

УДК 577.152.34:577.151.5

Н.А. Нідялкова, О.В. Мацелюх, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ФІБРИНОЛІТИЧНІ ПЕПТИДАЗИ *BACILLUS*

Фібринолітичні ензими – це пептидази, які відносяться до класу гідролітичних ферментів, здатних розщеплювати нерозчинний фібрин. В огляді представлені фібринолітичні пептидази бактерій роду *Bacillus*. Наведено методи підвищення біосинтезу цих ензимів, визначення їх активності, а також виділення та очищення. Фібринолітичні пептидази бацил відносять до серинових і металопептидаз. Вони здатні гідролізувати як природні субстрати (фібрин, фібриноген, гемоглобін), так і синтетичні. Висока стабільність цих ензимів в широкому діапазоні значень рН (5-12) і температури (10-75 °С) дає можливість для застосування їх в фармакології, медицині для запобігання розвитку і лікування серцево-судинних захворювань.

Ключові слова: фібринолітична пептидаза, *Bacillus*, субстратна специфічність, лікування серцево-судинних захворювань.

Селективний внутрішньоклітинний протеоліз є важливим механізмом контролю якості функціональних білків, а також підтримки їх концентрації на такому рівні, який необхідний клітині. Як у прокариот, так і у еукариот цей процес здійснюють високомолекулярні пептидази (КФ 3.4), відомі також під назвою протеїнази або протеолітичні ензими – клас гідролітичних ферментів, які незворотно відщеплюють амінокислотні залишки від білків і пептидів за участю молекули води (рис. 1).

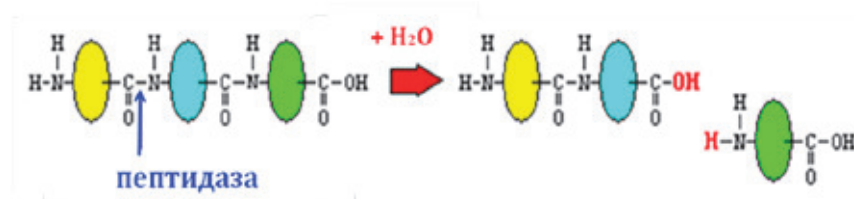


Рис. 1. Гідроліз пептидних зв'язків пептидазою [56].

Вони виконують в клітині дві основні функції: деструктивну (позбавляють клітину від дефектних, пошкоджених і мутантних білків) і регуляторну (здійснюють деградацію коротко існуючих регуляторних білків) [74].

Більшість пептидаз синтезується у вигляді неактивних попередників – проензимів, молекули яких складаються з препептиду (секреторний пептид) і пропептиду (активаційний пептид). При вивченні попередників субтилізинових пептидаз, виділених з *Bacillus subtilis*, встановлено, що процесинг їх приводить до появи протеолітичної активності зрілого активного білка, що супроводжується розривом зв'язку Туг-Ala в проензимі і відщепленням пропептиду [11]. Препептиди забезпечують транспорт білка через плазматичну мембрану, а роль пропептиду до кінця не встановлена. Припускають, що пропептиди не тільки здатні підтримувати ензим в неактивному стані, але й можуть брати участь у формуванні функціональної третинної структури білка.

Реакції за участю пептидаз є специфічними. Їх специфічність обумовлена як типом субстрату (ди-, оліго-, поліпептид), так і його конформацією. Прикладом такого специфічного процесу є фібриноліз, який включає декілька взаємопов'язаних реакцій, що відбуваються за участю протеолітичних ензимів. На кожному етапі цього процесу попередник (неактивна форма ензиму) перетворюється у відповідну серинову протеазу [6]. За нормальних фізіологічних умов в організмі людини існує рівновага між двома протилежними процесами – фібринолізом і згортанням крові [12]. Порушення цієї рівноваги може привести до різних патологічних

© Н.А. Нідялкова, О.В. Мацелюх, Л.Д. Варбанець, 2013

станів. Зміщення в бік згортання може бути причиною виникнення таких захворювань, як інфаркт міокарда, тромбоз судин головного мозку, легеневих артерій та ін. Навпаки, надмірна активація фібринолітичної системи супроводжується підвищеною кровоточивістю. Згідно з даними ВООЗ, кожного року від серцево-судинних захворювань вмирає 17 мільйонів людей [33]. Для лікування захворювань, що супроводжуються виникненням тромбозів, використовуються різні тромболітичні агенти [52]. До 2010 р. витрати на їх виробництво склали приблизно 14 мільярдів доларів [65].

Кров'яні згустки, основу яких складає фібрин, утворюються з фібриногену за допомогою протеолітичного ензиму тромбіну (ЕС 3.4.21.5) (рис. 2). В свою чергу, інша пептидаза, плазмінін (ЕС 3.4.21.7) руйнує утворений фібрин, таким чином, сприяючи відновленню кровообігу (рис. 3) [71].

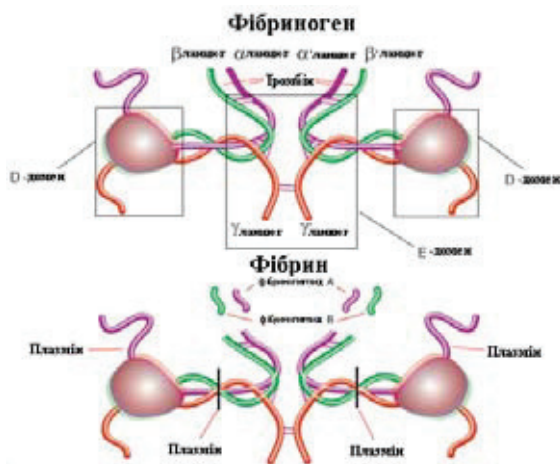


Рис. 2. Структура фібриногену і фібрину [10]

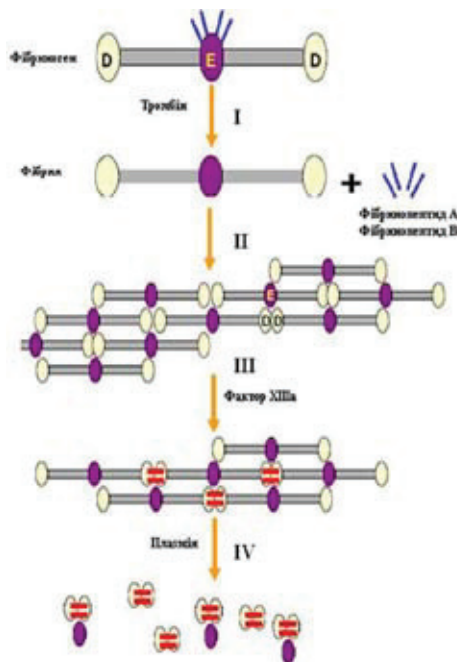


Рис. 3. Процес утворення нерозчинного фібринового згустку з фібриногену (I, II, III) і розщеплення його до димерів (IV): (I) – утворення мономеру фібрину; (II) – утворення розчинних комплексів мономерів фібрину; (III) – утворення ковалентних зв'язків між D-, а також між E-поліпептидними ланцюгами молекул фібрин-агрегату і стабілізація фібрину в нерозчинний полімер; (IV) – розщеплення фібрину з утворенням димерів [10].

Мікробні продуценти фібринолітичних пептидаз. За направленістю дії фібринолітичні агенти поділяють на дві групи. До першої відносяться активатори плазміногену, такі як тканинний активатор плазміногену (t-PA) та урокіназа. Вони перетворюють плазміноген в активний плазмін, здатний розщеплювати фібрин. Другу групу складають плазміноподібні фібринолітичні ензими, які безпосередньо руйнують фібрин в кров'яних згустках, швидко і повністю розчиняючи тромби [36].

