

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

Том 57

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

3

МОСКВА · 1988

Протеолитическая активность террилитина в присутствии двухвалентных ионов металлов

Ионы металлов	Остаточная активность			
	Казеинолитическая		фибринолитическая, ФЕ/мл	тромболитическая, мин
	ПЕ/мг	%		
Mg ²⁺	13,8	99,8	606	160
Ca ²⁺	13,0	92,8	520	195
Fe ²⁺	11,4	81,4	440	180
Zn ²⁺	13,0	92,8	500	195
Mn ²⁺	12,4	88,5	490	195
Co ²⁺	11,4	80,4	520	180
Cu ²⁺	14,3	102,0	409	160
Исходная активность	14,0	100	520	180

зывало заметного действия на активность террилитина при гидролизе казеина, фибрина и на лизис экспериментально полученных тромбов.

Сравнительный анализ полученных результатов позволяет заключить, что наибольшей атаке ионами металлов подвергается бактериальная протеиназа штамма 64, которая, как было ранее установлено, является металлозависимым ферментом. Было также отмечено неодинаковое влияние этих металлов на скорость гидролиза этим ферментом различных субстратов (казеин, фибрин). Сериновая протеиназа *B. mesentericus* 8 по чувствительности к ионам металлов имеет большее сходство с террилитином, который, по данным Селезневой [6], принадлежит к группе сериновых протеназ.

Таким образом, полученные данные показывают, что протеиназы, выделенные из двух штаммов *B. mesentericus*, различаются как своими физико-химическими свойствами, так и субстратной специфичностью. Вполне возможно, что найденные различия объясняются особенностями экологического существования двух культур одного вида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белозерский М. А., Дунаевский Я. Е., Руденская Г. Н., Степанов В. М. // Биохимия. 1964. Т. 49. Вып. 3. С. 479.
2. Имшенецкий А. А., Касаткина И. Д., Черкесова Г. В., Лебедева И. М. // Микробиология. 1986. Т. 55. Вып. 2. С. 217.
3. Имшенецкий А. А., Касаткина И. Д., Нестерова Н. Г., Черкесова Г. В. // Микробиология. 1987. Т. 56. Вып. 6. С. 947.
4. Имшенецкий А. А., Броцкая С. З. // Микробиология. 1969. Т. 38. Вып. 6. С. 1043.
5. Орещенко Л. И., Нестеренко Е. А. // Матер. Всесоюз. симпоз. по химии протеолитических ферментов. Вильнюс, 1973. С. 51.
6. Селезнева А. А., Большакова М. Д. // Прикл. биохимия и микробиология. 1986. Т. 22. Вып. 1. С. 3.
7. Asirup T., Müllertz S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1952. V. 10. № 2. P. 346.
8. Fayed K. J., El Saed // Z. allg. Microbiol. 1980. B. 20. H. 6. S. 383.
9. Hartley B. S. // Ann. Rev. Biochem. 1960. V. 29. P. 45.
10. Kunitz M. J. // J. Gen. Physiol. 1947. V. 30. № 3. P. 291.

Институт микробиологии
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
20.XI.1986

THE EFFECT OF INHIBITORS AND CERTAIN CATIONS
ON THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *BACILLUS MESENTERICUS*

Imshenetsky A. A., Nesterova N. G., Cherkesova G. V.,
Fetisova Z. S.

The effect of some inhibitors and bivalent metal cations (Mn²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Co²⁺ and Cu²⁺) on the proteolytic activity of two *Bacillus mesentericus* strains (strain 8 and strain 64 M-variant) was comparatively studied. The both enzymes were shown to be serine proteinases, but the proteinase of strain 64 was also a metal-dependent enzyme. Metal ions exerted no essential effect on the proteinase of strain 8. Ca²⁺ and Mg²⁺ ions stimulated the proteinase activity of strain 64 whereas Fe²⁺ and Zn²⁺ ions inhibited it in the case of three substrates. Therefore, the two proteinases are different.

УДК 579.852.11.013 : 577.152.34

СЕРИНОВАЯ ПРОТЕИНАЗА С ЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Павлова И. Н., Жолнер Л. Г., Захарова И. Я.,
Тиньянова Н. З., Честухина Г. Г., Степанов В. М.

