

О.В. Мацелюх

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ДСП,  
Д03680, Україна, тел.: +38(044)526 23 39,  
e-mail: oivanko@yahoo.com

## СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ СЕРИНОВОЇ ЛУЖНОЇ ПЕПТИДАЗИ *BACILLUS THURINGIENSIS* ІМВ В-7324

**Мета.** Дослідження субстратної специфічності серинової лужної пептидази *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324. **Методи.** Для вивчення субстратної специфічності використовували білки: казеїн, еластин, фібрин, фібриноген, колаген, желатин, гемоглобін. Визначення первинної субстратної специфічності проводили, використовуючи синтетичні хромогенні субстрати. Максимальну швидкість ( $V_{max}$ ) та константу Міхаеліса ( $K_m$ ) визначали за методом Лайнуївера-Берка із кривої залежності швидкості ензимної реакції від концентрації субстрату, побудованою за методом подвійних обернених величин в координатах ( $1/V-1/[S]$ ). **Результати.** Показано, що ензим має субстратну специфічність, подібну до протеаз субтилізинового типу, що визначається здатністю гідролізувати специфічні хромогенні субстрати Z-Ala-Ala-Leu-pNa і Z-Gly-Gly-Phe-pNa, а також володіє естеразною активністю. Кінетичні параметри реакції гідролізу специфічного субстрату еластаз N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa складають 0,83 мМ ( $K_m$ ) і 20,1 ммоль·мл<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup> ( $V_{max}$ ). **Висновки.** Здатність еластолітичної пептидази *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 гідролізувати широкий спектр нативних білків фібрилярної і глобулярної природи обумовлена її специфічністю щодо залишків гідрофобних амінокислот – аланіну, лейцину, фенілаланіну. За кінетичними параметрами виділений ензим не поступається панкреатичній еластазі та є перспективним для практичного застосування.

**Ключові слова:** *Bacillus thuringiensis*, еластаза, субстратна специфічність, синтетичні субстрати.

Еластази (або еластолітичні пептидази) – це ряд ендопептидаз, які належать до різних каталітичних типів: серинових, цистеїнових і металопептидаз [7, 13, 17]. Найбільш вивченими є панкреатична і лейкоцитарна еластази (КФ 3.4.21.36, 3.4.21.37 відповідно) вищих тварин, які відносяться до типу серинових пептидаз і специфічні до пептидних зв'язків, що утворені карбоксильними групами аланіна, валіна, лейцина, ізолейцина, а також залишками інших гідрофобних амінокислот. Відомості про синтез і властивості еластаз мікробного походження розрізнені і досить обмежені. Відомо, що такі ензими синтезують окремі представники родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Aspergillus* [3]. Встановлено, що еластаза *P. aeruginosa* (КФ 3.4.24.26) є цинквмісною метало-пептидазою, а представники бацил синтезують лужні серинові еластолітичні



пептидази. Але, не дивлячись на відмінності у механізмі каталітичної дії, ці ензими однаково ефективно гідролізують еластин.

Раніше [3] було виділено і очищено пептидазу *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 з високою еластазною активністю, визначено оптимальні умови її дії і показано високу стабільність очищеного препарату в досліджуваних діапазонах рН і температур. Нами встановлено, що ензим, крім еластазної, мав ще й фібринолітичну активність. Базуючись на впливі специфічних хімічних реагентів, катіонів металів і аніонів на еластолітичну і фібринолітичну активність, нами було зроблено припущення, що пептидаза *B. thuringiensis* є металактивованою пептидазою і присутність металу в структурі молекули є необхідною в першу чергу для зв'язування високомолекулярних нативних субстратів. Метою даної роботи було дослідження субстратної специфічності серинової лужної пептидази *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324.

### Матеріали та методи

Об'єктом дослідження була позаклітинна серинова лужна пептидаза штаму *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 з еластазною активністю. Культивування штаму та отримання очищеного ензимного препарату еластолітичної пептидази проводили, як описано раніше [3].

