

УДК 582.282.123.4:577.152.34

СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕАЗЫ — РЕГУЛЯТОРА ГЕМОСТАЗА, ОБРАЗУЕМОЙ МИКРОМИЦЕТОМ *Aspergillus tabacinus*

© 2024 г. В. Н. Лавренова^{1, *}, В. Г. Крейер¹, Ж. Савкович²,
А. А. Осмоловский¹

¹Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

²Биологический факультет Белградского университета, Белград, Республика Сербия
*e-mail: pkviktoria@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2023 г.

После доработки 05.08.2023 г.

Принята к публикации 03.09.2023 г.

Из культуральной жидкости микромицета *Aspergillus tabacinus* ВЕОФВ3260m выделена протеаза с протеин С-подобной и плазминоподобной активностями. Установлено, что фермент относится к группе сериновых протеаз, не гликозилирован, имеет молекулярную массу около 30 кДа. Протеаза активна и стабильна в диапазоне температур от 25–37°C и при pH 7–12. Выделенный фермент может быть перспективным кандидатом для разработки новых антикоагулянтных препаратов.

Ключевые слова: *Aspergillus tabacinus*, протеазы, фибринолитические ферменты, антикоагулянты, хромогенные пептидные субстраты

DOI: 10.31857/S0555109924010076, **EDN:** HCNICP

Гемостаз — это сложная многокомпонентная система, существующая для сохранения целостности сосудистого русла, предотвращения кровопотерь и поддержания крови в жидком состоянии. Одной из составляющих гемостаза является система коагуляции, представляющая собой каскад реакций, в которых взаимодействующие белки (факторы свертывания) последовательно активируют друг друга за счет конформационных изменений и/или частичного протеолиза. Результатом коагуляции является формирование тромба — фибринового сгустка, закупоривающего повреждение стенки сосуда. Различные нарушения этой системы могут привести к избыточному и/или несвоевременному формированию фибриновых сгустков, что, в свою очередь, может привести к тромбозам.

Большинство лекарственных средств, используемых для борьбы с тромбозами разного генеза, являются либо антикоагулянтами, то есть веществами, ингибирующими вторичный гемостаз и/или активирующими противосвертывающую систему (антитромбины, тромбомодулин, протеин С, протеин S и др.), либо фибринолитиками, то есть веществами, расщепляющими фибриновые сгустки и/или способствующими активации собственных тромболитических ферментов организма. Следует отметить, что превентивным противотромбозным эффектом обладают только антикоагулянты. Среди распространенных в медицинской практике антикоагулянтов следует выделить четыре группы:

гепарин и гепарин-подобные препараты, кумарины и индандионы — ингибиторы фактора свертывания Ха, ингибиторы тромбина. Все эти препараты имеют побочные эффекты в виде кровотечений, а использование гепаринов также может спровоцировать тромбоцитопению [1]. В связи с этим поиск новых антикоагулянтов, лишенных перечисленных выше побочных эффектов, является актуальной задачей как для фундаментальной науки, так и для фармакологии.

Перспективными продуцентами новых антикоагулянтов могут быть микроорганизмы [2], в том числе грибы-микромицеты, так как они секретируют во внешнюю среду множество гидролитических ферментов, включая протеазы. Протеазы с определенной субстратной специфичностью могут осуществлять ограниченный протеолиз и/или активацию компонентов каскада коагуляции, а также компонентов противосвертывающей системы, что может приводить к разным последствиям, в том числе и к противотромботическому действию. В последнее время ведутся активные исследования антикоагулянтных и фибринолитических ферментов представителей отделов Mucoromycota [3] и Ascomycota [4]. К примеру, в 2022 г. была впервые выделена протеаза аскомицета *Aspergillus versicolor*, проявляющая одновременно антикоагулянтные и фибринолитические свойства [5].

Цель данной работы — выделение и изучение свойств внеклеточной протеазы микромицета *Aspergillus tabacinus*, являющегося близким родственником *Aspergillus versicolor*, а также исследование потенциальных мишеней этой протеазы в системе гемостаза человека.