Фібринолітичні ензими було виділено та ідентифіковано з різних джерел: тварин (змії, дощовий черв'як) [13, 19], бактерій (*Streptococcus pyogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus*, *Serratia*, *Bacillus natto*, *B. amyloliquefaciens*, *Actinomyces*) [21, 29, 32, 30] і грибів (*Fusarium oxysporum*, *Mucor* sp., *Armillaria mellea*) [27, 63]. Так, протеолітичний ензим, виділений із непатогенної кишкової бактерії *Serratia* E15, що мешкає в кишковому тракті туювого шовкопряда, проявляє фібринолітичну, протизапальну дію та запобігає розвитку набряків у шурів [48].

З культуральної рідини *Streptomyces violaceoruber* і *Streptomyces spiroverticillatus* були виділені фібринолітичні пептидази. Визначено, що найвищий синтез фібринази *S. violaceoruber*, який складав 160 од/мл, досягається після 6 днів інкубування на середовищі з додаванням лактози. Для фібринази *S. spiroverticillatus* найвищий рівень синтезу також відмічається після 6 днів інкубування, але на середовищі з додаванням крохмалю її активність складає 130 од/мл [30]. Фібринолітичний ензим також здатен синтезувати грибний продуцент *Fusarium* sp. BLB, виділений з листя рослини *Hibiscus* [63].

Фібринолітичні ензими також було виявлено у бактерій, які існують в екстремальних умовах. Так, фібринолітичну активність 51,80 од/мл виявлено у *Arthrobacter aurescens* DR-536, виділеного зі змерзлого ґрунту на висоті 4300 м над рівнем моря в Тибетській Автономній провінції Цинхай. Фібринолітичний ензим із цього мікроорганізму здатний був не тільки розщеплювати тромби *in vitro*, але й гідролізувати кров'яний агар [67].

Але найбільш розповсюдженими продуцентами фібринолітичних пептидаз є бацили, які виділяють з ґрунту, прісної й морської води, а також з рослин. Для циклу розвитку бацил характерний синтез великої кількості ензимів на початку стаціонарної фази росту, в тому числі й пептидаз. Встановлено, що спороутворення в них починається наприкінці логарифмічної та на початку стаціонарної фази росту. Цей період називається перехідним, під час якого клітина готується до споруляції. Протягом наступних стадій клітина продовжує синтезувати пептидази та інші ензими, необхідні для життєдіяльності та формування спорової оболонки [2]. Наприклад, біосинтез лужної пептидази *B. cereus* і *B. polymyxa* розпочинається одночасно з початком логарифмічної фази росту, а максимальна активність спостерігається у фазі відмирання і на початку споруляції [45].

Знайдено, що у представників роду *Bacillus* позаклітинні пептидази синтезуються в цитоплазмі як препроензими і перетворюються в зрілий ензим вже ззовні клітини завдяки автопроцесінгу, обумовленому обмеженим протеолізом. Крім того, вивчення активації різних ензимів та їх преензимних форм показує, що пептидази мають чітку роль в посттранслокаційній активації різних секреторних ферментів [58].

Фібринолітичні ензими також було виявлено у бацил, виділених з ферментованої їжі, такої, як японське Natto, Tofuyo, корейський соєвий соус Chungkook-Jang (Korean Chungkook-Jang soy sauce), їстівний медовий гриб (edible honey mushroom), ферментована креветкова паста (fermented shrimp paste) [28]. З традиційної китайської їжі Douchi також був виділений штам DC-4, який проявляв фібринолітичну активність. Порівняльний 16S-23S рРНК сиквенс-аналіз показав найбільшу подібність його до штаму *B. cereus* ATCC14579. Оптимальною температурою і рН для дії фібринолітичної пептидази є 45 °C і 7,5, відповідно. Ензим здатний безпосередньо розщеплювати фібрин, але не активує перетворення плазміногену в плазмін і не гідролізує клітини крові [51].

З *B. amyloliquefaciens* LSSE-62, знайденого в соєвій пасті, була виділена фібринолітична пептидаза [70]. Аналіз амінокислотної і нуклеотидної послідовності показав, що цей ензим ідентичний субтилізіну DJ-4. Інший фермент BSN1, названий наттокіназою, було виділено з культуральної надосадової рідини *B. subtilis* TKU007, який вирощували на лушпинні креветок як єдиному джерелі вуглецю та азоту [69].

Виявлено, що деякі екзотоксини також можуть проявляти фібринолітичну активність. Наприклад, штами *B. cereus* NCIM-2156 і *B. licheniformis* NCIM-5343 [61], які можуть викликати харчові отруєння, здатні синтезувати екзотоксини, які проявляють фосфоліполітичну, казеїнолітичну, а також фібринолітичну активність. Також, відомо [18], що бактерії здатні синтезувати рецептори для плазміногену, який перетворюється в плазмін шляхом протеолізу самими рецепторами або активаторами організму-хазяїна. Деякі з цих пептидазозалежних шляхів можуть бути використані бактеріями для забезпечення власного росту та розповсюдження в межах організму хазяїна.

Таким чином, фібринолітичні пептидази виявлено та ідентифіковано з різних мікроорганізмів, які можуть бути важливими для життєдіяльності.

Підвищення біосинтезу фібринолітичних пептидаз бацил. Для підвищення біосинтезу фібринолітичних пептидаз використовують різні методи, включаючи як оптимізацію умов культивування, так і генетичні методи. Зважаючи на значну практичну роль пептидаз, з'явилася потреба в отриманні високоефективних штамів-продуцентів, здатних синтезувати пептидази різної специфічності. Різна локалізація в клітині та особливості секреції ензимів визначають вибір методів підвищення їх біосинтезу. Рівень продукції зовнішньоклітинних пептидаз залежить від різних факторів, зокрема, від складу поживного середовища. Тому важливою умовою для максимальної продукції фібринолітичних ензимів є правильно підібраний компонентний склад середовища культивування. Оскільки для різних мікроорганізмів притаманні неоднакові фізіологічні властивості, оптимізацію харчових потреб і умов культивування для росту клітин і біосинтезу фібринолітичних ензимів необхідно проводити безпосередньо для кожного мікроорганізму окремо.

Дослідження показали, що на продукцію пептидаз бацилами впливають хімічні (джерела вуглецю, азоту та мінерального живлення) та фізичні (рН, температура, аерація, об'єм середовища тощо) фактори культивування. Хімічні параметри включають джерела азоту, вуглецю та йонний склад середовища. Для створення найбільш оптимального середовища для підвищеного синтезу фібринолітичних ензимів зазвичай використовують найбільш легко доступні джерела азоту, вуглецю, а також мінеральних сполук. Так, для збільшення синтезу фібринолітичної сериної пептидази з *B. amyloliquefaciens* An6 успішно застосовують такий складний органічний субстрат як порошок кореню *Mirabilis jalapa*, який використовують як джерело азоту, вуглецю і мінеральних солей [16]. Деякі дослідники, в свою чергу, застосовують такі білкові відходи від харчової промисловості, як залишки соєвого сиру (SCR) і зерен кукурудзи (WDG) [75]. Виявлено, що *B. cereus* NCIM-2156 при культивуванні на простих субстратах, таких як порошок зняте молоко і емульсія яєчного жовтка, здатен синтезувати ензими з протеолітичною і фосфоліполіпазною активністю, а на кров'яних згустках – з фібринолітичною активністю [61]. Інший штам *B. cereus* NK1, який був виділений з ґрунту, здатний був синтезувати фібринолітичну пептидазу. Для збільшення її біосинтезу культуру вирощували на оптимізованому середовищі, до складу якого входять такі компоненти: глюкоза – 0,5 %, соєве борошно – 0,5 %, CaCl_2 – 0,5 %, MgSO_4 – 0,2 % [26].

Крім поживних факторів, на синтез пептидаз впливає також концентрація інокулюму, аерація, температура, рН та час культивування. Так, при оптимізації умов вирощування *B. cereus* 146 максимальний біосинтез пептидази спостерігався після 48 год культивування при 37°C, зі швидкістю перемішування качалки 170 об/хв і 4 % (v/v) інокулюму. Найкращими джерелами вуглецю і азоту були глюкоза і м'ясний екстракт, відповідно. Крім того, найбільш ефективними джерелами органічного азоту виявились сечовина і лізин. При додаванні іонів Mn^{2+} в середовище культивування збільшувався рівень протеолітичної активності *B. cereus* 146 протягом 24 год вирощування. Додавання іонів Ca^{2+} , Cu^{2+} і Mg^{2+} підвищувало рівень синтезу пептидази тільки після 48 год інкубування [60].