Загальну казеїнолітичну активність визначали за методом Ансона в модифікації Петрової [5], який базується на кількісному визначенні тирозину, що утворюється при гідролізі казеїну по Гаммерстену. Продукти розщеплення визначали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 670 нм. За одиницю активності приймали здатність ензиму за 1 хв при температурі 37 °С перетворювати казеїн в неосаджений трихлороцтовою кислотою стан в кількості, що відповідає 1 мкмоль тирозину. Для визначення гемоглобінолітичної активності як субстрат використовували гемоглобін, попередньо денатурований 6% розчином сечовини. Порядок визначення активності аналогічний визначенню загальної казеїнолітичної активності [5]. Желатиназну активність визначали за методом Іванова, приймаючи за одиницю активності таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз желатини з утворенням 1 мг азоту за 1 год. Еластазну активність визначали колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ензиматичному гідролізі еластину, забарвленого конго червоним [16]. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 515 нм. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз 1 мг еластину за 1 хв. Визначення фібринолітичної активності проводили за методом [11], використовуючи як субстрат фібрин. Утворення продуктів розщеплення фібрину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібринолітичної активності брали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв. Визначення фібриногенолітичної активності проводили аналогічно фібринолітичній активності, беручи за субстрат фібриноген. За одиницю фібриногенолітичної активності брали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв. Колагеназну активність визначали за методом



[10]. Продукти розщеплення колагену визначали в реакції з нінгідрином на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 600 нм. За одиницю колагеназної активності приймали кількість мкмолей вивільненого лейцину за 1 хв.

Визначення активності пептидаз щодо синтетичних субстратів проводили за методом [10]. Концентрація відщепленого в результаті реакції *para*-нітроаніліду (*pNA*) пропорційна активності пептидази і визначається за збільшенням поглинання при довжині хвилі 405–410 нм. Одиниці активності розраховували за формулою:

$$од / мл = \frac{(A_{410(мест)} - A_{410(контроль)}) \times 3 \times a}{8,8 \times 0,1},$$

де 3 – це об'єм реакційної суміші, мл, а – фактор розведення, 8,8 – мілімолярний коефіцієнт екстинкції для *pNA*, 0,1 – об'єм пептидази в реакції, мл. В реакції застосовували синтетичні хромогенні субстрати («Sigma Aldrich», США).

Для визначенні естеразної активності використовували етиловий ефір *N*-бензоїл-*D,L*-аргініну (БАЕЕ) і метиловий ефір *N*-бензоїл-*D,L*-тирози́ну (БТМЕ). Утворення продуктів гідролізу визначали, вимірюючи оптичну щільність на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 253 нм. Одиниця естеразної активності – приріст оптичної густини реакційної суміші на 0,001 за 1 хв. Питому активність виражали в од/мг протеїну.

Максимальну швидкість ( $V_{max}$ ) та константу Міхаеліса ( $K_m$ ) визначали за методом Лайнуївера-Берка із кривої залежності швидкості ензимної реакції від концентрації субстрату, побудованою за методом подвійних обернених величин в координатах ( $1/V - 1/[S]$ ).

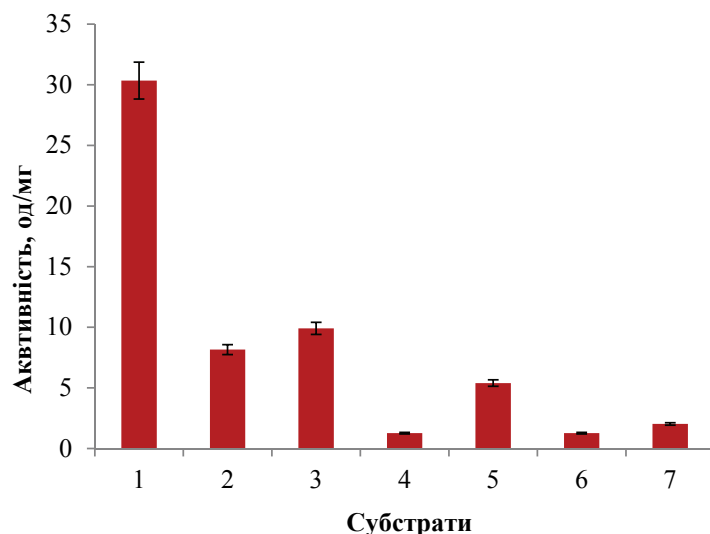
Усі досліди проводили в 3–5 повторностях і враховували середні значення величин і стандартної похибки ( $M \pm m$ ). Значення при  $P < 0,05$  розглядали як вірогідні. Графічно представлені результати отримували за допомогою програми Microsoft Excel 2010.

