

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 579.6

### ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БАЦИЛЛЯРНЫХ ПРОТЕАЗ

*Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова*

#### Аннотация

В обзоре рассматриваются ведущие направления практического использования протеолитических ферментов в различных отраслях народного хозяйства, медицинской практике и области научных исследований. Показана возможность замены ферментов животного происхождения и химических соединений на более доступные и перспективные бактериальные ферменты.

**Ключевые слова:** бактериальные протеиназы, сериновые протеиназы, субтилизиноподобная протеиназа, глутамилэндопептидаза.

---

#### Введение

Коммерческий интерес к микробным ферментам, и в частности к протеиназам бацилл, объясняется недостаточной способностью известных и хорошо изученных протеолитических ферментов животных и растений полностью удовлетворять жизненные потребности населения планеты. Микроорганизмы представляют прекрасный источник ферментов благодаря их широкому разнообразию, простоте культивирования, безопасности в работе, способности к генетическим преобразованиям.

В настоящее время в крупномасштабном производстве применяются более 500 ферментных препаратов, используемых в различных областях промышленности: пищевой, кожевенной, текстильной, производстве детергентов и фармацевтических препаратов. Большую группу протеаз (65%) представляют технические ферменты, используемые в производстве детергентов, крахмала, текстиля, кожи, бумаги и продуктов гигиены. Вторая группа (25%) – это ферменты, используемые в пищевой промышленности: молочной, мясной, пивной, винной, соковой индустрии, производстве жиров и масел, хлебопекарном производстве. Третью группу (10%) составляют ферменты, используемые для производства кормов для скота [1].

Середина XX века характеризовалась быстрым развитием производства ферментов из сырья животного происхождения и их применением в различных отраслях народного хозяйства. Однако цена на такие ферменты высока из-за дорогостоящего содержания животных и длительного цикла их воспроизводства. Кроме того, имеются проблемы, связанные с экологией окружающей среды,

в частности трудности с утилизацией отходов. Микробные ферменты имеют ряд преимуществ перед ферментами животного происхождения и химическими соединениями, так как они высокоактивны, обладают специфической селективностью и легко биodeградируются.

В последние годы успешно развивается биотехнологическое производство бактериальных ферментов, используемых в промышленности, медицине, научных исследованиях, при этом предпочтение отдается протеолитическим ферментам, наиболее активным и стабильным при щелочных и нейтральных значениях pH: сериновым протеиназам (КФ 3.4.21) и металлопротеиназам (КФ 3.4.24). Кроме того, широко используются бактериальные кератинолитические ферменты, относящиеся к сериновым протеиназам (КФ 3.4.21.11) и металлопротеиназам (КФ 3.4.24.11), которые деградируют фибриллярные структуры кератиновых белков [2]. Непременным условием всех используемых ферментов является их низкая цена. Для этой цели применяются суперпродуценты, проводится оптимизация среды культивирования, применяются методы генетической и белковой инженерии, которые ведут к улучшению каталитических свойств и стабильности ферментов.

### 1. Применение ферментов в народном хозяйстве

**Детергенты.** Протеолитические ферменты являются стандартными компонентами различных моющих средств [3]. О первом протеазном детергенте было сообщено еще в 1914 г., при производстве которого были использованы панкреатическая протеаза и карбонат натрия. Первый детергент с бактериальной протеиназой появился значительно позже, в 1956 г., и назывался Био-40. Затем производство детергентов стало быстро развиваться. В настоящее время детергенты, в состав которых входят протеолитические ферменты, составляют до 90% продаж от всех протеазных продуктов в мире белков [2]. Основную часть этих ферментов составляют субтилизиноподобные протеиназы и металлопротеиназы из разных видов бацилл.

Основной характеристикой для выбора протеазы в качестве детергента является изоточка, так как протеазы более активны при pH раствора детергента, близком к изоточке фермента. Коммерческие препараты субтилизиноподобных протеиназ Эспереза из *B. licheniformis* и Савиназа из *Bacillus* sp. имеют высокую изоточку, что позволяет им сохранять активность в высокощелочных условиях (pH 8.0–12.0) [4]. Не менее важны и другие параметры, с помощью которых можно оценить действие протеазы: хорошая активность при стирке при соответствующих pH и температуре, устойчивость к действию различных хелатирующих и окислительных агентов, широкая специфичность для облегчения удаления разнообразных пятен от пищи, крови и других секретов, стабильность при высокой силе детергента, а также длительный период полужизни. Следует отметить, что некоторые современные ткани и синтетические волокна не выдерживают высоких температур, поэтому стирку приходится проводить с помощью детергентов, активных при низких температурах. Так, протеиназа Kannase из *Bacillus* sp. успешно используется в составе детергента при пониженных температурах [5].

