. 35–40.
49. *Kühn D., Dürrschmidt P., Mansfeld J., Ulbrich-Hofmann R.* Boilysin and thermolysin in dipeptide synthesis: a comparative study // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2002. – V. 36. – P. 71–76.
50. *Haki G.D., Rakshit S.K.* Developments in industrially important thermostable enzymes: a review // *Bioresource Technology.* – 2003. – V. 89, No 1. – P. 17–34.

Поступила в редакцию
15.11.06

Балабан Нэлли Павловна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Nellybalaban@yandex.ru