### Результати та їх обговорення

Важливою характеристикою препаратів пептидаз є їх субстратна специфічність. Раніше було показано, що еластаза *Bacillus thuringiensis* є сериновою лужною пептидазою [3]. Дослідження швидкості гідролізу ряду нативних субстратів показало, що цей ензим має широку субстратну специфічність, що є характерним для субтилізинів, які синтезуються бактеріями роду *Bacillus* [8]. Еластаза *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 ефективно гідролізує ряд білкових субстратів як фібрилярної, так і глобулярної природи: еластин, фібрин, фібриноген, казеїн, гемоглобін, колаген і желатин (рис. 1). Також встановлено, що фібриноген, оброблений протягом 15 хв виділеною пептидазою, вже не здатний перетворюватися на фібрин під дією тромбіна.

Широкий спектр природних субстратів, які гідролізує еластаза *B. thuringiensis* може бути зумовлений будовою її каталітичного центру і широким спектром амінокислот, які відповідають її первинній специфічності.





**Рис. 1.** Активність еластази *B. thuringiensis* IMV B-7324 щодо нативних білків

1 – еластин, 2 – фібрин, 3 – фібриноген, 4 – колаген, 5 – желатин,  
6 – гемоглобін, 7 – казеїн

**Fig. 1.** Activity of *B. thuringiensis* IMV B-7324 elastase toward the native proteins

1 – elastin, 2 – fibrin, 3 – fibrinogen, 4 – collagen, 5 – gelatin,  
6 – hemoglobin, 7 – casein

Для з'ясування первинної специфічності еластази використовували синтетичні субстрати, які є характерними для первинної специфічності тваринних і бактеріальних серинових пептидаз. Було показано (табл. 1), що еластаза *B. thuringiensis* має субстратну специфічність, подібну до пептидаз субтилізинового типу (про що свідчить гідроліз субстратів Z-Ala-Ala-Leu-pNa і Z-Gly-Gly-Phe-pNa), а також володіє естеразною активністю (гідроліз субстрату БАЕЕ). Найбільш активно ензим гідролізував трипептиди із залишками гідрофобних амінокислот аланіну, лейцину і фенілаланіну в позиції S1. За спорідненістю до цих амінокислот можна побудувати такий ряд: Ala>Leu>Phe. Дані субстрати є специфічними також і для еластаз тваринного походження. Важливими для гідролізу були амінокислоти і вторинної специфічності (позиції S2 і S3). Так, заміна аланіну (субстрати Suc-Ala-Ala-Ala-pNa і Z-Ala-Ala-Phe -pNa) на залишок гліцину (субстрати Z-Gly-Ala-Ala-pNa і Z-Gly-Ala-Phe-pNa) в позиції S3 приводила до зниження активності на більше як 30–80%. Заміна аланіну на гліцин в двох позиціях S2 і S3 (субстрати Z-Ala-Ala-Phe-pNa і Z-Gly-Gly-Phe-pNa) приводила до зниження активності на 75%. Дані щодо переважного гідролізу пептидазою за залишками гідрофобних амінокислот було підтверджено також результатами тонкошарової хроматографії гідролізатів нативних білкових субстратів [4], що показала наявність в них залишків аланіну, лейцину і валіну. Також цим методом було виявлено наявність в гідролізатах залишків глутаміної амінокислоти, але за відсутністю відповідних хромогенних субстратів дані порівняти неможливо.