С помощью генно-инженерных методов создаются рекомбинантные штаммы-продуценты, секретирующие протеазы с высокой стабильностью при повышенной

температуре и в присутствии денатурирующих агентов, что определяет перспективы их использования при производстве моющих средств.

**Кожевенная, текстильная и фотографическая промышленность.** Производство кожи – сложный и длительный процесс, который включает стадию замачивания кожи, удаления с ее поверхности волос, освобождение от пигмента, размягчение кожевенного сырья, дубление кожи. В традиционных методах обработки кожи используются вредные химические вещества, такие как сульфид натрия, который ухудшает экологическую обстановку и создает угрозу безопасности жизни. Протеазы обладают неоспоримыми преимуществами по сравнению с химическими методами, так как уменьшают загрязнение окружающей среды, улучшают качество кожи, ускоряют процесс ее выделки за счет уменьшения времени замачивания, удаляют поверхностный волосяной покров, увеличивают площадь кожи, избирательно гидролизуют белки, такие, как альбумины и глобулины [5]. В последнее время бактериальными ферментами с успехом заменяют традиционно используемые панкреатические протеазы.

Протеолитические ферменты применяются в производстве шелка. Необработанный натуральный шелк содержит до 25% серицина, из-за которого шелковые волокна становятся твердыми и грубыми. Традиционный метод удаления серицина является дорогостоящим и к тому же повреждает шелковое волокно. Новый эффективный метод удаления серицина основан на использовании протеиназы *Bacillus* sp. RGR-14, которая не повреждает шелковых волокон [6].

Щелочные протеазы играют важную роль в процессах восстановления фото- и рентгеновских пленок и регенерации серебра. Обычно пленки в своем желатиновом слое содержат до 2% серебра. Серебро получали сжиганием пленки, но этот процесс имеет два больших недостатка: происходит загрязнение окружающей среды и некоторые пленки не могут быть использованы для получения серебра. Поскольку серебро находится в связанной с желатином форме, то можно провести гидролиз белка и получить не только серебро, но и восстановить полиэфирную основу пленки для ее повторного использования. Этот метод широко применяется с использованием щелочных протеиназ *B. coagulans* и *B. subtilis* [5].

**Пищевая промышленность.** Использование протеолитических ферментов в пищевой промышленности известно с давних времен. Они применялись в производстве сыра, выпечке хлебобулочных изделий, производстве соевого гидролизата, для улучшения качества мяса.

В молочной промышленности протеазы применяются в основном в производстве сыра и его главного побочного продукта – белковой сыворотки. Важным фактором в протеолизе молока является наличие собственных протеаз, среди которых основным является фермент плазмин, относящийся к классу сериновых протеиназ (КФ 3.4.21.7). Плазмин гидролизует в казеине пептидные связи, образованные остатками лизина и аргинина, но практически не гидролизует связи в лактоальбумине и лактоглобулине. Максимальная активность плазмينا коровьего молока наблюдается при pH 7.5–8.0 и 37 °C. Плазмин молока не разрушается при пастеризации при pH 6.8 и короткое время достаточно устойчив при высокой температуре. Из молочной сыворотки получают различные белковые

продукты (казеинат, концентрат белковой сыворотки и др.), которые являются важными ингредиентами пищевых продуктов и используются при выпечке хлебобулочных изделий, в производстве масел, напитков, кондитерских изделий и мясных продуктов. Применяются они также для корма животных. Кроме того, казеинаты широко используются в производстве клея, красок, резиновых изделий, смазочных материалов и чистящих паст [7].

Для получения сыра широко используется молокосвертывающий фермент животного происхождения – химозин, который обладает высокой специфичностью к казеину. Получены микробные протеазы из генетически модифицированных непатогенных штаммов *B. subtilis*, *Endothia parasitica* и *Asp. niger*, которые с успехом заменили дорогостоящий химозин [8].

Белки животного (мясо, молоко, рыба) и растительного (соя, бобы, зерновые культуры) происхождения являются источниками различных пищевых белковых гидролизатов, которые применяются как компоненты диетических продуктов, обладающих высокой пищевой ценностью. Гидролизаты соевых белков успешно используются для производства различных напитков [4]. Обработка щелочными и нейтральными протеиназами соевых бобов значительно улучшает вкус соевого соуса и увеличивает выход продукта. С помощью протеиназ из *B. subtilis* и *B. licheniformis* получают рыбные гидролизаты высокого качества. Однако многие белковые гидролизаты содержат горечь за счет имеющихся в них пролиновых остатков и гидрофобных аминокислот, поэтому важной биотехнологической задачей является разработка методов уничтожения или уменьшения горечи. Одним из возможных решений этой проблемы является применение специфических пролилэндопептидаз, относящихся к классу сериновых протеиназ (КФ 3.4.21.26), способных вести ограниченный протеолиз по пролил-лейциновым пептидным связям и гидрофобным аминокислотам [9].