26

Термофильный штамм *Bacillus licheniformis* осуществляет биосинтез внеклеточной сериновой протеиназы, которая по аминокислотному составу, специфичности действия, характеру ингибирования рядом веществ, а также иммунохимическим свойствам родственна субтилизину типа Карлсберг, отличаясь от последнего способностью активно лизировать живые клетки грамотрицательных бактерий и дрожжей, а также большей термостабильностью.

1

Комплекс внеклеточных ферментов термофильного штамма *Bacillus licheniformis*, проявляющий литические свойства, обнаруживает высокую протеолитическую активность [4]. Способность гидролизовать ряд субстратов белковой природы, а также различные синтетические пептиды позволяет предполагать наличие нескольких протеолитических ферментов в комплексе, в том числе и сериновой протеиназы.

Настоящая работа посвящена выделению этого фермента и изучению его свойств.

Материалы и методы исследования

Культивирование продуцента осуществляли глубинным способом на качалке (180—230 об/мин) в 0,5-литровых колбах, содержащих 50 мл среды следующего состава (в г/л): сухие клетки пекарских дрожжей — 20; K_2HPO_4 — 2; MgSO_4 — 1. Температура культивирования 45°, длительность инкубации 20 ч.

Комплекс внеклеточных ферментов получали, высаливая белки из фильтрата культуральной жидкости серно-кислым аммонием (80% насыщения). Выделение и очистку сериновой протеиназы из препарата проводили методом аффинной хроматографии, используя в качестве специфического лиганда антибиотик пептидной природы бацитрацин [5].

На колонку с бацитрацин-силохромом (7×3 см), уравновешенную 0,05 М трис-НСl-буфером pH 8,3 с CaCl_2 (10^{-3} М), наносили около 400 мг препарата (~300 мг белка), растворенного в том же буфере, после чего промывали сорбент 100 мл исходного буфера (фракция 1). Элюировали фермент раствором 1 М NaCl с 25%-ным изопропанолом в том же буфере (фракция 2). Белковые фракции, проявляющие протеолитическую активность, подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 (5×40 см) и наносили на колонку с бацитрацин-сефарозой (1,5×18 см), уравновешенную 0,05 М трис-НСl-буфером pH 8,3 с CaCl_2 (10^{-3} М), промывали 50 мл того же буфера (фракция 1'). Сорбированный материал элюировали ступенчато раствором 1 М NaCl (фракция 2') и 1 М NaCl с 25%-ным изопропанолом в исходном буфере (фракция 3'). Содержание белка определяли по величине экстинкции при 280 нм и количественно по методу Лоури [13].

Протеолитическую активность устанавливали, используя в качестве субстрата казеин или синтетический трипептид, содержащий хромогенную группу, — *n*-нитроанилид бензилоксикарбонил — аланил-аланил-лейцина (Z-Ala-Ala-Leu-pNA).

При определении казеинолитической активности [7] пробу, содержащую 2 мл 1%-ного раствора казеина в 0,05 М трис-НСl-буфере pH 9,1, 0,2 мл исследуемого материала (20—100 мкг белка) и тот же буфер до объема 5 мл, инкубировали 10 мин при 60°. Негидролизованный белок осаждали равным объемом 10%-ной ТХУ, осадок удаляли фильтрованием через бумажный фильтр и в растворе определяли оптическую плотность при 276 нм. Активность выражали в мкмоль освобожденного тирозина.

Гидролиз синтетического субстрата сериновых протеиназ Z-Ala-Ala-Leu-pNA проводили в реакционной смеси, содержащей 0,25 мл раствора субстрата (0,5 мг/мл), 0,01 мл ферментного раствора и 0,05 М трис-НСl-буфер pH 8,4 с CaCl_2 (10^{-3} М) (до 1 мл). Об активности судили по количеству отщепленного *n*-нитроанилина. Расчет проводили по формуле

$$A = \frac{0,195 \cdot E_{276}}{V \cdot t \cdot E_{280}}$$

где A — активность в единицах, соответствующих количеству отщепленного p -нитроанилина, мкмоль; V — объем ферментного раствора, мл; t — время реакции, протекающей при 37° , мин.