## Швидкість гідролізу синтетичних субстратів

## The hydrolysis rate of the synthetic substrates

Субстрат	Швидкість гідролізу субстрату, ммоль×мл <sup>-1</sup> ×хв <sup>-1</sup>
Етиловий ефір N-бензоїл- D,L-аргініну (БАЕЕ)	0,8±0,04
Метилловий ефір N-бензоїл-D,L-тироzinу (BTME)	0
Glp-Phe-pNa	0
Z-Ala-Ala-Leu-pNa	5,6±0,28
Z-Ala-Ala-Ileu-pNa	0
Z-Ala-Ala-Phe -pNa	9,4±0,47
Z-Ala-Ala-Ala-pNa	18,5±0,93
Suc-Ala-Ala-Ala-pNa	20,1±1,01
Z-Gly-Ala-Ala-pNa	12,6±0,63
Z-Ala-Ala-Val-pNa	0
Z-Gly-Gly-Phe-pNa	2,3±0,12
Z-Gly-Ala-Phe-pNa	1,8±0,09
Z-Gly-Ala-Leu-pNa	6,4±0,32
Z-Ala-Ala-Pro-pNa	0

Важливою характеристикою каталітичної активності ензиму є кінетичні параметри швидкості гідролізу субстрату. Однією з проблем при вивченні протеолітичних ензимів є встановлення кінетичних закономірностей взаємодії їх з природними білковими субстратами, оскільки, як правило, швидкість таких реакцій не підпорядковується рівнянню Міхаеліса-Ментен. Основна причина відхилення полягає в складності будови білкового субстрату, який являє собою набір пептидних зв'язків, що не лишається постійним в процесі реакції. Показано [1], що найпростіша схема для описання таких процесів включає два етапи: 1) сорбція пептидази на поверхні субстрату, яка містить групи – «мішені» сорбції; 2) безпосередньо каталітичну реакцію між ензимом і реакційно-здатними групами нерозчинного субстрату або розчинних пептидів, які вже утворилися. Було вивчено залежність швидкості гідролізу еластину від часу (рис. 2) і показано, що вона не має класичного гіперболічного вигляду, що може бути зумовлено не тільки утворенням і розпадом ензим-субстратного комплексу і утворенням продуктів реакції, а ще й тим, що спочатку відбувається адсорбція ензиму на нерозчинному субстраті для подальшого ефективного його гідролізу.



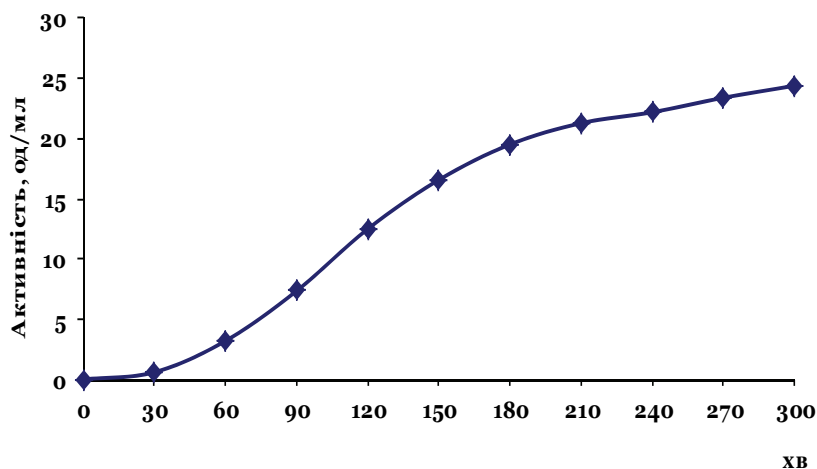


Рис. 2. Динаміка гідролізу нативного еластину еластазою *B. thuringiensis* IMV B-7324

Fig. 2. Dynamic of the native elastin hydrolysis by *B. thuringiensis* IMV B-7324 elastase

Тому для вивчення кінетичних параметрів було використано специфічний субстрат еластаз N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa. Дослідження показали, що криві залежності активності від часу і концентрації субстрату мають звичайний гіперболічний вигляд і підпорядковуються кінетиці Міхаеліса-Ментен для односубстратних реакцій першого порядку, де має місце поступове збільшення активності, але через деякий час швидкість реакції стає постійною і криві виходять на плато (рис. 3).