## 2. Использование протеиназ в медицинской практике

Протеолитические ферменты, в частности трипсин и химотрипсин, используются для лечения ран, ожоговых инфекций, артрита, при заболевании желудочно-кишечного тракта, а также при лечении тромбозов и послеоперационных осложнений в качестве противовоспалительных агентов [5]. Однако дефицит сырья животного происхождения стимулировал в конце XX в. быстрое развитие биотехнологического производства медицинских препаратов из микробного сырья. Так, разработанный в 1994 г. препарат протеиназы из *B. subtilis* 316М с эластазолитической активностью успешно заменил препарат животного происхождения для лечения ожогов, гнойных ран, фурункулов, карбункулов и глубоких абсцессов [10].

В настоящее время в связи с широким распространением сердечно-сосудистых болезней, часто осложняющихся тромбозом, лечение этого грозного заболевания представляет одну из актуальных проблем сердечно-сосудистых заболеваний и особенно часто при атеросклерозе и гипертонической болезни. Самое тяжелое осложнение при тромбозе – это тромбоз артерии, его движение по кровяному руслу и остановка в месте сужения артерии или атеросклеротической бляшки.

Факторами свертывания крови являются фибрин и фибриноген, последний способен под действием тромбина (КФ 3.4.21.5) превращаться в фибрин с образованием фибринового сгустка. Противосвертывающую систему крови составляют плазмин (КФ 3.4.21.7), его неактивный предшественник пламиноген, активаторы и ингибиторы этой системы. Если тонкое взаимоотношение свертывающей и противосвертывающей систем крови нарушается, то одним из проявлений этого нарушения может быть процесс тромбообразования.

Уже многие десятилетия в медицинской практике для лизиса тромбов используется препарат фибринолизин, получаемый из плазмы крови. Это протеолитический фермент с фибринолитической активностью, обладающий широкой субстратной специфичностью. Он гидролизует не только фибрин и фибриноген, но и казеин, глюкагон, желатин и другие субстраты; фибрин растворяется полностью, а фибриноген теряет способность свертываться в присутствии тромбина. Применение фибринолизина вместе с плазминогенными активаторами (трипсин, урокиназа, бактериальная стрептокиназа, стрептодорназа, стафилококкокиназа) дает хороший результат в тромболитической терапии, но эти препараты малодоступны из-за высокой стоимости [11]. К тому же некоторые бактериальные протеиназы дают побочные эффекты и не имеют высокой специфичности к фибрину.

Недоступность имеющихся агентов-тромболитиков в необходимых количествах для широкого применения в клинической практике способствовала интенсивному поиску новых ферментов из микроорганизмов с высокой тромболитической активностью. В 1996 г. Ким с соавторами сообщили о получении гомогенного препарата щелочной протеиназы из *Bacillus* sp. СК11-4 как потенциального тромболитического агента с высокой фибринолитической активностью, которая превышала в 2 раза таковую для субтилизина ВРН' и была выше в 3–8 раз по сравнению с другими известными протеиназами (протеиназа К, субтилизин Карлсберг, протеиназа из *B. licheniformis*, протеиназа из *Str. griseus*) [12]. Новые протеиназы QK-1 и QK-2 из *B. subtilis* QK02 и субтилизиноподобная протеиназа из *B. subtilis* TP-6 имеют высокий уровень фибринолитической активности и перспективны в тромболитической терапии [13, 14]. У субтилизиноподобной протеиназы *B. subtilis* DC33 уровень протеолитической активности в 6 раз выше, чем у субтилизина Карлсберг. Этот фермент разрушает фибриновые сгустки с помощью как образования активного плазмина из пламиногена, так и прямого лизиса фибриновых сгустков [15]. Тиолзависимая бактериальная протеиназа из *Th. vulgaris* ИНМИ-4а обладает фибринолитическим действием и активирует пламиноген, чем и объясняется тромболитический эффект фермента [16].