Хоча традиційна оптимізація є простою і легкою, проте іноді не вдається знайти оптимальний склад середовища, тому що не завжди береться до уваги вплив всіх значущих факторів. Автори [27], використовуючи статистичні методи факторного експерименту, виявили, що для збільшеного синтезу наттокінази, виділеної з *B. subtilis*, найбільш значущим фактором виявився пептон. Оптимізоване поживне середовище містило (%): глюкозу – 1, пептон – 5,5, MgSO_4 – 0,2 і CaCl_2 – 0,5, що дозволило в 2 рази збільшити синтез фібринолітичного ензиму.

В останні роки більшість дослідників при оптимізації з постановкою факторного досліджу користуються планами Плакетта – Бермана (матриця Адамара), якщо необхідно відіяти велику кількість факторів, які можуть бути потенційно не важливими [43]. Один із способів планування такого досліджу полягає в змішуванні всіх взаємодіючих факторів з головними факторами. Так, наприклад, Рум А. та інш. [57], використовуючи ключові компоненти і умови культивування за планами Плакетта – Бермана для підвищення синтезу фібринолітичного ензиму з морської бактерії *B. subtilis* A26, запропонували поживне середовище, до складу якого входили (г/л): очищені зерна пшениці – 40, казеїновий пептон – 3,53, CaCl₂ – 4,0, NaCl – 3,99, MgSO₄ – 0,01, KH₂PO₄ – 0,01, а також наступні умови культивування: рН 7,8, температура 37 °С, швидкість обертання качалок 200 об/хв. Тісний взаємозв'язок між теоретично передбаченими та експериментально отриманими значеннями показують обґрунтованість і прийнятність статистичної моделі для оптимізації умов культивування, що дозволяє максимально збільшити біосинтез фібринолітичного ензиму.

В останні роки широкого застосування набули методи генної інженерії. Для збільшення продукції ферментів використовують направлений мутагенез і технологію рекомбінантних ДНК. В комбінації зі скринінговими методами відбору мутантних штамів також використовується спонтанний мутагенез. Було показано [3] збільшення в два рази активності фібринолітичного ферменту шляхом спонтанного мутагенезу *in vitro*, додаючи етилметансульфонат (EMS).

В молекулярній біології широко використовують представників *B. subtilis*, в яких експресуються чужерідні білки з фармакологічними властивостями. Прийнятними властивостями для нього є непатогенність і здатність секретувати функціональні білки в культуральне середовище. Розробка методів клонування генів в клітинах *Bacillus* дозволила перевести на новий рівень молекулярно-генетичні дослідження цих бактерій. Таким чином, став можливий інший підхід до оптимізації експресії сторонніх генів в клітинах бактерій роду *Bacillus*. Досліджуваний структурний ген з'єднують з синтетичним фрагментом ДНК, що кодує ділянку зв'язування рибосом, специфічним для бацил. Таку конструкцію можна ставити під контроль різних промоторів. В складі геному бацил є різні гени, які діють на певних стадіях клітинного розвитку. Це дозволяє досліднику використовувати промотори, які будуть включати експресію стороннього гена в потрібній фазі клітинного циклу. Збираючи блоки з 2-3 різних промоторів із різною системою репресії-індукції, можна регулювати експресію необхідного гену і, таким чином, забезпечувати надсинтез закодованого білка. Так [3], субтилізин DFE активно експресується в дефектному за синтезом протеаз штамі *B. subtilis* WB600. Вставка промотору гена субтилізіна DFE замість гена α -амілази в *B. amyloliquefaciens* DC-4 дала змогу підвищити фібринолітичну активність з 80 до 200 од/мл. З геномної ДНК іншого штаму *B. amyloliquefaciens* CH86-1 дослідники [44] виділили і клонували ген, який кодує секрецію фібринолітичного ензиму. Сиквенс ДНК показав, що цей ген *aprE86-1* відповідає за синтез безпосередньо зрілого білка, який містить 275 амінокислотних залишки. Внесення гену *aprE86-1* в *B. subtilis* призвело до синтезу ним фібринолітичної пептидази, молекулярна маса якої складала 27 кДа. Фібринолітична активність пептидази трансформованої клітини *B. subtilis* була вищою, ніж в *B. amyloliquefaciens* CH86-1.

Сиквенс-аналізом гену, який кодує фібринолітичний фермент штаму *B. amyloliquefaciens* CH51, встановлено наявність 1149-bp відкритої рамки зчитування, що кодує 382 амінокислотні залишки [39]. Використовуючи *Escherichia coli*-*B. subtilis* вектор pSUGV4, фібринолітичний фермент було активно експресовано в штамі *B. subtilis* WB600, який не був здатний синтезувати пептидазу. В результаті було отримано фібринолітичний фермент, біохімічні властивості якого збігалися з біохімічними властивостями в оригінальному субтилізіні DFE, виділеного з донорного штаму. Молекулярна маса експресованого ферменту складала близько 28 кДа і його можна віднести до групи серинових пептидаз.

Виділення гену *bsf1*, який кодує субтилізин BSF1 штаму *B. subtilis* A26, та його сиквенс виявило, що до складу цього гену входить 1146-bp відкрита рамка зчитування, що кодує пре-пропептид з 381 амінокислотного залишку. Цей білок складається із сигнального пептиду (29 амінокислотних залишків), про-пептиду (77 амінокислотних залишків) і зрілого домену (275 амінокислотних залишків). Результати сиквенсу показали, що склад амінокислот зрілого

ензиму (BSF1) відрізняється від складу амінокислот наттокінази *B. subtilis natto* і субтилізину DFE *B. amyloliquefaciens* DC-4 на 5 і 39 амінокислотних залишків, відповідно [15].

Під час експресії у *E. coli* генів наттокінази (NK) і субтилізину DFE рекомбінантні білки формують нерозчинні агрегати без ензиматичної активності [53]. Однак, є дані про успішну експресію NK і субтилізину DFE у *E. coli*. [23]. Ці роботи основані на припущенні, що позаклітинні протеази (субтилізини) з бактерій роду *Bacillus* синтезуються як пре-проензими, які можуть функціонувати як внутрішньомолекулярні шаперони, що сприяють коректному формуванню домена протеаз [37]. Було показано, що субтилізин DFE має високу експресію в *E. coli* BL21(DE3) як гібридний білок Тгх-просубтилізин DFE через експресію вектора pET32a, і що висока фібринолітична активність виявляється і в розчинній фракції, і в нерозчинній, після ренатурації останньої *in vitro* [53]. Більше того, розчинні білки легко очищувалися і переводилися шляхом гель-фільтрації на колонці в активну форму.

Таким чином, аналіз даних літератури свідчить про можливість підвищення фібринолітичної активності штамів *Bacillus* як оптимізацією умов культивування, так і методами генетичної інженерії.

Методи виділення і очищення фібринолітичних пептидаз бацил. Велика кількість складних і тонких методів дозволяє отримувати з культуральних рідин штамів-продуцентів очищені ферменти як в гомогенному, так і кристалічному стані. На першому етапі очищення екстрацелюлярні пептидази концентрують шляхом осадження з культуральної рідини, звільненої від клітин, додаванням сульфату амонію, етанолу, ацетону, ізопропанолу тощо. Проте, залежно від виду осаджувача вихід ензиму відрізняється. Для виділення фібринолітичних ензимів частіше застосовують осадження сульфатом амонію. Так, на прикладі ферментного препарату наттокінази *B. subtilis* Natto B-12 було показано, що фібринолітичний ензим найкращим чином осаджується при використанні 30-60 % насичення супернатанту культуральної рідини сульфатом амонію [65], що приводить до очищення в 2,3 рази, вихід ферменту становить 51,2 %.