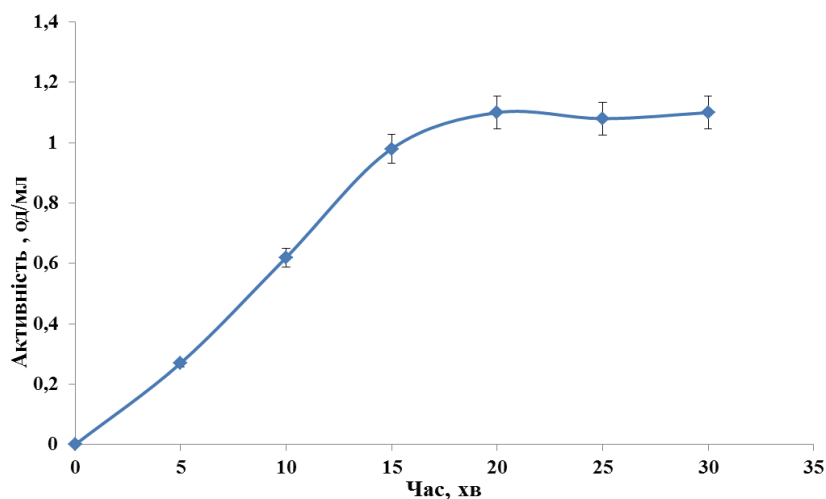


Рис. 3. Динаміка гідролізу синтетичного субстрату N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa еластазою *B. thuringiensis* IMV B-7324

Fig. 3. Dynamic of the synthetic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa hydrolysis by *B. thuringiensis* IMV B-7324 elastase

На цьому субстраті були визначені кінетичні параметри реакції:  $K_m$  (0,83 мМ) і  $V_{max}$  (20,1 ммоль·мл<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) (рис. 4).

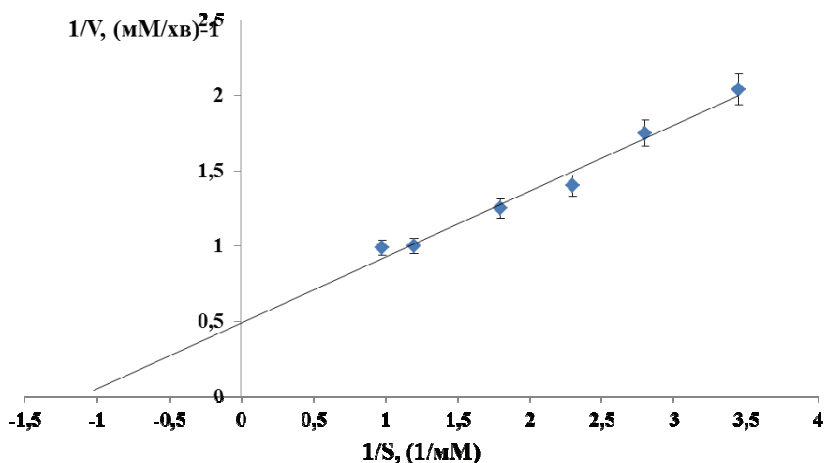


Рис. 4. Залежність швидкості гідролізу синтетичного субстрату N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa еластазою *B. thuringiensis* IMV B-7324 від концентрації субстрату в обернених координатах Лайнуївера-Берка

Fig. 4. The concentration dependence of the synthetic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa hydrolysis rate by *B. thuringiensis* IMV B-7324 elastase in Lineweaver-Burke reciprocal coordinates

Оскільки застосування синтетичних субстратів для визначення активності є універсальним і легко відтворюваним методом, то кінетичні параметри гідролізу цих субстратів можна порівнювати з такими ж, отриманими для інших ензимів подібної специфічності. Використовуючи дані бази даних BRENDA, було показано, що константа Міхаеліса, яка визначає ступінь спорідненості ензиму до субстрата, виділеної еластази *B. thuringiensis* знаходиться на рівні значень панкреатичної еластази і є в 5 разів нижчою за  $K_m$  для цього субстрату протеїнази К, яка також проявляє еластазоподібну активність (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняння констант Міхаеліса еластолітичних пептидаз різного походження

Table 2

Comparison of the elastolytic peptidases Michaelis constants of different origin

Пептидаза	$K_m$ , мМ
Еластаза <i>Bacillus thuringiensis</i> IMV B-7324	0,83
Протеїназа К <i>Engyodontium album</i> (EC 3.4.21.64) [14]	4,23*
Аквалізін 1 <i>Thermus aquaticus</i> (EC 3.4.21.111) [15]	1,3*
Панкреатична еластаза (EC 3.4.21.36) [6]	0,68*
Лейкоцитарна еластаза (EC 3.4.21.37) [12]	3,7*