Препараты гомогенных субтилизиноподобных протеиназ *B. intermedius* и *B. amyloliquefaciens* обладают фибринолитическими, тромболитическими и антикоагулянтными свойствами, эффект которых сопоставим с таковым для протеиназы *Th. vulgaris* [16–20]. Субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus* обладает большей тромболитической активностью, чем протеиназы *B. intermedius* и *B. amyloliquefaciens*, так как она в более низких концентрациях способна лизировать преобразованный тромб. Этот факт имеет большое значение с точки зрения уменьшения побочных эффектов [20].

Таким образом, эти препараты бактериальных протеиназ могут рассматриваться как потенциально перспективные ферменты для применения их в качестве тромболитических препаратов.

В 2004 г. в НИИ цитологии и генетики СО РАН и НИИ ядерной физики им. Будкера СО РАН был разработан уникальный ферментный препарат тромбовазим на основе субтилаз *B. subtilis* для лечения нестабильной стенокардии и острого инфаркта миокарда [21]. Тромбовазим представляет собой иммобилизованный на полиэтиленоксиде высокоочищенный препарат протеиназ из *B. subtilis*. Общеизвестным считается мнение, что не следует применять тромболитики для лечения нестабильной стенокардии. Основная причина осложнений заключается в механизме действия фермента – активируется процесс фибринолиза, ведущий к превращению плазминогена в плазмин, что, в свою очередь, на фоне длительного применения антикоагулянтов может привести к нарушению взаимоотношений свертывающей и противосвертывающей систем. Разработанный препарат тромбовазим – принципиально новый тромболитик, который не активирует плазминоген, поэтому он может применяться для лечения нестабильной стенокардии. Он обладает прямым фибринолитическим действием на тромб, постепенно разрушая его, при этом не нарушается хрупкое равновесие плазминоген – плазмин. Тромбовазим с его антитромбическими свойствами в настоящее время не имеет аналогов среди известных лекарственных препаратов такого типа действия. Показана возможность применения тромбовазима при лечении острого инфаркта миокарда, когда необходимо незамедлительное разрушение тромба и восстановление кровотока коронарной артерии. Он может использоваться в высоких дозах (30 ед./кг и выше) как мощный и безопасный тромболитик при остром инфаркте миокарда, а в малых дозах (до 10 ед./кг) он рекомендуется в качестве кардиопротектора. Тромбовазим обладает низкой токсичностью, что делает возможным его использование не только в условиях стационарного лечения.

Таким образом, в тромболитической терапии замена препаратов животного происхождения на препараты микробного происхождения является реальной возможностью. В связи с этим необходимо проводить интенсивный поиск штаммов-продуцентов протеолитических ферментов с высокой фибринолитической, тромболитической и антикоагулянтной активностью.

### **3. Применение протеиназ для определения аминокислотной последовательности белков и пептидов**

Микробные протеиназы наряду с протеазами животного происхождения используются для гидролиза пептидных связей при определении аминокислотной последовательности белков и полипептидных фрагментов. Протеиназы с узкой субстратной специфичностью позволяют более детально проводить такие исследования. Так, для определения первичной структуры внутриклеточной сериновой протеиназы *B. amyloliquefaciens* Суровой с соавторами были получены триптический и хмотриптический гидролизаты, содержащие длинные аминокислотные последовательности белка, при этом оставались неясными расположение многих пептидов в цепи и отдельные участки ее структуры [22, 23]. Для детального исследования первичной структуры белка был получен третий гидролизат с использованием глутамилэндопептидазы *Thermoactinomyces* sp., расщепляющей

пептидные связи предпочтительно по остаткам глутаминовой кислоты. В результате изучения структуры пептидов трех гидролизатов были определены все аминокислотные остатки, составляющие структуру внутриклеточной сериновой протеиназы *B. amyloliquefaciens*, а также обнаружен один пептид, содержащий цистеин, который ранее не был найден в триптическом гидролизате. Таким образом, была реконструирована полная аминокислотная последовательность белка, состоящая из 297 аминокислотных остатков и содержащая 2 остатка цистеина [24].

При определении аминокислотной последовательности парвальбумина из лягушки *Rana catesbeiana* (pI 4.78) Така с соавторами использовали комбинацию методов масс-спектрометрии, аминокислотного анализа и гидролиза полипептидной цепи белка с помощью Arg-специфичной протеиназы и глутамилэндопептидазы *S. aureus* V8. На С-конце молекулы белка обнаружено 25 консервативных аминокислотных остатков, 11 из которых расположены в областях предполагаемых Ca-связывающих сайтов. Кроме того, консервативными оказались аминокислотные остатки Arg75 и Glu81, предположительно образующие солевой мостик внутри молекулы парвальбумина [25].