Більш повне очищення можливе за допомогою таких методів розділення, як гель-фільтрація та іонообмінна хроматографія на різноманітних полімерних носіях (сефадекс, КМ-і DEAE-целюлоза, тощо). За допомогою іонообмінної хроматографії на КМ-целюлозі, ВЖХ на колонці Mono S, з наступною рехроматографією з рекомбінантного штаму *B. subtilis* AJ 73 були виділені 2 фракції субтилізиноподібної пептидази з виходом за активністю 9,48 % – для раннього ензиму і 16,67 % – для пізнього ензиму [9].

При очищенні наттокінази *B. subtilis* Natto B-12 Wang C. зі співав. [65] вдалося в 2,3 рази збільшити фібринолітичну активність після осадження сульфатом амонію, в 22,7 рази після гель-фільтрації на Sephadex G-75 і, нарешті, в 56,1 рази – при використанні Phenyl-Sepharose Fast Flow, таким чином, збільшивши вихід ензиму до 43,2 %.

Очищення фібринолітичного ензиму зі штаму *B. polymyxa* NRC-A автори [46] здійснили за допомогою осадження сульфатом амонію 80 % насичення, іонообмінною хроматографією на DEAE-Sepharose і гель-фільтрацією на Sephacryl S-200. Це дало змогу в 8,66 рази очистити ензим і досягти 6,68 % виходу.

За допомогою хроматографічних методів, включаючи гель-фільтрацію на колонках з DEAE Sephadex A-50 і Sephadex G-50, був очищений фібринолітичний ензим з *B. subtilis* A1. За результатами SDS-PAGE виділений білок представляв собою мономерну субодиницю з молекулярною масою 28 кДа. Фібринолітичну активність було збільшено в 16,32 рази порівняно з неочищеним ензимним препаратом [72].

Властивості фібринолітичних пептидаз *Bacillus* (наведені в таблиці). Показано, що молекулярна маса фібринолітичних пептидаз *Bacillus* коливається в межах від 18 до 46 кДа. Молекулярна маса очищеного ензиму BSN1 *B. subtilis* TKU007, визначена методами SDS-PAGE і гель-фільтрацією на Sephadex G-100, становила 28-30 кДа [69].

Фібринолітична активність залежить від умов навколишнього середовища. Найбільш оптимальним для дії фібринолітичних пептидаз є лужне середовище рН 8,0-10,0 і температура 30-60 °С. Наприклад, для наттокінази *B. subtilis* Natto B-12 оптимальне рН складає 8,0. Показано [65], що 80 % фібринолітичної активності залишається при витримуванні ензиму протягом 1 год при 50 °С, 70 % – протягом 40 хв при 60 °С і повністю втрачається протягом 60 хв при 60 °С.

Таблиця.

Властивості фібринолітичних пептидаз, виділених з різних видів бактерій

Назва ензиму	Продукт, джерело	Активність, од/мг	Mr, кДа	pH-стабільність (оптимум)	Термо-стабільність (оптимум)	Активатори	Інгібітори	Субстрат для визначення акті-ті	Класифікація ензиму
Наптокіназа B-12 [65]	<i>B. subtilis</i> Natto B-12, Natto	5316,36	29,0	6,0–9,0 (8,0)	30–50 (40)	Zn ²⁺	Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺	фібриновий згусток	-
Наптокіназа [73]	<i>B. subtilis</i> YJ1, Natto	1791,9	27,5	6,0–10,0 (8,5)	10–40 (50)	Co ²⁺ , Ba ²⁺	ФМСФ, ЕДТА, леупептин	фібрин	серинова
Металопептидаза [32]	<i>B. subtilis</i> K42, соєве борошно	19025,9	20,5	9,4	40	Co ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ³⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Hg ²⁺	ЕДТА, 2,2'-біпіридин, о-фенантролін	фібрин	металопептидаза
Фібринолітичний ензим [46]	<i>B. rolyuluxa</i> NRC-A, прутт	1504,2	18,0	8,5	30–60 (40)	-	ФМСФ	-	серинова
Наптокіназа BSN1 [69]	<i>B. subtilis</i> TKU007, Natto		28-30	4,0–11,0 (8,0)	25–50 (40)	-	ФМСФ	-	серинова
Фібринолітичний ензим [39]	<i>B. amyloliquefaciens</i> CH51, традиційна корейська їжа Cheonggukjang	342,4	27	5,0–10,0 (6,0)	37–50 (45)	-	Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , ФМСФ, ЕДТА	фібринова пластинка	серинова металактинована
Фібринолітичний ензим BSF1 [15]	<i>B. subtilis</i> A26		28	7,0–12,0 (9,0)	40–75 (60)	-	ФМСФ	фібринова пластинка	серинова
Фібринолітичний ензим [35]	<i>B. subtilis</i> BCRC 14716, при ферментуванні червоної квасолі		29,93	9,0	60	-	ФМСФ, НБС, ЕФС	N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, N-Benzoyl-Val-Gly-Arg-pNA	субтилізиноподібна серинова пептидаза
Фібринолітичний ензим [72]	<i>B. subtilis</i> A1, пруттові відкладення	0,62 і 1,33 од/мл	28	6,0–10,0	50	-	ФМСФ, DIFP, хімогестин, ТРСК	фібринова пластинка	хімолісонопо-дібна серинова
Фібринолітичний ензим [34]	<i>Vacillus</i> sp. nov. SK006, ферментована креветкова паста		43–46	5,0–11,0 (7,2)	20–40 (30)	Zn ²⁺	Cu ²⁺ , Ca ²⁺ , Fe ³⁺ , Hg ²⁺ , ФМСФ, <i>n</i> -ХМБ	фібрин	серинова
Фібринолітичний ензим [68]	<i>B. subtilis</i> LD-8547, Дучі	271943	30	8,0	50	Al ³⁺	ФМСФ, Mn ²⁺ , Ba ²⁺	фібринова пластинка, Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	серинова

За допомогою зимографії на фібриновому гелі з *B. subtilis* A26 було виділено і ідентифіковано три фібринолітичні ензими, які проявляли максимальну активність при рН 8,0 і температурі 60°C [14]. Оптимум рН очищеної фібринолітичної пептидази *B. polymyxa* NRC-A, ізольованої з ґрунту, складає 8,5 [46], а при рН 9,0 залишається близько 40 % активності. Ензим стабільний при рН 8,5 і температурі 40 °С, але втрачає 60 % активності вже при 60 °С.

Крім цього, відомі ще й фібринолітичні ензими з оптимальними значеннями рН, які знаходяться в нейтральному і слабкокислому діапазоні. Наприклад, фібринолітична пептидаза *B. amyloliquefaciens* CH51, виділена з традиційної корейської ферментованої соєвої їжі, має рН-оптимум активності при 6,0 [39]. *Bacillus* sp. nov. SK006, ізольований з ферментованої креветкової пасти, синтезує нейтральну пептидазу з оптимумом рН 7,2 [34]. Визначення залишкової активності фібринолітичних пептидаз бацил після витримки їх розчинів протягом деякого часу за певних рН і температури показало, що вони здатні зберігати стабільність в межах рН 5-12 і температурі 10-75 °С.

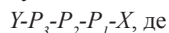
На ензим можуть впливати не тільки рН і температура, але і іони оточуючого середовища. Мікроелементи можуть входити до складу біорегуляторів живих систем, в основі яких лежать біокомплекси. Відомо, що іони металів в ензимах виконують ряд функцій: виступають в ролі електрофільної групи активного центру ферменту і полегшують взаємодію з негативно зарядженими ділянками молекул субстрату, формують каталітично активну конформацію структури ензиму, беруть участь в транспорті електронів. За даними літератури інгібуючий вплив Cu^{2+} відомий для фібринолітичних ензимів *Bacillus* sp. nov. SK006, *B. amyloliquefaciens* CH51 і *B. subtilis* Natto B-12 [34, 39, 65]. Ba^{2+} як активатор здатен впливати на наттокіназу *B. subtilis* YJ1 і металопептидазу *B. subtilis* K42 [32, 73]. Ca^{2+} найчастіше виступає в ролі стабілізатора, наприклад, як показано для фібринолітичних пептидаз *B. amyloliquefaciens* CH51 і *B. subtilis* K42 [32, 39].