Литическую активность (ЛА) определяли турбидиметрическим методом с использованием в качестве тест-объектов живых клеток суточной культуры *Acinetobacter calcoaceticus*, выращенной на агаризованной среде с этиловым спиртом в качестве источника углерода [6], и *Candida boidinii*, культивируемой на сусло-агаре. Инкубационная смесь содержала 1 мл микробной суспензии с оптической плотностью (E_{540}) 0,8—0,9 ОЕ в 0,05 М трис-НСI-буфере рН 9,1, исследуемый материал (40—200 мкг белка, в зависимости от степени очистки) и 0,05 М трис-НСI-буфер до общего объема пробы 2 мл. Пробы инкубировали при 60° в течение 10 мин при определении бактериолитической активности (субстрат — клетки *A. calcoaceticus*) или 30 мин (при определении дрожжелитической активности, субстрат — клетки *C. boidinii*). Контролем автолитической активности клеток тест-культур служили пробы, не содержащие ферментного материала. Расчет активности проводили по формуле

$$ЛА = \frac{\Delta E_{540}}{0,01 \cdot a},$$

где ΔE_{540} — изменение оптической плотности суспензии клеток за время инкубации; a — белок по Лоури; 0,01 — коэффициент пересчета.

Ингибирование протеолитической активности фермента (по Z-Ala-Ala-Leu-pNA) определяли, инкубируя раствор фермента с ингибиторами в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М в течение 30 мин при 37° , а затем 0,01 мл раствора фермента с ингибитором вносили в реакционную смесь. При этом использовали следующие ингибиторы: p -хлормеркурийбензонат (ПХМБ), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), монооноксусную кислоту (МИУК), диизопропилфторфосфат (ДФФ), а также хлорид ртути $HgCl_2$.

Влияние двухвалентных металлов на протеолитическую активность сериновой протеиназы определяли, инкубируя фермент с хлоридами Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , в концентрации 10^{-3} М в течение 30 мин при 37° , а затем прибавляя по 0,2 мл раствора фермента с солями металлов в реакционную смесь.

Электрофорез в ПААГ проводили в пластинках с 7,5%-ным гелем в присутствии 1% додецилсульфата натрия (ДСН). Молекулярную массу фермента определяли методом ДСН-фореза. Метчиками служили овальбумин (45 000), химотрипсиноген (25 000) и цитохром c (12 300).

Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе «Biotronic» после 24-часового гидролиза в 5,7 М НСI образцов гомогенного препарата.

Определение изоэлектрической точки фермента осуществляли по методу, описанному в методическом руководстве фирмы «Pharmacia» (Швеция), используя амфолины с интервалом рН 4—6 и 3—10. Изофокусирование вели в пластинках полиакриламидного геля при силе тока 2 мА в течение 3—5 ч. После окончания изоэлектрофокусирования гели разрезали на 30 частей, каждую часть заливали 0,5 мл 0,1 М NaCl и оставляли на несколько часов. Затем в каждой пробе измеряли рН и белок при 280 нм.

Антисыворотку к сериновой протеиназе термофильного штамма получали после 3-кратной иммунизации кроликов (с 10-дневным интервалом) очищенным ферментом в количестве 0,5 мг в присутствии полного адьюванта Фрейнда. Иммунохимический анализ проводили методом двойной диффузии в агаре [15]. Субтилизины типа Карлсберг представляли собой коммерческие препараты фирмы «Boehringer» (ФРГ) и «Novo Industry» (Дания), субтилизин BPN' — фирмы «Serva» (ФРГ). Сериновая протеиназа *Bacillus mesentericus* была любезно предоставлена Бондарчук А. А.

Результаты и обсуждение

Первый этап выделения сериновой протеиназы из комплекса литических ферментов термофильной бациллы, представляющий собой хроматографию на бацитрацин-силохроме, позволил отделить пигмент и значительную часть белкового материала (более 50%), проявляющего главным образом карбогидразные активности. При этом в несорбированном материале содержалось до 50% дрожжелитической активности и лишь незначительная часть бактериолитической (10—15%). Потери протеолитической активности были несущественными (до 15%).

Фракции, элюированные с колонки, заполненной бацитрацин-силохромом, 1 М NaCl с 25%-ным изопропанолом, проявляли протеолитическую и литическую активность. Они были объединены, обессолены и нанесены на бацитрацин-сефарозу. При ступенчатом элюировании белок с протеолитической активностью находился во фракции 3'. Типичный опыт по разделению компонентов ферментного комплекса и выделению белка с протеолитической активностью представлен в табл. 1.