С помощью ограниченного протеолиза Lys-специфичной эндопептидазой и глутамилэндопептидазой *S. aureus* V8 была исследована структурная и функциональная организация анти-HIV и антираковых белков MAP30 и CAP31 [26]. Белки были устойчивы к гидролизу этими протеиназами при небольших концентрациях ферментов. В присутствии 10% этих ферментов центральные области исследуемых белков оставались интактными к протеолизу, но N- и С-концы были доступны гидролитическому расщеплению. Установлено, что полученные фрагменты белков MAP30 и CAP31 обладают биологической активностью против HIV-1 и раковых клеток и минимальным цитотоксическим эффектом в отношении нормальных клеток. Эти результаты являются перспективными для разработки новых антивирусных и антиопухолевых препаратов.

#### 4. Протеолитические ферменты – катализаторы синтеза пептидных связей

Сериновые протеиназы и металлопротеиназы широко используются в ферментативном синтезе пептидных связей. Ферментативный синтез является удобным способом получения многих модельных и физиологически активных пептидов и имеет ряд преимуществ по сравнению с химическим: протекает в мягких условиях, имеет высокую региональную стереоспецифичность (отсутствует рацемизация), не требует времени на защиту боковых функциональных групп [27, 28]. Кроме того, важно, что в ферментативном синтезе используются незначительные количества фермента и имеется возможность применения иммобилизованных протеиназ.

В качестве биокатализаторов синтеза пептидных связей обычно используются субтилизины, субтилизиноподобные и химотрипсиноподобные протеиназы, термолизин. Субтилизиноподобные протеиназы обладают широкой субстратной специфичностью, что делает их перспективными для получения синтетических дипептидов [29], трипептидов [30], пептидов средней длины и биологически активных соединений [31].

Синтетические хромогенные *n*-нитроанилиды ацилированных пептидов являются удобными субстратами, используемыми в белковой химии для быстрого

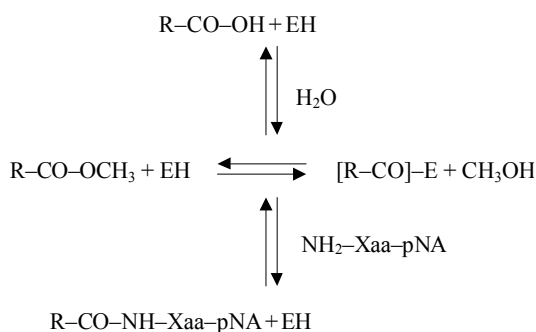


Рис. 1. Реакция конденсации с образованием промежуточного ацилферментного комплекса, где EH – фермент

определения активности протеолитических ферментов и изучения их субстратной специфичности. Эти соединения общей формулы X–A–B–C–pNA, где X – защитная группировка (например, *o*-бензилоксикарбонильная), pNA – *n*-нитроанилидный остаток, A, B – чаще всего это остатки глицина или аланина, а C – остаток лейцина или фенилаланина, хорошо соответствуют специфичности ряда внеклеточных сериновых протеиназ микроорганизмов. Протеиназы гидролизуют в таких субстратах связь между остатком лейцина или фенилаланина и *n*-нитроанилидным остатком, что приводит к освобождению *n*-нитроанилина, поглощающего при длине волны 410 нм [32].

Реагентами реакции конденсации являются карбоксильный компонент – метиловый эфир N-ацетилпептида (или N-ацетилпептид со свободной COOH-группой) – и аминокомпонент – *n*-нитроанилид гидрофобной аминокислоты. На первой стадии конденсации происходит ацилирование фермента с образованием промежуточного ацилферментного комплекса [R–CO]–E. Далее этот комплекс подвергается нуклеофильной атаке водой или аминокомпонентом NH<sub>2</sub>–Xaa–pNA. В первом случае осуществляется гидролиз ацилфермента, во втором случае происходит аминолиз ацилфермента с образованием пептидной связи (рис. 1). Преимущественное образование пептидной связи и максимальный выход продукта зависят от соотношения начальных скоростей аминолиза и гидролиза ацилфермента, гидролиза донора ацильной группы и вторичного гидролиза пептидных связей синтезируемого продукта [33].

Для получения целевого продукта необходимо сдвигать равновесие в сторону образования пептидных связей, что обеспечивается удалением готового продукта из сферы реакции в виде осадка или экстракцией органическим растворителем при проведении процесса в гетерофазной системе [32].