Вивчення впливу інгібіторів на активність ензимів свідчить про їх важливу роль при дослідженні механізму дії та структури ензимів. Показано (табл.), що зазвичай фібринолітичні ензими інгібуються такими реагентами: фенілметилсульфонілфторидом (ФМСФ), етилендіамінтетраацетатом натрію (ЕДТА), *n*-пара-хлормеркурібензоатом (*n*-ХМБ), о-фенантроліном, *N*-бромосукцинімідом (НБС), *N*-етил-5-фенілізоксазоліум-3'-сульфонатом (ЕФС). Інгібуючий вплив ЕДТА на фібринолітичну активність пептидази може свідчити про наявність в молекулі ензиму іону металу, як це показано для наттокінази *B. subtilis* YJ1 і фібринолітичного ензиму *B. amyloliquefaciens* CH51 [39, 73]. Більшість фібринолітичних пептидаз бацил належить до групи пептидаз серинового типу, оскільки ФМСФ є інгібітором майже всіх серинових пептидаз з трипсиноподібною специфічністю і ковалентно зв'язується з гістидином або серином активного їх центру.

Субстратна специфічність фібринолітичних пептидаз і методи визначення фібринолітичної активності. Для фібринолітичних пептидаз представників роду *Bacillus* характерна специфічність як до природних, так і до синтетичних субстратів. Слід розрізняти специфічну дію цих ензимів, яка показана щодо таких природних субстратів як фібрин, фібриноген, гемоглобін, і неспецифічну дію щодо казеїну, еластину, муцину і желатини. Так, було виявлено, що фібринолітичний ензим, виділений з *B. licheniformis* KJ-31 [36], є специфічним до білків, які беруть участь у згортанні крові, фібрину і фібриногену, але не деградує казеїн, бичачий сироватковий альбумін.

Для вивчення субстратної специфічності гідролітичних ферментів більше як 70 років застосовуються хромогенні субстрати. Перевагами цих субстратів є їх доступність, висока чутливість методів з їх використанням, а також можливість застосування недорогого обладнання – спектрофотометрів і фотоколориметрів – для контролю процесу ферментативного гідролізу. Використання високо селективних пептидних хромогенних субстратів дозволяє ефективно вивчати окремі пептидази в суміші з іншими ферментами. Також субстратний аналіз є потужним знаряддям для вивчення тонкої будови активних центрів ензимів [4]. Синтетичний субстрат представляє собою короткий пептид (3-10 амінокислот), до якого через ефірний зв'язок приєднана хромогенна група (наприклад, *n*-пара-нітроанлід (*p*NA), 4-метилкумарил-7-амід (АМС)). Під дією пептидази хромогенна група відщеплюється, що приводить до розвитку забарвлення реакційної суміші. Кінцева концентрація вільної хромогенної групи пропорцій-

на активності пептидази і визначається за збільшенням поглинання при 405 нм [1]. Загальна формула синтетичних субстратів має наступний вигляд:



X – хромогенна група;

Y – захисні бензилоксикарбонільна, піроглютамільна або сукцинільна групи (CH_3SO_2 – метилсульфоніл, ННТ – циклогексилтирозин [гексагідротирозин], Pуг – L-піроглютамінова кислота [(S)-пірролідон -(5)-карбонова кислота], CHG – циклогексилглїцин, Succinyl – сукциніл, Benzoyl – бензоїл)

P_1 – амінокислота, яка відповідає зоні S1 в центрі зв'язування субстрату (первинна специфічність);

P_2, P_3 – задовольняють потребам вторинної специфічності пептидази.

Для визначення фібринолітичної активності в різних роботах [1, 22, 50, 51, 66] застосовують такі синтетичні субстрати: CH_3SO_2 -D-ННТ-Gly-Arg-pNA, Pуг-CHG-Arg-AMC (показує специфічність досліджуваного ензиму, що характерна для t-PA), Ala-Gly-Arg-pNA, Ala-Gly-Arg-AMC (специфічність u-PA), N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (субтилїзин- і хімотрипсин-подібна специфічність), Ala-ННТ-Lys-pNA, N-Benzoyl-Val-Gly-Arg-pNA, D-Val-Leu-Lys-pNA і H-D-Val-Leu-Lys-pNA (плазмїноподібна специфічність).

Показано, що фібринолітичний ензим *B. subtilis* IMR-NK1 здатен проявляти активність щодо таких природних субстратів як фібрин, фібриноген, казеїн, гемоглобїн та еластин і незначну активність до муцину і желатину. Щодо синтетичних субстратів, то цей ензим проявляє активність до N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA – 16,8 од/мл; N-benzoyl-Val-Gly-Arg-pNA – 7,1 од/мл; H-D-Val-Leu-Lys-pNA – 1,7 од/мл [22].

Застосовуючи хромогенний субстрат H-D-Val-Leu-Lys-pNA, було виявлено [62], що фібринолітичний фермент ензамїн *B. subtilis* АК здатний прискорювати дію плазмїну на тромб за рахунок збільшення вивільнення тканинного плазмїногенного активатора t-PA від ендотелїальних клітин, як *in vitro*, так і *in vivo*.

B. subtilis DC33, виділений з традиційної китайської їжі Ba-bao Douchi, синтезує фібринолітичний ензим субтилїзин FS33, здатний проявляти високу афїнність до синтетичного субстрату N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, а також активно розщеплює В β -ланцюг і А α -ланцюг фібриногену. Крім того, він діє на тромболїтичні фактори крові, а саме плазмїноген, урокіназу, тромбїн, калїкреїн. Таким чином, субтилїзин FS33 здатен деградувати фібринові згустки за двома шляхами, як утворенням активного плазмїну з плазмїногену, так і здійснення прямого фібринолізу [66].

Для визначення фібринолітичної активності пептидаз, виділених з мікроорганїзмів найбільш розповсюдженими на сьогодні є декілька методів.

Визначення ступеня гїдролїзу нативного фібрину [47]. Отримують фібриновий згусток шляхом інкубування розчину фібриногену з розчином тромбїну в пробїрках при 37 °С протягом 10 хв. Додають розчин досліджуваної пептидази і витримують реакційну сумїш 10-30 хв при 37 °С. Ступїнь гїдролїзу визначають спектрофотометрично при довжинї хвилї 275 нм. За одиницю активності беруть таку кількїсть ензиму, яка необхідна для збільшення оптичної щільності на 0,01 при 275 нм за 1 хв реакції.

Визначення активності фібринолітичної пептидази за діаметром зон лїзису або за часом лїзису фібринового тромбу [8, 62]. Цей метод можна використовувати як для якісної оцїнки – в пробїрках, так і для кількїсної – в чашках Петрі. При проведенні лїзису в пробїрках оцїнюють час гїдролїзу згустку. В чашках Петрі вимїрюють діаметр зон просвітлення після 18 год інкубування при 37 °С.

Метод фібрин-агарових чашок [38, 73] схожий з попереднім методом, але відрїзняється додаванням 1,4 % агару до фібринового згустку.

Фїбринова зимографїя [25, 76]. Це простий, чутливий, придатний для кількїсного визначення метод, який застосовується для аналізу протеолїтичної активності. Метод був введений в 1980 році [24, 33]. Це електрофоретична технологїя, яка включає субстратну сополїмеризацію субстрату з поліакриламїдним гелем, для виявлення ензиматичної активності. Найбільш часто використовують такі білкові субстрати, як желатина, казеїн, фібрин. В роботах [24, 41] було застосовано фібриноген і тромбїн, включенї в SDS-полїакриламїдний гель. Цей метод не потребує великих затрат. Крім того, може бути визначена молекулярна маса досліджуваної пептидази та її кількїсть. Також можливо визначити тип досліджуваної пептидази при використанні специфічних інгїбіторів пептидаз.