Примітка: \* – дані бази даних <http://www.brenda-enzymes.org/>

Note: \* – data of data base <http://www.brenda-enzymes.org/>





Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено, що еластолітична пептидаза *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 гідролізує широкий спектр нативних білків фібрилярної і глобулярної природи, що зумовлено її специфічністю щодо залишків гідрофобних амінокислот – аланіну, лейцину, фенілаланіну. Показано, що еластаза має субстратну специфічність, подібну до пептидаз субтилізинового типу, що визначається здатністю гідролізувати специфічні хромогенні субстрати Z-Ala-Ala-Leu-pNa і Z-Gly-Gly-Phe-pNa, а також має естеразну активність. Кінетичні параметри реакції гідролізу специфічного субстрату еластаз N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa складають 0,83 мМ ( $K_m$ ) і 20,1 ммоль·мл<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup> ( $V_{max}$ ) і знаходяться на рівні значень панкреатичної еластази, що робить виділений ензим перспективним для практичного застосування.

**Е.В. Мацелюх**

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев  
ГСП, Д03680, Украина, тел.: +38(044) 526 23 39,  
e-mail: oivanko@yahoo.com

## СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ СЕРИНОВОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ПЕПТИДАЗЫ *BACILLUS THURINGIENSIS* ІМВ В-7324

### Реферат

**Цель.** Исследование субстратной специфичности сериновой щелочной пептидазы *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324. **Методы.** Для изучения субстратной специфичности использовали белки: казеин, эластин, фибрин, фибриноген, коллаген. Определение первичной субстратной специфичности проводили, используя синтетические хромогенные субстраты. Максимальную скорость ( $V_{max}$ ) и константу Михаэлиса ( $K_m$ ) определяли по методу Лайнуивера-Берка из кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, построенной с помощью метода двойных обратных величин в координатах ( $1/V-1/[S]$ ). **Результаты.** Показано, что энзим обладает субстратной специфичностью, подобной пептидазам субтилизинного типа, что определяется способностью гидролизировать специфические хромогенные субстраты Z-Ala-Ala-Leu-pNa и Z-Gly-Gly-Phe-pNa, а также проявляет эстеразную активность. Кинетические параметры реакции гидролиза специфического субстрата эластаз N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa составляют 0,83 мМ ( $K_m$ ) и 20,1 ммоль·мл<sup>-1</sup>·мин<sup>-1</sup> ( $V_{max}$ ). **Выводы.** Способность эластолитической пептидазы *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 гидролизировать широкий спектр нативных белков фибриллярной и глобулярной природы обусловлена ее специфичностью к остаткам гидрофобных аминокислот – аланина, лейцина, фенилаланина. По кинетическим параметрам энзим не уступает панкреатической эластазе и является перспективным для практического применения.

**Ключевые слова:** *Bacillus thuringiensis*, эластаза, субстратная специфичность, синтетические субстраты.





## O.V. Matseliukh

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,  
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, GSP, D03680, Ukraine,  
tel.: +38(044) 526 23 39, e-mail: oivanko@yahoo.com

## SUBSTRATE SPECIFICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IMB B-7324 SERINE ALKALINE PEPTIDASE

### Summary

**Aim.** Investigation of substrate specificity of serine alkaline protease from *Bacillus thuringiensis* IMV B- 324. **Methods.** To study the substrate specificity of the proteins there were used: casein, elastin, fibrin, fibrinogen and collagen. Determination of the primary substrate specificity was carried out using synthetic chromogenic substrates. The maximal velocity ( $V_{max}$ ) and Michaelis constant ( $K_m$ ) were determined according to the method of Lineweaver-Burk using the curve of dependence of the reaction rate from substrate concentration in double reciprocal coordinates ( $1/V-1/[S]$ ). **Results.** It was demonstrated that enzyme has substrate specificity similar to subtilisin-type proteases that was determined from the ability to hydrolyze specific chromogenic substrate Z-Ala-Ala-Leu-pNa i Z-Gly-Gly-Phe-pNa, and it also exhibited the esterase activity. Kinetic parameters of hydrolysis of the specific elastase substrate N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa are 0.83 mM ( $K_m$ ) and 20.1 mmol·mL<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> ( $V_{max}$ ). **Conclusions.** The ability of elastolytic peptidase *B. thuringiensis* IMV B- 7324 to hydrolyse a wide range of native fibrillar and globular proteins is caused by its specificity to the hydrophobic amino acid residues – alanine, leucine, phenylalanine. Kinetic parameters of the enzyme are the same to pancreatic elastase. Thus enzyme is perspective for practical applications.