Конденсация метилового эфира бензилоксикарбонилдипептида Z–Ala–Ala–OCH<sub>3</sub> с *n*-нитроанилидами лейцина Leu–pNA и аланина Ala–pNA была осуществлена в присутствии сериновой протеиназы *Asp. oryzae* с выходом 57% и 42% соответственно. При использовании субтилизина Карлсберг в тех же условиях выход целевого продукта Z–Ala–Ala–Leu–pNA составил 72% [33].

Проведение реакции конденсации обычно затруднено из-за большой гидрофобности карбоксильного компонента. Для более полного его растворения используют высокие концентрации диметилформамида (ДМФА), однако при этом падает активность фермента. Для получения хорошего выхода целевого



продукта нужно увеличивать не только количество фермента, но и время процесса конденсации [34].

Нами показана возможность использования субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B. intermedius* 3-19 как катализатора синтеза пептидных связей. Реакцию конденсации эфира бензилоксикарбонилтрипептида с *n*-нитроанилидом фенилаланина проводили в трис-НСl буфере рН 8.0 с добавлением 70% ДМФА. Предварительно было установлено, что протеиназа *B. intermedius* в присутствии 70%-ного ДМФА теряет свою активность лишь на 25–30% в течение 24 ч инкубации. Образующиеся продукты реакции Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA и DNP-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA, содержащие гидрофобные аминокислотные остатки, выпадали в осадок, что приводило к дополнительному смещению равновесия в сторону синтеза. Оба продукта были получены с выходом 55–57% [35]. Субтилизиноподобная протеиназа *B. amyloliquefaciens* также способна катализировать синтез пептидных связей: был получен пептид Z-Ala-Ala-Leu-pNA с хорошим выходом, который сопоставим с результатами для протеиназ из *B. subtilis* и субтилизина Карлсберг [36].

Узкоспецифичные ферменты, в частности глутамилэндопептидазы, также могут быть использованы как катализаторы реакций пептидного синтеза. Для этой цели используются лишь доступные коммерческие препараты глутамилэндопептидаз *B. licheniformis* и *S. aureus* V8 [28]. Так, глутамилэндопептидаза *S. aureus* V8 была применена в качестве катализатора синтеза пептидных связей в реакции конденсации в ацетонитриле с низким содержанием воды (5 об. %) с использованием эфиров ди- и трипептидов Z-Ala-Glu-OMe и Z-Ala-Ala-Glu-OMe. Интересно, что в этих же условиях реакция конденсации метиловым эфиром Z-Asp-OMe вообще не осуществлялась [37].

Таким образом, ферментативный синтез пептидных связей является удобным и эффективным препаративным способом получения многих модельных и физиологически активных пептидов с высоким выходом продуктов реакции, имеет ряд преимуществ перед химическим синтезом и может осуществляться протеиназами микроорганизмов как с широкой, так и с узкой субстратной специфичностью.

### Заключение

Анализ литературных данных по практическому применению протеолитических ферментов позволяет сделать следующие выводы.

Протеиназы микроорганизмов, применяющиеся в пищевой, кожевенной, текстильной, детергентной и других областях промышленности, могут с успехом заменить протеазы животного происхождения.

Бактериальные сериновые протеиназы со строгой субстратной специфичностью могут применяться для определения аминокислотной последовательности белков и пептидных фрагментов.

Протеиназы бактерий, обладающие фибринолитической, тромболитической и антикоагулянтной активностью, могут использоваться в медицине и ферментативном синтезе модельных и физиологически активных пептидов.

Итак, бактериальные ферменты представляют практический и научный интерес. Основным направлением белковых и генно-инженерных исследований в перспективе станет создание протеолитических ферментов с абсолютно но-

выми свойствами, масштаб использования которых в биотехнологических производствах будет значителен в связи с активно развивающейся технологией получения этих белков и совершенствованием методов геной и белковой инженерии.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № П815).

### Summary

*N.P. Balaban, M.R. Sharipova.* Practical Application of Bacilli Proteases.

This review describes the main directions of practical use of proteolytic enzymes in various sectors of economy, medical practice, and research. It also demonstrates the possibility of replacement of animal enzymes and chemical compounds by more affordable and perspective bacterial enzymes.