МЕТОДИКА

Условия культивирования продуцента. Глубинное культивирование микромицета *Aspergillus tabacinus* ВЕОFB3260m, полученного из коллекции Белградского университета (Республика Сербия), проводили в две стадии [6]. Для засева посевной среды гриб выращивали на скошенном сусло-агаре 7 сут при 25°C, споровую суспензию получали смывом с поверхности. Посевная среда имела следующий состав (%): сусло — 6.7, глюкоза — 1.0, пептон — 0.1, рН 5.5–6.0. Культивирование в посевной среде проводили в течение 48 ч при 28°C и постоянном перемешивании при 200 об./мин. Далее для индукции образования протеолитических ферментов 3% посевной среды переносили в среду для ферментации следующего состава (%): глюкоза — 3.5, крахмал — 1.0, гидролизат рыбной муки — 0.5, пептон — 0.5, NaCl — 0.2, K₂HPO₄ — 0.05, MgSO₄ — 0.05, рН 7.0–7.5. Культивирование в ферментационной среде проводили в течение 7 сут при 28°C и постоянном перемешивании при 200 об./мин.

Выделение и очистка протеазы. Для выделения фермента из культуральной жидкости, полученной после выращивания гриба и отделения мицелия, белки осаждали сульфатом аммония. Сульфат аммония добавляли постепенно до степени насыщения 80%. Через 48 ч инкубации при 4°C белковый осадок отделяли центрифугированием в течение 40 мин при 15000 g, ресуспендировали в 10 мл 0.005 М Трис-НСl буфера, рН 8.2, и проводили диализ против того же буфера в течение 36 ч с последовательными сменами буфера через каждые 12 ч. После диализа нерастворимые белки отделяли центрифугированием при том же режиме. Полученный супернатант лиофильно высушивали и хранили при –20°C.

Очистка протеазы из полученного лиофильного препарата была проведена методом изоэлектрофокусирования в градиенте рН амфолинов 2–12 и градиенте плотности сахарозы 0–40% при 4°C и напряжении 800 В в течение 36 ч [7, 8]. Для изоэлектрофокусирования использовали колонку объемом 110 мл (“LKB”, Швеция). В каждой фракции определяли рН, оптическую плотность при длине волны 280 нм, а также протеолитическую активность с использованием хромогенных пептидных субстратов тромбина Chromozum TH (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA) (“DiaPharma”, США) и активированного протеина С S-2366 (pGlu-Pro-Arg-pNA) (“DiaPharma”, США).

Электрофорез в денатурирующих условиях. Белковый состав фракций с наибольшей протеолитической активностью исследовали методом электрофореза в денатурирующих условиях по Лэммли [9]. Использовали маркеры молекулярных масс Unstained Protein Molecular Weight Marker (“Thermo Fisher Scientific”, США), гель окрашивали ацетатно-спиртовым раствором Кумасси R-250. Для удаления неспецифически сорбированного красителя использовали 7%-ный раствор уксусной кислоты.

Зимография. Для определения протеолитически активного компонента во фракции, представляющей смесь белков, использовали зимографию [10]. Для этого проводили электрофорез в денатурирующих условиях по методу Лэммли со следующими изменениями: в разделяющий гель добавляли казеин до конечной концентрации 0.2%, в качестве буфера для образцов использовали пятикратный буфер следующего состава: 0.5 М Трис-НСl, рН 6.8, 10% додецилсульфата натрия, 20% глицерина, 0.5% бромфенолового синего. Перед нанесением проб в гель не проводили их нагревание. После проведения электрофореза гель инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в 50 мМ Трис-НСl буфере, рН 7.0, содержащем 2.5%-ный Тритон-Х100. Далее отмывали гель в течение 30 мин в дистиллированной воде, после чего инкубировали в течение 12 ч при 37°C в 30 мМ Трис-НСl буфере, рН 7.0, содержащем 0.02% азида натрия. Окрашивание геля проводили так же, как и при проведении электрофореза по Лэммли.