Визначення активності з використанням хромогенних субстратів. Частіше за всього використовують синтетичний трипептид H-D-Val-Leu-Lys-pNA. Одна одиниця активності дорівнює кількості ензиму, необхідного для вивільнення 1 нмоль *p*NA за 1 хв реакції.

Практичне застосування. Мікробні фібринолітичні ензими привертають все більшу увагу вчених як агенти тромболітичної терапії, завдяки термостабільності, відсутності небажаних ефектів після їх введення, а також меншими витратами на виробництво [28]. Відомо, що багато проблем в клінічній практиці сьогодні пов'язані з утворенням тромбів. Зазвичай серцево-судинні захворювання, такі як інфаркт міокарда, інсульт, фібриляція передсердя і зупинка серця асоціюються з тромбоутворенням. Для вирішення таких проблем на практиці застосовують тромболітичні (фібринолітичні) агенти, які лізують тромб, або такі, що опосередковано впливають на фібринолітичні шляхи макроорганізму, проявляючи плазміногенподібну активність [42]. В медичній практиці використовують тромболітичні агенти, отримані безпосередньо з культуральної рідини бактерій (стрептокіназа, сerratіопептидаза), або отримані на основі використання рекомбінантної ДНК (рекомбінантний тканинний активатор плазміногену) [20]. Також широкого застосування набувають іммобілізовані фібринолітичні ензими. Іммобілізація дозволяє змінювати фармакокінетику ензиму в організмі: подовжувати або прискорювати вивільнення з лікарської форми, підсилюючи терапевтичну дію, а також забезпечувати направлену доставку до органу-мішені та знижувати токсичний і побічний вплив. В основі іммобілізації знаходяться фізичні або хімічні взаємодії між діючою речовиною і носієм [59]. Зокрема, на основі іммобілізованих на різних пластмасах, в тому числі і на поліетилені, фібринолітичних ензимів було створено катетери для кровоносних судин, які самоочищаються від відкладень фібрину [7].

На основі стрептокінази, іммобілізованої шляхом її нанесення на водорозчинну полісахаридну матрицю, створено лікарський препарат стрептодеказу. Іммобілізація дає їй змогу тривалий час циркулювати в крові, тим самим здійснюючи пролонговану фібринолітичну дію.

Іммобілізація очищеного фібринолітичного ензиму *B. subtilis* CIR110 на пористій целюлозі методом N-гідроксисукцинімідної активації показала збереження казеїнолітичної і фібринолітичної активності [59]. Таким чином, іммобілізовані фібринолітичні пептидази застосовують для виготовлення антитромбогенних біоматеріалів для використання в медичних приладах і штучних органах, а також як тромболітичні препарати.

Крім того, фібринолітичні пептидази, виділені з бактерій, можна застосовувати в харчовій промисловості в складі харчових добавок, які використовуються в даний час при захворюваннях серця. Тому їх використання може ефективно запобігати серцево-судинним захворюванням [49].

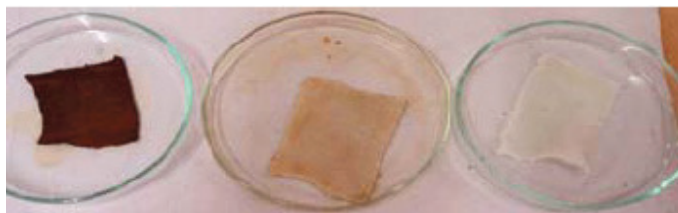


Рис. 4. Деградація плями крові пептидазою з фібринолітичною дією *Bacillus* RV.B2.90 [64]

Мікробні фібринолітичні ензими також можуть бути використані для виробництва миючих засобів. Показана висока ефективність пептидаз з фібринолітичною активністю в досліджах із видалення плям крові з тканин. Це дає змогу використовувати ці ензими у вигляді порошку або розчину в миючих засобах. Так (рис. 4), при використанні пептидази з фібринолітичною активністю з *Bacillus* RV.B2.90 ефективність прання з детергентами при 37 °C значно підвищується при додаванні ензиму (200 од/мл) [64].

Інкубація ензиму *B. circulans*, зі зразками бавовняної тканини, забруднених плямами крові, показали видалення плям без використання будь-яких детергентів протягом 30 хвилин. Оптимум активності цього ензиму спостерігався при pH 11,0 і 70 °C [54]. Використання пептидази *B. mojavensis* A21, в якій оптимум активності при pH 8,0-11,0 і температурі 60 °C, також дає змогу знімати плями крові з забруднених тканин [31].

Таким чином, фібринолітичні пептидази бацил, активні в широкому діапазоні значень рН і температури, мають нові можливості для застосування в фармакології, діагностиці, клініці для запобігання розвитку та лікування тромбозів та інших споріднених захворювань. Висока стабільність до дії різних детергентів і органічних розчинників дає змогу для використання мікробних фібринолітичних ензимів в складі миючих засобів.

Н.А. Нидялкова, Е.В. Мацелюх, Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДАЗЫ *BACILLUS*

Фибринолитические ферменты – это пептидазы, которые относятся к классу гидролитических ферментов, способные расщеплять нерастворимый фибрин. В обзоре представлены фибринолитические пептидазы бактерий рода *Bacillus*. Рассмотрены методы повышения биосинтеза этих ферментов, определения их активности, выделения и очистки. Фибринолитические пептидазы бацилл относят к серино- и металлопептидазам. Они способны гидролизовать как природные субстраты (фибрин, фибриноген, гемоглобин), так синтетические. Высокая стабильность этих ферментов в широком диапазоне значений рН (5-12) и температуры (10-75 °С) позволяет использовать их в фармакологии, медицине для предотвращения развития и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

К л ю ч е в ы е с л о в а: фибринолитическая пептидаза, *Bacillus*, субстратная специфичность, лечение сердечно-сосудистых заболеваний.

N. A. Nidalkova, O. V. Matseliukh, L. D. Varbanets

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

FIBRINOLYTIC PEPTIDASES OF *BACILLUS*

S u m m a r y

The fibrinolytic enzymes are peptidases, which belong to the class of hydrolytic enzymes. They are able to dissolve the insoluble fibrin. This review presents the fibrinolytic peptidases of *Bacillus*. The methods of increasing biosynthesis of these enzymes, determination of their activity, isolation and purification have been observed. The fibrinolytic peptidases of *Bacillus* are serine- and metallopeptidases. Its can hydrolyze both the natural substrates (fibrin, fibrinogen and hemoglobin) and synthetic substrates. The high stability of these enzymes in a wide range of pH (5-12) and temperature (10-75 °C) permits using them in pharmacology, medicine for the prevention and treatment of cardiovascular diseases.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s: fibrinolytic peptidase, *Bacillus*, substrate specificity, treatment of cardiovascular disease.

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

1. Амидолитические методы с использованием хромогенных и флуорогенных субстратов. – <http://www.studydoc.com/diagnostika-gemostaza/amidoliticheskie-metody-s-ispolzovaniem-xromogennyx-i-fluorogennyx-substratov/>.
2. Балабан Н. П., Марданова А. М., Шарипова М. Р., Габдрахманова Л. А., Токмакова Ю. С., Соколова Е. А., Лецинская И. Б. Протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемые в поздней стационарной фазе роста // Вестн. Нижегородского ун-та им. Н. И. Лобачевского, серия Биология. – 2001. – 1, №3. – С. 45–50.
3. Варбанець Л. Д., Мацелюх О. В. Протеолітичні ферменти мікроорганізмів та методи їх дослідження. – Київ, 2008. – 108 с.
4. Герикович А. А. Кибирев В. К. Хромогенные и флуорогенные пептидные субстраты протеолитических ферментов // Биооргани. хим. –1988. – 14, № 11. – С. 1461–1488.
5. Зайцева Е. А., Осипова Т. А. Изучение биокатализаторов и возможностей их практического использования в рамках федеральной целевой научно-технической программы России «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. – 2006. – 47, № 1. – С. 4–14.
6. Зубаиров Д. М. Почему свёртывается кровь? // Соросовский образоват. журн. – 1997. – № 3. – С. 46–52.