**Key words:** bacterial proteinases, serine proteinases, subtilisin-like proteinase, glutamyl endopeptidase.

### Литература

1. *Cherry J.R., Fidantsef A.L.* Directed evolution of industrial enzymes: an update // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2003. – V. 14, No 4. – P. 436–443.
2. *Gupta R., Ramnani P.* Microbial keratinases and their prospective applications: an overview // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – V. 70, No 1. – P. 21–33.
3. *Kumar C.G., Malik R.A., Tiwari M.R.* Novel enzyme-based detergents: an Indian perspective // *Curr. Sci.* – 1998. – V. 75, No 12. – P. 1312–1318.
4. *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.
5. *Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P.* Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – V. 59, No 1. – P. 15–32.
6. *Puri S., Beg Q.K., Gupta R.* Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. using response surface methodology // *Curr. Microbiol.* – 2002. – V. 44, No 4. – P. 286–290.
7. *Nielsen S.S.* Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles and relationship // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – V. 50, No 22. – P. 6628–6634.
8. *Perea A., Ugalde U., Rodriguez I., Serra J.L.* Preparation and characterization of whey protein hydrolyzates: application in industrial whey bioconversion processes // *Enzym. Microb. Technol.* – 1993. – V. 15, No 5. – P. 418–423.
9. *FitzGerald R.J., Cuinn G.O.* Enzymatic debittering of food protein hydrolysates // *Biotechnol. Adv.* – 2006. – V. 24, No 2. – P. 234–237.
10. *Kudrya V.A., Simonenko I.A.* Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1994. – V. 41, No 5. – P. 505–509.
11. *Alessi M.C., Juhan-Vague I.* Thrombolytics and their use // *Rev. Prat.* – 1999. – V. 49, No 15. – P. 1654–1658.
12. *Kim W., Choi K., Kim Y., Park H., Choi J., Lee Y., Oh H., Kwon I., Lee S.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4

- screened from chungkook-jang // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – V. 62, No 7. – P. 2482–2488.
13. Ko J.H., Yan J.P., Zhu L., Qi Y.P. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02 // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* – 2004. – V. 137, No 1. – P. 65–74.
  14. Kim S.B., Lee D.W., Cheigh C.I., Choe E.A., Lee S.J., Hong Y.H., Choi M.J., Pyun Y.R. Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, Tempeh // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – V. 33, No 6. – P. 436–444.
  15. Wang C.T., Ji B.P., Li B., Nout R., Li P.L., Ji H., Chen L.F. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – V. 33, No 9. – P. 750–758.
  16. Руденская Г.Н., Лютова Л.В., Андреевко Г.В., Карабасова М.А., Цаплина И.А., Степанов В.М. Исследование фибринолитических и тромболитических свойств тиолзависимой сериновой протеиназы из *Thermoactinomyces vulgaris* in vitro // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 1987. – Т. 23, № 6. – С. 754–760.
  17. Лютова Л.В., Андреевко Г.В., Карабасова М.А., Цаплина И.А., Руденская Г.Н. Исследование тромболитических свойств тиолзависимой сериновой протеиназы (ТСП) из *Thermoactinomyces vulgaris* in vivo // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 1990. – Т. 26, № 5. – С. 623–628.
  18. Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Ицкович Е.Л., Лецинская И.Б., Руденская Г.Н. Секретируемая сериновая протеиназа спорообразующих бактерий *Vacillus intermedius* 3-19 // *Биохимия.* – 1994. – Т. 52, № 9. – С. 1093–1099.
  19. Ицкович Е.Л., Лютова Л.И., Балабан Н.П., Марданова А.М., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р., Лецинская И.Б., Руденская Г.Н. Тромболитические и антикоагулянтные свойства тиолзависимой сериновой протеиназы *Vacillus intermedius* 3-19 // *Вопр. мед. химии.* – 1998. – № 3. – С. 288–291.
  20. Балабан Н.П., Марданова А.М., Маликова Л.А., Ильинская О.Н., Шарипова М.Р. Биосинтез субтилизиноподобной протеиназы *Vacillus amyloliquefaciens* H2 и биологические свойства фермента // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2008. – Т. 150, № 2. – С. 81–90.
  21. Гришин О.В., Верещагин Е.И., Троицкий А.В. Применение тромбовазима для лечения нестабильной стенокардии. – 2004. – URL: <http://www.infarktu.net/catalog/articles/146>, свободный.
  22. Сурова И.А., Янонис В.В., Ревина Л.П., Левин Е.Д., Степанов В.М. Первичная структура внутриклеточной сериновой протеиназы *Vacillus amyloliquefaciens* I. Выделение фермента и определение аминокислотной последовательности пептидов триптического гидролизата // *Биоорг. химия.* – 1988. – Т. 14, № 6. – С. 783–796.
  23. Сурова И.А., Янонис В., Ревина Л.П., Остославская В.И., Колесникова Л.А., Тимохина Е.А., Левин Е.Д., Степанов В.М. Первичная структура внутриклеточной сериновой протеиназы *Vacillus amyloliquefaciens*. II. Аминокислотная последовательность пептидов химотриптического гидролизата // *Биоорг. химия.* – 1994. – Т. 20, № 4. – С. 382–392.
  24. Сурова И.А., Ревина Л.П., Янонис В.В., Колесникова Л.А., Степанов В.М. Первичная структура внутриклеточной сериновой протеиназы *V. amyloliquefaciens*. III. Аминокислотная последовательность пептидов, полученных гидролизом Glu, Asp-специфичной протеиназой. Реконструкция полной аминокислотной последовательности протеиназы // *Биоорг. химия.* – 1994. – Т. 20, № 12. – С. 1310–1325.
  25. Taka H., Kaga N., Fujimura T., Mineki R., Imaizumi M., Suzuki Y., Suzuki R., Tanokura M., Shindo N., Murayama K. Rapid determination of parvalbumin amino acid sequence from