Выявление гликозилирования в геле. Присутствие углеводного компонента в молекуле протеазы определяли при проведении денатурирующего электрофореза [11]. В течение 30 мин гель инкубировали в 50%-ном этаноле, а затем в течение 10 мин отмывали дистиллированной водой, после чего помещали гель на 30 минут в раствор, содержащий 1%-ную йодную и 3%-ную уксусную кислоты. Далее отмывали 30 мин в дистиллированной воде, 20 мин инкубировали в 0.1%-ном растворе метабисульфита натрия в 10 мМ НСl и инкубировали в течение 1 ч в темноте с реактивом Шиффа. После описанных процедур гель повторно помещали в 0.1%-ный раствор метабисульфита натрия в 10 мМ НСl на 1 ч, а затем в 0.5%-ный раствор метабисульфита натрия в 10 мМ НСl на 2 ч.

Определение протеолитической активности с хромогенными пептидными субстратами. Специфическую ферментативную активность культуральной жидкости и фракций после изоэлектрофокусирования определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм по накоплению *para*-нитроанилина после гидролиза различных хромогенных пептидных субстратов при 37°C [12]. К 100 мкл соответствующего субстрата с концентрацией 0.5 мг/мл, приготовленного в 0.05 М Трис-НСl

буфере, рН 8.2, прибавляли 50 мкл такого же буфера. Реакцию инициировали добавлением 200 мкл нужной фракции или культуральной жидкости. Через 5 мин реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Контролем служила проба, в которой реакцию останавливали сразу же после добавления к раствору субстрата фермента. За 1 ед. ферментативной активности принимали число мкмоль *para*-нитроанилина, образованного в 1 мл раствора за 1 мин.

Анализ субстратной специфичности. Для определения субстратной специфичности использовали следующие хромогенные пептидные субстраты [13]: субстрат плазмина — H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), фактора Ха — Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA (S-2222) и Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765), урокиназы — pGlu-Gly-Arg-pNA (S-2444), тромбина — Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH) и H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238), тканевого активатора пламиногена — H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288), активированного протеина С — pGlu-Pro-Arg-pNA (S-2366); а также хромогенные субстраты трипсина Bz-Arg-pNA и химотрипсина Ac-Phe-pNA и субстраты с разным сочетанием аминокислот в хромопептиде: Ac-Leu-Gly-Arg-pNA, Z-Ala-Ala-Met-Lys-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-Lys-pNA, For-Ala-Phe-Lys-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA.

Ингибиторный анализ. Для изучения ингибирования фермента использовали следующие растворы ингибиторов: ингибитор сериновых протеаз фенолметилсульфонилфторид в концентрации 0.3 мг/мл (PMSF), ингибиторы трипсин-подобных протеаз тозиллизилхлорметилкетон (TLCK, 0.4 мг/мл) и соевый ингибитор трипсина (1.1 мг/мл), ингибитор химотрипсин-подобных протеаз тозилфенилаланилхлорметилкетон (TPCK, 0.4 мг/мл), ингибитор цистеиновых протеаз пара-хлормеркурибензоат (СМВ, 0.5 мг/мл), ингибитор металлопротеаз ЭДТА (1.1 мг/мл). Фермент инкубировали с раствором ингибитора в течение 2 ч при комнатной температуре в молярном соотношении фермент: ингибитор 1 : 10 и 1 : 100 [14], далее проводили реакцию с субстратом S-2366 по методике, описанной выше. В качестве контроля использовали пробу, в которой фермент инкубировали в течение 2 ч в буферном растворе Трис-HCl, рН 8.2, без ингибитора. Ферментативную активность контрольной пробы принимали за 100%, активности в присутствии ингибиторов выражали в % относительно активности в контрольной пробе.