7. *Зубаиров Д. М.* Очерк истории первой кафедры медицинской химии и физики в России // Казанский мед. журн. – 2007. – **88**, № 4. – С. 1–14.
8. *Методы* исследования активности сосудистой стенки и фибринолитической системы. www.hemostas.ru/society/publications/m12.shtml
9. *Михайлова Е. О., Марданова А. М., Балабан Н. П., Руденская Г. Н., Шарипова М. Р.* Выделение и характеристика субтилиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинатным штаммом *Bacillus subtilis* AJ 73 на разных фазах роста бацилл // Биохимия. – 2007. – **72**, № 2. – С. 228–235.
10. *Растворимые* комплексы фибрин-мономеров (РКМФ). <http://www.cirlab.ru/head-physician-answers/>.
11. *Серкина А. В., Шевелев А. Б., Честухина Г. Г.* Структура и функции предшественников бактериальных протеиназ // Биоорган. хим. – 2001. – **27**, № 5. – С. 323–346.
12. *Система* гемостаза. http://smed.ru/guides/diseases/SK1793/Tromboehmbolija-ljogochnojj-arterii/69522/#top_part_descr.
13. *Скалка В. В., Краснобрижая Е. Н., Волков Г. Л., Гаврилюк С. П., Жукова А. И., Нарантуяя Нандинцэцэг, Чимгээ Туваансурэн, Одончимэг Ганболд, Болор Бунбадрах, Сулия Бямбасурэн, Понсандулам Дашиям, Дармостук М.С., Гаврилюк Е.С.* Получение и характеристика фибрино(гено)литического фермента из яда щитомордника рода *Agkistrodon blomhoffi* // Биофармацевт. журн. – 2010. – **2**, № 2. – С. 32–39.
14. *Agrebi R., Haddar A., Hajji M., Frikha F., Manni L., Jellouli K., Nasri M.* Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: characterization and statistical media optimization // Can. J. Microbiol. – 2009. – **55**, N 9. – P. 1049–61.
15. *Agrebi R., Haddara A., Hmideta N., Jelloulia K., Mannia L., Nasri M.* BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization // Process. Biochemistry. – 2009. – **44**, N 11. – P. 1252–1259.
16. *Agrebi R., Hmidet N., Hajji M., Ktari N., Haddar A., Fakhfakh-Zouari N., Nasri M.* Fibrinolytic serine protease isolation from *Bacillus amyloliquefaciens* An6 grown on *Mirabilis jalapa* tuber powders // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2010. – **162**, N 1. – P. 75–88.
17. *Asokan S., Jayanthi C.* Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* // Cell Tissue Res. – 2010. – **10**, N 1. – P. 2119–2123.
18. *Bergmann S., Hammerschmidt S.* Fibrinolysis and host response in bacterial infections // Thromb. Haemost. – 2007. – N 98. – P. 512–520.
19. *Bernardes C. P., Santos-Filho N. A., Costa T. R., Gomes M. S., Torres F. S., Costa J. et al.* Isolation and structural characterization of a new fibrinogenolytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom // Toxicon. – 2008. – **51**, N 4. – P. 574–84.
20. *Blann A. D., Landray M. J., Lip G. Y.* ABC of antithrombotic therapy. An overview of antithrombotic therapy // BMJ. – 2002. – **325**, N 7367. – P. 762–765.
21. *Chang A. K., Kim H. Y., Park J. E., Acharya P., Park I. S., Yoon S. M., You H. J., Hahn K. S., Park J. K., Lee J. S.* *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis // J. Bacteriol. – 2005. – **187**, N 20. – P. 6909–6916.
22. *Chang C. T., Fan M. H., Kuo F. C., Sung H. Y.* potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1 // J. Agric. Food Chem. – 2000. – **48**. – P. 3210–3216.
23. *Chiang C. J., Chen H. C., Chao Y., Tzen J. T. C.* Efficient system of artificial oil bodies for functional expression and purification of recombinant nattokinase in *Escherichia coli* // J. Agric. Food. Chem. – 2005. – **53**, N 12. – P. 4799–4804
24. *Choi N. S., Kim B. Y., Lee J. Y., Yoon K. S., Han K. Y., Kim S. H.* Relationship between acrylamide concentration and enzymatic activity in an improved single fibrin zymogram gel system // J. Biochem. Mol. Biol. – 2002. – **35**, N 2. – P. 236–238.
25. *Choi N. S., Kim S. H.* Application of fibrin zymography for determining the optimum culture time for protease activity // Biotech. Techniques. – 1999. – **13**, N 12. – P. 899–901.
26. *Deepak V., Ilangovan S., Sampathkumar M. V., Victoria M. J., Pasha S., Pandian S., Gurunathan S.* Medium optimization and immobilization of purified fibrinolytic URAK from *Bacillus cereus* NK1 on PHB nanoparticles // Enz. Microb. Tech. – 2010. – **47**, N 6. – P. 297–304.
27. *Deepak V., Kalishwaralal K., Ramkumar Pandian S., Babu I. S. V., Senthilkumar S. R., Sangiliyandi G.* Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology // Bioresource Technology. – 2008. – **99**, N 17. – P. 8170–8174.
28. *Dubey R., Kumar J., Agrawala D., Char T., Pusp P.* Isolation, production, purification, assay and characterization of fibrinolytic enzymes (Nattokinase, Streptokinase and Urokinase) from bacterial sources // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – **10**, N 8. – P. 1408–1420.
29. *Gesheva V.* Production of fibrinolytic enzyme by *Streptomyces rimosus* at conditions of nitrogen limitation // J. Microbial. Biochem. Technol. – 2009. – **1**, N 1. – P. 57–58.