Белок, проявляющий протеолитическую и литическую активности, был практически гомогенен при электрофорезе в ПААГ как в нативной,



Рис. 1

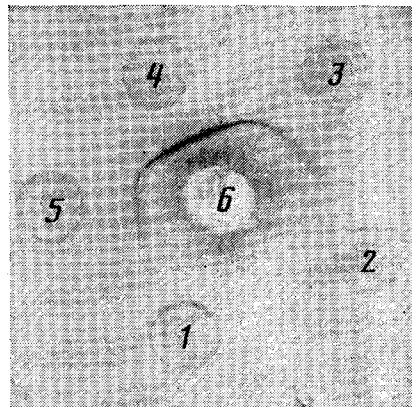


Рис. 3

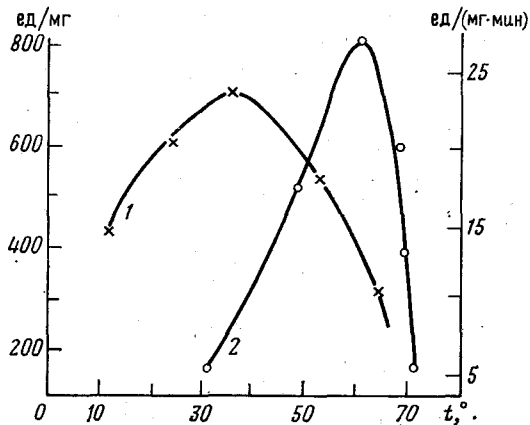


Рис. 2

Рис. 1. Электрофорез сериновой протеиназы термофильного штамма *B. licheniformis* в ДСН — ПААГ. 1 — сериновая протеиназа, 2 — цитохром *c*, 3 — химотрипсиноген, 4 — овальбумин

Рис. 2. Влияние температуры на активность исследуемой сериновой протеиназы. 1 — протеолитическая активность (субстрат — Z-Ala-Ala-Leu-pNA) (ед./мг·мин); 2 — бактериолитическая активность (ед./мг)

Рис. 3. Двойная диффузия в агаровом геле различных субтилизинов. 1 — субтилизин ВРН' («Sergva»); 2 — сериновая протеиназа *B. mesentericus*, 3 — субтилизин типа Карлсберг («Novo Industry»), 4 — субтилизин типа Карлсберг («Boehringer»), 5 — сериновая протеиназа термофильного штамма *B. licheniformis*, 6 — антисыворотка к сериновой протеиназе термофильного штамма *B. licheniformis*

так и денатурирующей (рис. 1) системе. По данным электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия его молекулярная масса составляет 28 000. Исходя из данных об аминокислотном составе фермента (Asp — 30, Thr — 20, Ser — 33, Glx — 13, Pro — 10, Gly — 38, Ala — 39, Val — 26, Met — 3, Ile — 11, Leu — 20, Tyr — 12, Phe — 4, Lys — 9, His — 5, Arg — 3)¹, эта величина близка к 31 000. Изоэлектрическая точка протеиназы с литическими свойствами рН 8,0.

¹ Содержание триптофана не определяли.

Таблица 1

Очистка сериновой протеиназы термофильного штамма *B. licheniformis*

Фракция	Объем, мл	Белок, мг	Протеолитическая активность				Дрожжелитическая активность		Бактериолитическая активность	
			по казеину		по Z-AAL-pNA		всего, ед.	удельная, ед/мг	всего, ед.	удельная, ед/мг
			всего, ед.	удельная, ед/мг	всего, ед.	удельная, ед/мг				
Препарат Бацитрацин-силохром; фракции:	140	273	2485	9,1	590	2,16	18 900	69,2	154 000	564,4
1	216	178,2	253,8	1,4	32	0,18	7 560	42,7	30 240	169,7
2	160	75,2	2010	26,7	359	4,77	8 000	106,4	88 000	1170,2
Сефадекс G-25	160	42,4	1367	32,2	243	5,7	7 040	166,0	81 607	1924,7
Бацитрацин-сефароза, фракции:										
1'	205	26,6	123	4,6	0,5	0,02	1 640	61,5	17 925	689,4
2'	55	3,3	44	13,3	0,4	0,12	0	—	9 625	2916,7
3'	18	4,9	1094	223,3	139	30,9	324	66,7	3 150	648,2