*Key words:* *Bacillus thuringiensis*, elastase, substrate specificity, synthetic substrates.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Еремеев Н.Л., Карякин А.А., Казанская Н.Ф. Кинетика растворения твердых белковых субстратов протеиназами. Выбор механизма реакции // Биохимия. – 1989. – т. 54, вып. 3. – С. 503–510.
2. Мацелюх О.В., Нідялкова Н.А., Варбанец Л.Д. Еластолітичні ензими мікроорганізмів // Біотехнологія. – 2010. – 3, № 4. – С. 20–28.
3. Мацелюх О.В., Нідялкова Н.А., Варбанец Л.Д. Очистка і фізико-хімічні властивості пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 з еластазною і фібринолітичною активністю // Укр. біох. журн. – 2012. – 84, № 6. – С. 25–36.
4. Нідялкова Н.А. Пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 зі специфічністю до еластину і фібрину: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ. 2013. – 22 с.
5. Петрова И.С., Винцюнайте М.Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохимия и микробиол. – 1966. – 2, № 1. – С. 322–327.



6. *Erlendsson L.S., Filippsusson H.* Purification and characterization of bovine pancreatic elastase // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1998. – В 120. – P. 549–557.
7. *Ferreira G.A., Magliano A.C., Pral E.M., Alfieri S.C.* Elastase secretion in *Acanthamoeba polyphaga* // *Acta Trop.* – 2009. – 112, N 2. – P. 156–163.
8. *Hedstrom L.* Serine protease. Mechanism and specificity // *Chem. Rev.* – 2002. – 102. – P. 4501–4523.
9. *Kristjansson M.M.* Activity measurements of proteinases using synthetic substrates // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* – 2001. – C2.1.1–C2.1.7.
10. *Mandl I., Zipper H., Ferguson L.T.* Clostridium histolyticum collagenase: its purification and properties // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1958. – 74. – P. 465–475.
11. *Masada M.* Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // *Food style.* – 2004. – 8, № 1. – P. 92–95.
12. *Nakajima K., Powers J.C., Ashe B.M., Zimmerman M.* Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha 1-protease inhibitor reactive site // *J. Biol. Chem.* – 1979. – 254. – P. 4027–4032.
13. *Oleksy A., Golonka E., Bańbula A., Szmyd G., Moon J., Kubica M., Greenbaum D., Bogyo M., Foster T.J., Travis J., Potempa J.* Growth phase-dependent production of a cell wall-associated elastinolytic cysteine proteinase by *Staphylococcus epidermidis* // *Biol. Chem.* – 2004. – 385, N 6. – P. 525–535.
14. *Slovakova M., Peyrin J.M., Bilkova Z., Juklickova M., Hernychova L., Viovy J.L.* Magnetic proteinase K reactor as a new tool for reproducible limited protein digestion // *Bioconjugate Chem.* – 2008. – 19. – P. 966–972.
15. *Tanaka T., Matsuzawa H., Ohta T.* Substrate specificity of aqualysin I altered by an organic solvent // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1999. – 63. – P. 446–448.
16. *Trombridg G.O., Moon H.D.* Purification of human elastase // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1972. – 141, № 3. – P. 928–931.
17. *Zhao H.L., Chen X.L., Xie B.B., Zhou M.Y., Gao X., Zhang X.Y., Zhou B.C., Weiss A.S., Zhang Y.Z.* Elastolytic mechanism of a novel **M23 metalloprotease pseudoaltein** from deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. CF6-2: Cleaving not only glycol bonds in the hydrophobic regions but also peptide bonds in the hydrophilic regions involved in cross-linking // *J. Biol. Chem.* – 2012. – 287. – P. 39710–39720.

Стаття надійшла до редакції 23.05.2014 р.