Определение оптимума активности фермента и его стабильности. Для исследования рН-оптимума использовали 0.4 М универсальный (натрий-ацетат-фосфат-боратный) буфер со значениями рН от 3.0 до 13.0. Определение активности по субстрату S-2366 проводили по методике, описанной выше, заменяя только буферный раствор в реакционной смеси. Для анализа стабильности

проводили двухчасовую инкубацию фермента в объеме 200 мкл с 50 мкл 0.1 М универсального буфера в пределах рН от 2.0 до 13.0 при 25°C, после чего добавляли 100 мкл субстрата S-2366 в концентрации 0.5 мг/мл в 0.5 М Трис-HCl буфере, рН 8.2. Реакцию проводили в течение 5 минут и останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Для определения температурного оптимума реакцию проводили при 25, 30, 37, 45, 55, 65°C. Для определения температурной стабильности проводили двухчасовую инкубацию фермента при указанных температурах, а затем проводили реакцию при 37°C по стандартной методике, описанной выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Секретируемую *A. tabacinus* ВЕОФВ3260m протеазу выделяли из культуральной жидкости, частично очищали с помощью осаждения сульфатом аммония, осажденные белки растворяли и диализовали, а затем лиофильно высушивали. Полученный препарат разделяли методом изоэлектрофокусирования. Протеолитическая активность культуральной жидкости до очистки составляла 83×10^{-3} Е по субстрату активированного протеина С S-2366 и 62×10^{-3} Е по субстрату тромбина Chromozym TH. Полученные значения превышали аналогичные для протеолитических ферментов 7 изученных ранее представителей рода *Aspergillus* [7], что делает протеазу *A. tabacinus* перспективным кандидатом для разработки антикоагулянтных препаратов с протеин С-подобной активностью.

После изоэлектрофокусирования была выявлена фракция с наибольшей активностью по отношению к субстратам S-2366 и Chromozym TH. Фракция соответствовала рН 2.9 и области наибольшей оптической плотности при 280 нм (рис. 1, фракции 1–3). Скорее всего, такие значения оптической плотности объясняются не высокой концентрацией белка во фракциях, а поглощением пигмента, присутствие которого было выявлено при визуализации фракций 1–3. Вероятнее всего, исследуемая протеаза *A. tabacinus* является пигмент-ассоциированным белком. Активность фракции 3 по субстрату S-2366 составила 81×10^{-3} Е, по субстрату Chromozym TH — 69×10^{-3} Е. По результатам изоэлектрофокусирования также был выявлен второй секретируемый протеолитический фермент, неактивный в отношении субстрата Chromozym TH, но активный в отношении S-2366 (рис. 1, фракция 11). Активность этой фракции по субстрату S-2366 составила 42×10^{-3} Е, что ниже, чем соответствующая активность фракции 3, поэтому для дальнейшей работы была выбрана более активная фракция.

Электрофорез фракции 3 по Лэммли выявил наличие в ней нескольких белков (рис. 2, дорожка 1). Для идентификации протеолитически активного

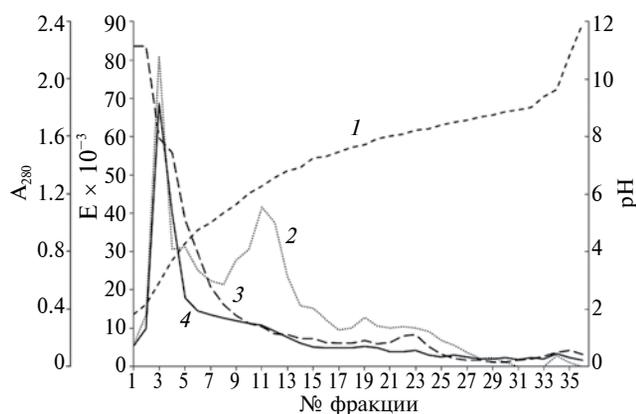


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков культуральной жидкости *A. tabacinus* ВЕОФВ3260м: 1 — pH, 2 — активность по отношению к субстрату S-2366 ($E \times 10^{-3}$), 3 — A_{280} , 4 — активность по отношению к субстрату Chromozym TH ($E \times 10^{-3}$).

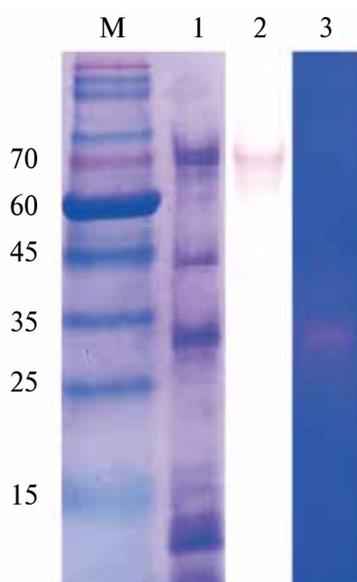


Рис. 2. Электрофоретический анализ внеклеточной протеазы *A. tabacinus* в ПААГ с ДСН-Na: М — метки; 1 — электрофореграмма по Лэммли; 2 — окраска на наличие углеводного компонента; 3 — казеиновая зимограмма.