Таблица 2

Влияние ингибиторов на сериновые протеиназы бацилл

Источник фермента	Ингибирование, %					
	Ингибиторы, (10^{-3} М)					
	ДФФ	ФМСФ	ЭДТА	ПХМБ	МИУК	Hg ²⁺
<i>B. licheniformis</i> (термофильный штамм)	100	96,0	31,0	47,0	0	64,0
<i>B. licheniformis</i> (субтилизин, «Boehringer»)	100	99,0	—*	46,8	0	—
<i>B. thuringiensis</i>	100	98,4	—	97,2	—	100

* Не определяли.

Исследованиями было установлено, что термооптимумы протеолитического и литического действия исследуемого фермента не совпадают (рис. 2). Очевидно, белки клеточной стенки (или пептидные мостики пептидогликана) становятся доступными ферментативной атаке сериновой протеиназы исследуемого штамма лишь после некоторых структурных перестроек в стенке, которые, вероятно, происходят при повышенной температуре. В пользу этого свидетельствует также более высокая литическая активность фермента (приблизительно в 2 раза) по отношению к прогретым (100° , 15 мин) клеткам тест-культур.

pH-Оптимальности протеолитического (pH 9,5) и литического (pH 9,1) действия исследуемого фермента практически совпадают.

При исследовании действия различных классов ингибиторов на протеиназу термофила обнаружено, что активность фермента полностью подавляется ингибиторами сериновых протеиназ — ФМСФ и ДФФ (табл. 2). Несмотря на то что в литической протеиназе не содержится цистеин, ее активность заметно угнеталась ионами ртути и ПХМБ (но не МИУК). Снижалась активность фермента и в присутствии ЭДТА (табл. 2), хотя активирующего эффекта ионов двухвалентных металлов при гидролизе казеина нами обнаружено не было: в присутствии ионов Co^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} и Cu^{2+} (10^{-3} М) активность фермента оставалась без изменений, а ионы Zn^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} в той же концентрации снижали ее на 25—35%. Снижалась активность протеиназы и в присутствии ионов Na^{+} (в 10^{-3} М растворе NaCl на 40%).

Факт прочного связывания протеиназы термофильной бациллы со специфическим лигандом сериновых протеиназ, способность гидролизо-

Таблица 3

Аминокислотный состав сериновых протеиназ бактерий рода *Bacillus*

Аминокислотный остаток	Субтилизин				Аминокислотный остаток	Субтилизин			
	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i> 797 [1]	Carlsberg [16]	ВРН' [16]		<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i> 797 [1]	Carlsberg [16]	ВРН' [16]
Asp	30	37	28	28	He	11	11	10	13
Thr	20	17	19	13	Leu	20	17	16	15
Ser	33	34	32	37	Tyr	12	9	13	10
Glx	12	15	12	15	Phe	4	4	4	3
Pro	10	14	9	14	Trp	—	—	1	3
Gly	38	17	35	33	Lys	9	18	9	11
Ala	39	36	41	37	His	5	5	5	6
Val	26	28	31	30	Arg	3	4	4	2
Met	3	4	5	5					

Таблица 4

Сравнение свойств фермента из термофильной споровой бактерии и субтилизина типа Карлсберг

Характеристика	Протеиназа из термофила	Субтилизин типа Карлсберг
Молекулярная масса	28 000—30 000	28 000
Изоэлектрическая точка, pI	8,0	7,8—8,4
Активность по Z-Ala-Ala-Leu-pNa:		
оптимум pH	9,5	10,5
температурный оптимум	35°	35°
специфическая активность, мкмоль/ (мин·мг)	13,9—26,4	10,8
Ингибирование, %:		
ДФФ	99,8	100
ФМСФ	96,0	100
Hg ²⁺	64,9	—
ПХМБ	47,2	46,8
ЭДТА	31,4	—

вать субстрат этой группы ферментов, а также полное ингибирование ее активности ингибиторами сериновых протеиназ указывают на принадлежность выделенного фермента к семейству сериновых протеиназ субтилизинового типа.