30. Habib S. A., Aboudoubara M. I., Abdel-Malak C. A., Badawy R. M. Optimization of fibrinase productivity from *Actinomyces* // Egypt. J. Hosp. Med. – 2010. – **40**. – P. 375–388.
31. Haddar A., Sellami-Kamoun A., Fakhfakh-Zouari N., Hmidet N., Nasri M. Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavensis* A21 // Biochem. Eng. J. – 2010. – **51**, N 1-2. – P. 53–63.
32. Hassanein W. A., Kotb E., Awny N. M., El-Zawahry Y. A. Fibrinolysis and anticoagulant potential of a metallo protease produced by *Bacillus subtilis* K42 // J. Biosci. – 2011. – **36**, N 5. – P. 773–779.
33. Heussen C., Dowdle E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and co-polymerized substrates // Anal. Biochem. – 1980. – **102**. – P. 196–202.
34. Hua Y., Jiang B., Mine Y., Mu W. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional fermented shrimp paste // J. Agric. Food Chem. – 2008. – **56**, N 4. – P. 1451–7.
35. Hung Y. F. Studies on the purification and biochemical properties of fibrinolytic enzyme from natto-red bean // Food. Nutr. – 2010. – **7**, N 27. – P. 120.
36. Hwang K. J., Choi K. H., Kim M. J., Park C. S., Cha J. Purification and characterization of a new fibrinolytic enzyme of *Bacillus licheniformis* KJ-31, isolated from korean traditional Jeot-gal // J. Microbiol Biotechnol. – 2007. – **17**, N 9. – P. 1469–76.
37. Ikemura H., Inouye M. In vitro processing of pro-subtilisin in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. – 1988. – **263**. – P. 12959–12963.
38. Kamio A., Shiraiishi M., Shitama K., Sugimoto Y., Honda K., Takebayashi S. Measurement of endothelial fibrinolytic activity in aorta and vena cava in rabbits: a fibrin-agar plate method // Artery. – 1979. – **5**, N 1. – P. 76–89.
39. Kim G. M., Lee A. R., Lee K. W., Park J. Y., Chun J., Cha J., Song Y. S., Kim J. H. Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from Cheonggukjang // J. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – **19**, N 9. – P. 997–1004.
40. Kim J. B., Jung W. H., Ryu J. M., Lee Y. J., Jung J. K., Jang H. W., Kim S. W. Identification of a fibrinolytic enzyme by *Bacillus vallismortis* and its potential as a bacteriolytic enzyme against *Streptococcus mutans* // Biotechnol. Lett. – 2007. – **29**, N 4. – P. 605–610.
41. Kim S. H., Choi N. S., Lee W. Y. Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzymes on gels // Anal. Biochem. – 1998. – **263**. – P. 115–116.
42. Kumar A., Pulicherla K. K., Ram K. S., Rao K. S. Evolutionary Trend of Thrombolytics // Int. J. Bio-Sci. Bio-Technol. – 2010. – **2**, N 4. – P. 51–68.
43. Ledolter J., Swersey A. J. Testing 1-2-3: Experimental Design with Applications in Marketing and Service Operations. – Stanford University Press, 2007. – 658 p.
44. Lee A. R., Kim G. M., Kwon G. H., Lee K. W., Park J. Y., Chun J., Cha J., Song Y. S., Kim J. H. Cloning of aprE86-1 gene encoding 27 kDa mature fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH86-1 // J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – **20**, N 2. – P. 370–374.
45. Maal K. B., Emtiazi G., Nahvi I. Increasing the alkaline protease activity of *Bacillus cereus* and *Bacillus polymyxa* simultaneously with the start of sporulation phase as a defense mechanism // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – **10**, N 19. – P. 3894–3901.
46. Mahmoud M. G., Ghazy I. A., Ibrahim G. S., Fahmy A. S., El-Badry M. O., Abdel-Aty A. M. Purification and characterization of a new fibrinolytic enzyme of *Bacillus polymyxa* NRC-A // Int. J. Acad. Res. – 2011. – **3**, N4. – P. 542–547.
47. Masada M. Determination of the Thrombolytic Activity of Natto Extract // Food Style 21. – 2004. – **8**, N 1. – P. 92–95.
48. Mecikoglu M., Saygi B., Yildirim Y., Karadag E., Ramadan S. S., Esemeli T. The effect of proteolytic enzyme serratiopeptidase in the treatment of experimental implant-related infection // J. Bone Joint Surg. Amer. – 2006. – **88**, N 6. – P. 1208–1214.
49. Mine Y., Wong A. K., Jiang B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods // Food Res. Intern. – 2005. – **38**, N 3. – P. 243–250.
50. Omura K., Hitosugi M., Kaketani K., Zhu X., Maeda H., Tokudome S. Fibrinolytic and anti-thrombotic effect of NKCP, the protein layer from *Bacillus subtilis* (natto) // Biofactors. – 2004. – **22**, N1-4. – P. 185–187.
51. Peng Y., Huang Q., Zhang R. H., Zhang Y. Z. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. – 2003. – **134**, N 1, P. 45–52.
52. Peng Y., Yang X., Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – **69**, N 2. – P. 126–32.
53. Peng Y., Zhang Y. Z. Cloning and expression in *Escherichia coli* of coding sequence of the fibrinolytic enzyme mature peptide from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 // Chin. J. Appl. Environ. Biol. – 2002. – **8**. – P. 285–289

54. Rao C. S., Sathish T., Ravichandra P., Prakasham R. S. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications // *Process Biochem.* – 2009. – **44**. – P. 262–268.
55. Rawlings N. D., Barrett A. J., Bateman A. Asparagine peptide lyases. a seventh catalytic type of proteolytic enzymes // *J. Biol. Chem.* – 2011. – **286**, N 44. – P. 38321–38328.
56. Review of Food Chemistry. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/basics/foodchem.html>
57. Rym A., Anissa H., Mohamed H., Fakher F., Laila M., Kemel J., Moncef N. Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: characterization and statistical media optimization // *Can. J. Microbiol.* – 2009. – **55**, N 9. – P. 1049–1061.
58. Sarvas M., Harwood C. R., Bron S., Van Dijl J. M. Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria // *Biochim. Biophys.* – 2004. – **1694**. – P. 311–327.
59. Satoh S., Takakura K., Yamasaki T., Orii Y., Hatta T., Takizawa N., Kiyohara H. Isolation and characterization of an extracellular serine protease with strong fibrinolytic activity from *Bacillus subtilis* CIR110 and its immobilization onto cellulose beads // *Bulletin of the Okayama University of Science. A. Natural Science.* – 1997. – **21**, N 33. – P. 105–115.
60. Shafee N., Aris S. N., Rahman N. Z., Basri M., Salleh A. B. Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146 // *J. App. Sci. Res.* – 2005. – **1**, N 1. – P. 1–8.
61. Snehal G. K., Ghosh J. S. Production, isolation and characterization of exotoxin produced by *Bacillus cereus* NCIM-2156 and *Bacillus licheniformis* NCIM-5343 // *Br. J. Pharm. Toxicol.* – 2010. – **1**, N 1. – P. 50–55.
62. Tamura Y., Okada K., Kawao N., Yano M., Ueshima S., Nagai N., Matsuo O. Profibrinolytic effect of Enzamin, an extract of metabolic products from *Bacillus subtilis* AK and *Lactobacillus* // *J. Thromb. Thrombolysis.* – 2011. – **32**, N 2. – P. 195–200.
63. Ueda M., Kubo T., Miyatake K., Nakamura T. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – **74**, N 2. – P. 331–338.
64. Vijayalakshmi S., Venkatkumar S., Thankamani V. Screening of alkalophilic thermophilic protease isolated from *Bacillus* RV.B2.90 for industrial applications // *Res. Biotechnol.* – 2011. – **2**, N 3. – P. 32–41.
65. Wang C., Du M., Zheng D., Kong F., Zu G., Feng Y. Purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis* Natto B-12 // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – **57**. – P. 9722–9729.
66. 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. – **33**, N 9. – P. 750–758.
67. Wang G., Huang H., Zhang M. Isolation and identification of a fibrinolytic bacterium strain from frozen soil in the Tibetan Plateau // *Acta microbiologica sinica.* – 2010. – **50**, N 2. – P. 148–54.
68. Wang S. H., Zhang C., Yang Y. L., Diao M., Bai M. F. Screening of a high fibrinolytic enzyme producing strain and characterization of the fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus subtilis* LD-8547 // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – **24**, N 4. – P. 475–482.
69. Wang S. L., Wu Y. Y., Liang T. W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007 // *N. Biotechnol.* – 2011. – **28**, N 2. – P. 196–202.
70. Wei X., Luo M., Xu L., Zhang Y., Lin X., Kong P., Liu H. Production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* by fermentation of Chickpeas, with the evaluation of the anticoagulant and antioxidant properties of Chickpeas // *J. Agric. Food Chem.* – 2011. – **59**, N 8. – P. 3957–63.
71. Wohnner N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution // *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* – 2008. – **6**, N 3. – P. 224–228.
72. Yeo W. S., Seo M. J., Kim M. J., Lee H. H., Kang B. W., Park J. U., Choi Y. H., Jeong Y. K. Biochemical analysis of a fibrinolytic enzyme purified from *Bacillus subtilis* strain A1 // *J. Microbiol.* – 2011. – **49**, N 3. – P. 376–380.
73. Yin L. J., Lin H. H., Jiang S. T. Bioproperties of potent Nattokinase from *Bacillus subtilis* YJ1 // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – **58**, N 9. – P. 5737–5742.
74. Ziolkowska N., Botos I., Melnikov E. E., Gutschina A., Rasulova F., Maurizi M. R., Rotanova T. V., Wlodawer A. Comparisons of the structures of isolated proteolytic domains of Lon proteases // 4th General Meeting of the Int. Proteolysis Society (Quebec City, Canada, 4–8 June 2005). – Canada, 2005. – P. 296.
75. Zu X., Zhang Z., Yang Y., Che H., Zhang G., Li J. Thrombolytic activities of nattokinase extracted from *Bacillus subtilis* fermented soybean curd residues // *Int. J. Biol.* – 2010. – **2**, N 2. – P. 120–125.
76. Zymography. www.biology-online.org/articles/metabolic_mapping_proteinase_activity/zymography.html.

Отримано 17.09.2012