компонента была выполнена казеиновая зимография (рис. 2, дорожка 3), по результатам которой во фракции была найдена единственная протеаза с молекулярной массой около 30 кДа. Так как фракция содержала только один протеолитически активный компонент, все дальнейшие исследования свойств ферментативного препарата проводилось именно с этой фракцией без дополнительной очистки. Выявление гликозилированных белков также проводилось после денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (рис 2, дорожка 2). Был идентифицирован только один высокомолекулярный гликозилированный белок,

не являющийся протеолитически активным. Отсутствие у протеазы *A. tabacinus* углеводного компонента сближает ее с другими внеклеточными протеазами, продуцируемыми представителями рода *Aspergillus* [15], а также делает ее перспективным кандидатом для разработки препаратов протеолитических ферментов, так как гетерологичная экспрессия негликозилированных белков является более экономически выгодной.

При анализе субстратной специфичности протеазы *A. tabacinus* было обнаружено, что фермент неактивен в отношении субстратов трипсин-(Bz-Arg-pNA) и химотрипсин-подобных (Ac-Phe-pNA) протеаз (табл. 1), однако проявлял высокую активность в отношении субстратов белков системы гемостаза: тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), протеина С (pGlu-Pro-Arg-pNA), плазмينا (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), фактора Ха (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA). Изучаемый фермент активно расщеплял субстраты, содержащие остаток аргинина в положениях P1 и остаток пролина в положениях P2. При этом замена аминокислотного остатка в положении P3 могла изменять уровень амидолитической активности более, чем в два раза. Другой группой предпочтительных для фермента субстратов были субстраты, содержащие остаток аргинина в положении P1 и остаток глицина в положении P2. В данном случае изменение аминокислотного остатка в положении P3 также сильно сказывалось на активности. Единственным активно расщепляемым субстратом, содержащим остаток лизина в P1, являлся H-D-Val-Leu-Lys-pNA. Субстраты, не содержащие в положении P1 остатков аргинина или лизина, протеазой *A. tabacinus* не гидролизировались.

Результаты ингибиторного анализа протеазы *A. tabacinus* во многом подтвердили эксперименты по изучению субстратной специфичности фермента. Так как протеаза микромицета активно расщепляла субстраты активированного протеина С, плазмина, тромбина и фактора Ха, можно предположить, что она относится к тому же классу, что и перечисленные белки, то есть к сериновым протеазам. Зависимое от дозы ингибирование фермента *A. tabacinus* соевым ингибитором трипсина подтвердило принадлежность изучаемого белка к сериновым протеазам (табл. 2), в то же время фермент не ингибировался классическими ингибиторами цистеиновых и металлопротеаз. Однако универсальный ингибитор сериновых протеаз PMSF не влиял на активность исследуемой протеазы. Возможно, это объясняется структурными особенностями активного центра фермента, так как известны представители сериновых протеаз, активность которых не подавляется PMSF [16, 17]. Вероятно, эти же структурные особенности активного центра объясняют нечувствительность фермента к другому ингибитору трипсин-подобных сериновых протеаз TLCK.