Сравнение аминокислотного состава нескольких субтилизинов (табл. 3) и некоторых физико-химических и каталитических свойств (табл. 4) показало, что внеклеточная протеиназа исследуемого штамма наиболее близка субтилизину типа Карлсберг, характерному для представителей вида *B. licheniformis* [12, 16]. Однако это сходство не является абсолютным, поэтому для установления степени родства фермента с субтилизинами были проведены серологические исследования. Оказалось, что антисыворотка к сериновой протеиназе термофильного штамма дает перекрестную реакцию преципитации с субтилизинами типа Карлсберг и не проявляет серологического родства с субтилизином ВРН' и сериновой протеиназой *B. mesentericus* [3] (рис. 3). Таким образом, небольшие различия в первичной структуре исследуемого фермента и субтилизина типа Карлсберг не отражаются на иммунохимических свойствах ферментов, однако они были достаточными, чтобы обусловить некоторые различия физико-химических и каталитических свойств этих субтилизинов. Прежде всего следует отметить существенные различия в термостабильности субтилизинов типа Карлсберг, один из которых, а именно фермент фирмы «Boehringer», синтезируется мезофильным штаммом *B. licheniformis*, второй является сериновой протеиназой экстремального термофила того же вида, выделенного из го-

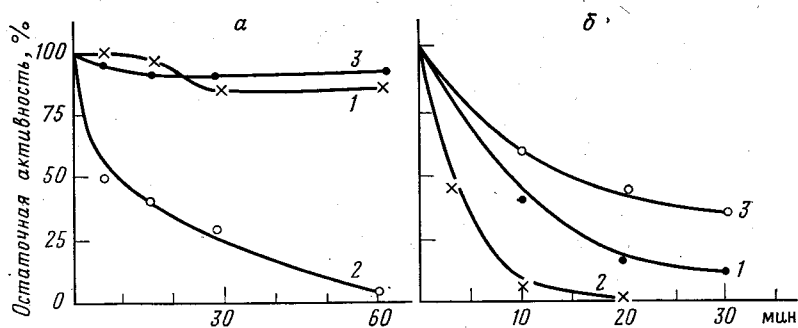


Рис. 4. Термостабильность субтилизинов: а — при 60°, б — при 70°; 1 — сериновая протеиназа термофильного штамма *B. licheniformis*, 2 — субтилизин типа Карлсберг («Boehringer»), 3 — сериновая протеиназа экстремального термофила *B. licheniformis*

рячего источника, а третий — описываемый нами фермент. Было установлено, что при 60° ферменты обоих термофилов практически не меняют активность в течение 1 ч, тогда как фермент мезофила при этой температуре снижает активность на 50% за 5 мин (рис. 4, а); при 70° фермент исследуемого штамма занимает как бы срединное положение между двумя другими ферментами: его «время полужизни» при этой температуре составляет 7,5 мин, тогда как ферменты мезофила и экстремального термофила снижают активность вдвое за 4 и 12 мин соответственно (рис. 4, б).

Ряд исследователей [19] отмечают, что при сравнении аминокислотного состава аналогичных ферментов из мезо- и термофильных форм близкородственных организмов обычно наблюдается более высокое содержание основных аминокислот и глутаминовой кислоты у ферментов термофилов. В нашем случае такой закономерности не прослеживается, и устойчивость исследуемого фермента к повышенным температурам определяется какими-то другими особенностями структуры его молекулы.

Основное же отличие сериновой протеиназы термофильного штамма от субтилизина типа Карлсберг заключается в ее способности активно лизировать живые клетки грамотрицательных бактерий и дрожжей (с активностью около 700 и 60 ед/мг белка соответственно).