- Rana catesbeiana* (pI 4.78) by combination of ESI mass spectrometry, protein sequencing, and amino acid analysis // *J. Biochem.* – 2000. – V. 127, No 5. – P. 723–729.
26. *Huang Ph.L., Sun Y., Chen H., Kung H., Huang P.L., Lee-Huang S.* Proteolytic fragments of anti-HIV and anti-tumor proteins MAP30 and GAP31 are biologically active // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – V. 262, No 3. – P. 615–623.
27. *Bordusa F.* Nonconventional amide bond formation catalysis: programming enzyme specificity with substrate mimetics // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2000. – V. 33, No 5. – P. 469–485.
28. *Мильготина Е.И., Воюшина Т.Л., Честухина Г.Г.* Глутамилэндопептидазы. Структура, функции, практическое использование // *Биоорганическая химия.* – 2003. – Т. 29, № 6. – С. 563–576.
29. *Barros R.J., Wehtje E., Adlercreutz P.* Enhancement of immobilized protease catalyzed dipeptide synthesis by the presence of insoluble protonated nucleophile // *Enzyme Microb. Technol.* – 1999. – V. 24, No 8–9. – P. 480–488.
30. *So J.-E., Shin J.-S., Kim B.-G.* Protease-catalyzed tripeptide (RGD) synthesis // *Enzyme Microb. Technol.* – 2000. – V. 26, No 2–4. – P. 108–114.
31. *Isono Y., Nakajima M.* Enzymic peptide synthesis using a microaqueous highly concentrated amino acid mixture // *Process Biochem.* – 2000. – V. 36, No 3. – P. 275–278.
32. *Люблинская Л.А., Воюшина Т.Л., Степанов В.М.* Ферментативный синтез пептидных субстратов сериновых протеиназ // *Биоорганическая химия.* – 1982. – Т. 8, № 12. – С. 1620–1623.
33. *Ваганова Т.И., Иванова Н.М., Ходова О.М., Воюшина Т.Л., Степанов В.М.* Выделение и свойства сериновой протеиназы *Aspergillus oryzae* // *Биохимия.* – 1991. – Т. 56, № 1. – С. 125–135.
34. *Воюшина Т.Л., Терентьева Е.Ю., Позднеев В.Ф., Гайда А.В., Гололобов М.Ю., Люблинская Л.А., Степанов В.М.* Ферментативный синтез ацилпептидов, содержащих п-нитроанилиды основных аминокислот // *Биоорганическая химия.* – 1991. – Т. 17, № 8. – С. 1066–1073.
35. *Ицкович Е.Л., Балабан Н.П., Марданова А.М., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р., Лецинская И.Б., Ксенофонтов А.Л., Руденская Г.Н.* Энзиматические свойства тиолазависимой сериновой протеиназы *Vacillus intermedius* 3-19 // *Биохимия.* – 1997. – Т. 62, № 1. – С. 60–65.
36. *Аникина О.М., Семашко Т.А., Оксенойт Е.С., Лысогогорская Е.Н., Филлипова И.Ю.* Субтилизин Карлсберг, нативный и модифицированный, – эффективный катализатор синтеза пептидной связи в органической среде // *Биоорганическая химия.* – 2006. – Т. 32, № 2. – С. 130–136.
37. *Cerovsky V.* V8 proteinase-catalyzed peptide synthesis in hydrophilic organic solvents with low water content // *Tetrahedron Lett.* – 1991. – V. 32, No 28. – P. 3421–3424.

Поступила в редакцию  
19.04.11

---

**Балабан Нэлли Павловна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [NellyBalaban@yandex.ru](mailto:NellyBalaban@yandex.ru)

**Шарипова Маргарита Рашидовна** – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Margarita.Sharipova@ksu.ru](mailto:Margarita.Sharipova@ksu.ru)