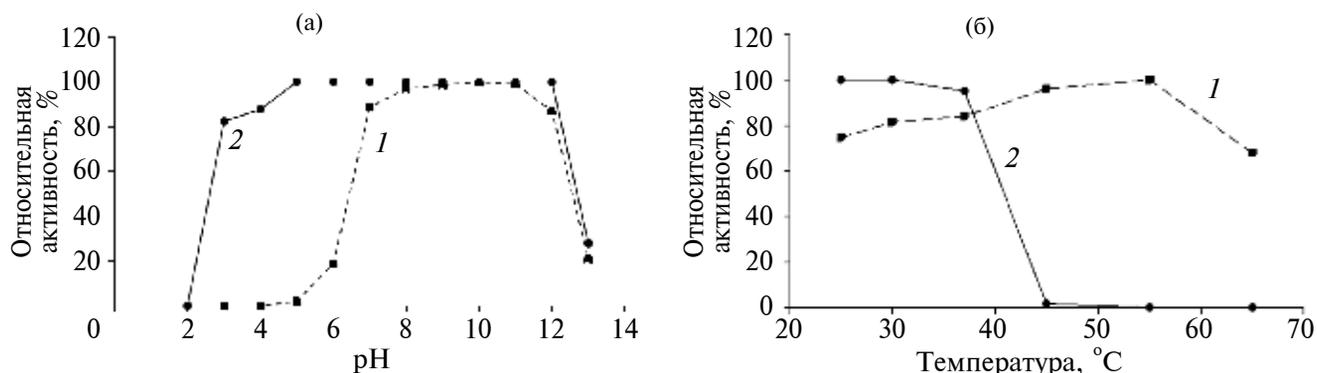


Рис. 3. Влияние pH (а) и температуры (б) на активность (1) и стабильность (2) протеазы *A. tabacinus* BEOFB3260m.

Таблица 1. Субстратная специфичность внеклеточной протеазы *A. tabacinus*

Субстрат	Амидолитическая активность, $E \times 10^{-3}$
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	69.0
pGlu-Pro-Arg-pNA	81.7
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	24.0
pGlu-Gly-Arg-pNA	33.8
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	61.6
Ac-Leu-Gly-Arg-pNA	84.1
Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA	9.0
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	11.1
Bz-Arg-pNA	1.5
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	75.4
Z-Ala-Ala-Met-Lys-pNA	2.1
Z-Ala-Ala-Phe-Lys-pNA	5.1
For-Ala-Phe-Lys-pNA	5.0
Z-Gly-Gly-Leu-pNA	2.2
Ac-Phe-pNA	1.5

При исследовании влияния pH реакционной смеси на стабильность и активность протеазы *A. tabacinus* по отношению к субстрату S-2366 было показано, что фермент стабилен в диапазоне pH от 3 до 12 и проявлял максимальную активность при pH 10 (рис. 3а). При значениях pH 8, 9 и 11 ферментативная активность снижалась не более, чем на 5% от максимальной, а при pH 7 и 12 не более, чем на 15%. Полученные результаты позволили предположить, что исследуемый фермент является щелочной протеазой, что также характерно для других протеаз, секретируемых микромицетами рода *Aspergillus* [18].

При исследовании влияния температуры на стабильность и активность протеазы *A. tabacinus* по отношению к субстрату S-2366 было показано, что фермент стабилен в диапазоне температур от 25 до 37°C и проявлял максимальную активность при температуре 55°C (рис. 3б). Сохранение высокой ферментативной активности при температуре тела

человека делает протеазу *A. tabacinus* перспективным кандидатом для разработки терапевтических препаратов. Максимальная активность фермента проявлялась при нефизиологических температурах, что было описано и для других протеаз микромицетов рода *Aspergillus* [19]. Следует отметить, что активность при прочих исследованных температурах (30, 37, 45°C) ниже, чем активность при 55°C, но не более чем на 20%.

Протеаза, выделенная из культуральной жидкости *A. tabacinus* BEOFB3260m, является высоко активным ферментом с протеин С-подобной активностью. Дефицит протеина С связан с тромбозами и другими патологиями гемостаза, так как этот белок является компонентом противосвертывающей системы. В связи с этим протеаза *A. tabacinus* может быть использована для разработки препаратов заместительной терапии при дефицитах протеина С. Более того, исследуемый фермент обладал также и плазминоподобной активностью, что может означать потенциальную способность протеазы к прямому лизису фибриновых сгустков. Таким

Таблица 2. Ингибиторный анализ протеазы *A. tabacinus*

Ингибитор	Молярное соотношение фермент: ингибитор	Относительная активность*, %
PMSF	1 : 10	100
	1 : 100	
Соевый ингибитор трипсина	1 : 10	34
	1 : 100	10
TLCK	1 : 10	100
	1 : 100	
TPCK	1 : 10	100
	1 : 100	
СМВ	1 : 10	100
	1 : 100	
ЭДТА	1 : 10	100
	1 : 100	

* За 100% принимали активность в отсутствие ингибиторов.