При сравнении литических свойств нескольких субтилизинов было обнаружено, что фермент термофильного штамма обладает активностью приблизительно на порядок выше, чем остальные субтилизины, исследованные в одних и тех же условиях (температура 40°, рН 8,5): если бактериолитическая активность исследуемого фермента составляла 772,5 ед/мг белка, то та же величина для фермента *B. mesentericus* [3], субтилизина А (тип Карлсберг) фирмы «Boehringer», субтилизина типа Карлсберг фирмы «Novo Industry» и субтилизина ВРН фирмы «Serga» составляла 42,5, 51,0, 38,0 и 44,2 ед. соответственно. Полученные нами результаты, а также данные многих исследователей [1, 2, 8—11, 14, 17, 18] о литической активности сериновых и металлзависимых протеиназ различных видов микроорганизмов позволяют предположить, что способность осуществлять гидролиз белков, включенных в клеточную стенку определенных групп микроорганизмов, является общим свойством этой большой группы секреторных ферментов. Различия между ними (в этом аспекте) заключаются лишь в спектре лизируемых микроорганизмов, интенсивности литического действия и условиях, при которых оно проявляется. Поэтому литический эффект протеолитических ферментов микроорганизмов можно рассматривать как один из способов борьбы за существование в микробных ассоциациях.

Следует рассмотреть значимость микробных протеиназ еще в одном плане. Поскольку при действии литических ферментов на микробную

жлетку в определенных условиях возможно образование протопластов или сферопластов, не исключена определенная роль литических протеиназ в эволюционном процессе прокариот и микроскопических грибов.]

ЛИТЕРАТУРА

1. Боровикова В. П., Аксеновская В. Е., Лавренова Г. И. и др.//Биохимия. 1980. Т. 45. Вып. 8. С. 1524.
2. Калеева Т. С., Рыженкова В. В., Кулаев И. С. и др.//Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. Вып. 6. С. 815.
3. Колтукова Н. В., Бондарчук А. А., Левитина Т. Л.//Прикл. биохимия и микробиология. 1985. Т. 21. Вып. 3. С. 361.
4. Павлова И. Н., Захарова И. Я., Квасников Е. И. и др.//Термофильные микроорганизмы в природе и практике народного хозяйства: Тез. докл. Всесоюз. конф. М., 1983. С. 104.
5. Руденская Г. Н., Гайда А. В., Остерман А. Л., Степанов В. М.//Биохимия и биофизика микроорганизмов. Горький, 1983. № 11. С. 36. 105.
6. Степанюк В. В., Квасников Е. И., Гавриленко М. Н., Сумневич В. Т.//Микробиол. журн. 1979. Т. 41. № 5. С. 456.
7. Anson M. L.//J. Gen. Physiol. 1938. V. 22. № 1. P. 45.
8. Brayer G. D., Delbaere L. T. J., James M. N. G.//J. Mol. Biol. 1979. V. 131. № 4. P. 743.
9. Cowan D. A., Daniel R. M.//Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 705. № 2. P. 293.
10. Funatsu M., Oh W., Aizono Y., Shimoda F.//Agric. Biol. Chem. 1978. V. 42. № 10. P. 1975.
11. Jackson R. L., Wolfe R. S.//J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 2. P. 879.
12. Keay L., Moser P. W., Wildi B. S.//Biotechnol. Bioeng. 1970. V. 12. № 2. P. 213.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.//J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265.
14. Obata I., Iwata W., Namba Y.//Agric. Biol. Chem. 1977. V. 41. № 12. P. 2387.
15. Ouchterlony O.//Acta Path. Microbiol. Scand. 1948. № 25. P. 186.
16. Smith E. L., Markland F. S., Kasper C. B. et al.//J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 24. P. 5974.
17. Whitaker D. E., Roy C., Tsai C. S., Jurašek L.//Canad. J. Biochem. 1965. V. 43. № 12. P. 1961.
18. Yoshimoto T., Tsuru D.//J. Biochem. (Tokyo). 1972. V. 72. № 2. P. 379.
19. Zuber H.//Biochem. Thermophiles/Ed. Friedman M. New York; San Francisco; London: Acad. Press, 1978. P. 267.

Институт микробиологии
и вирусологии АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
11.XII.1986

SERINE PROTEINASE WITH THE LYTIC ACTIVITY

*Pavlova I. N., Zholner L. G., Zakharova I. Ya., Tinyanova N. Z.,
Chestukhina G. G., Stepanov V. M.*

A thermophilic *Bacillus licheniformis* strain can synthesize extracellular serine proteinase, which is similar to subtilysine of the Carlsberg type in its amino acid composition, the specificity of its action, the character of its inhibition by certain compounds and immunochemical properties, but differs from the latter in its greater thermostability and in the ability to cause lysis of Gram-negative bacteria and yeast living cells.