образом, изученный фермент, представляющий собой негликозилированную сериновую протеазу массой около 30 кДа, активную при температурах от 25 до 37°C и рН 7–12, может стать новым белковым регулятором системы гемостаза человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li T., Yuan D., Yuan J. // Adv. Exp. Med. Biol. 2020. V. 1177. P. 101–131.
2. Barzkar N., Jahromi S. T., Vianello F. // Mar. Drugs. 2022. V. 20. № 1. P. 46. <https://doi.org/10.3390/md20010046>
3. Zhang S., Wang Y., Zhang N., Sun Z., Shi Y., Cao X., Wang H. // Food Technol. Biotechnol. 2015. V. 53. № 2. P. 243–248.
4. Duan Y., Katrolia P., Zhong A., Kopparapu N. K. // Prep. Biochem. Biotechnol. 2022. V. 52. № 9. P. 1008–1018.
5. Zhao L., Lin X., Fu J., Zhang J., Tang W., He Z. // Mar. Drugs. 2022. V. 20. № 6. P. 356. <https://doi.org/10.3390/md20060356>
6. Батомункуева Б. П., Егоров Н. С. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 602–606.
7. Осмоловский А. А., Звонарева Е. С., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. С. // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 6. С. 688–694.
8. Звонарева Е. С., Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Котова И. Б., Егоров Н. С. // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41. № 5. С. 559–564.
9. Laemly U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
10. Hu Y., Yu D., Wang Z., Hou J., Tyagi R., Liang Y., Hu Y. // Scientific Reports. 2019. V. 9. № 9235. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45686-y>
11. Thornton D. J., Carlstedt I., Sheehan J. K. // Methods Mol. Biol. 1994. V. 32. P. 119–128.
12. Звонарева Е. С., Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Котова И. Б., Егоров Н. С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 2. С. 195–200.
13. Proteolytic Enzymes. A practical approach. / Ed. R. Beynon, J. S. Bond. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001. 340 p.
14. Biaggio R. T., Silva R. R., Rosa N. G., Leite R. S., Arantes E. C., Cabral T. P., Juliano M. A., Juliano L., Cabral H. // Prep. Biochem. Biotechnol. 2016. V. 46. № 3. P. 298–304.
15. Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Куряков А. В., Егоров Н. С. // Прикл. биохимия микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
16. Das A. K., Bellizzi J. J., Tandel S., Biehl E., Clardy J., Hofmann S. L. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 31. P. 23847–23851.
17. Richmond G. S., Smith T. K. // Biochem. J. 2007. V. 405. № 2. P. 319–329.
18. Chakrabarti S. K., Matsumura N., Ranu R. S. // Curr. Microbiol. 2000. V. 40. № 4. P. 239–244.
19. Звонарева Е. С., Осмоловский А. А., Баранова Н. А., Котова И. Б., Крейер В. Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2023. Т. 59. № 4. С. 369–375.

Properties of Extracellular Protease — Regulator of Hemostasis Produced by Micromycete *Aspergillus tabacinus*

V. N. Lavrenova^{a,*}, V. G. Kreyer^a, Z. Savkovic^b, and A. A. Osmolovskiy^a

^aFaculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bFaculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Republic of Serbia

*e-mail: pkviktoria@mail.ru

The extracellular protease with protein C-like and plasmin-like activities was isolated from the culture fluid of the micromycete *A. tabacinus* BEOFB3260m. It has been established that *A. tabacinus* extracellular protease is a non-glycosylated serine protease with mol. weight about 30 kDa. The enzyme is active and stable at temperature of 25–37°, active at pH 7.0–12.0 and stable at pH 3.0–12.0 and is a perspective candidate for new anticoagulant drugs development.

Keywords: *Aspergillus tabacinus*, proteases, fibrinolytic enzymes, anticoagulants, chromogenic peptide substrates