

УДК 577.152.344:582.282.123.4

СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *Aspergillus ustus* 1, ОБЛАДАЮЩЕЙ ВЫСОКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

© 2021 г. Е. А. Попова¹, В. Г. Крейер¹, С. К. Комаревцев², С. В. Шабунин², А. А. Осмоловский^{1, 2, *}

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

²Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, 394087 Россия

*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 27.06.2020 г.

После доработки 07.09.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Из комплекса белков, синтезируемых микромицетом *Aspergillus ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования, была выделена новая протеиназа, гидролизующая коллаген, эластин и фибрин. Показано, что фермент имел молекулярную массу 33 кДа и изоэлектрическую точку (*pI*) 4.6 и не содержал углеводных остатков. Ингибиторный анализ позволил отнести протеиназу к сериновому типу. Установлено, что рН–оптимум действия фермента ~рН 6.0, температурный оптимум – 41°C. Коллагенолитическая активность выделенной протеиназы *A. ustus* 1 в 1.46 раз превышала активность препарата протеиназ *A. terreicola* и была сопоставима с активностью препарата коллагеназы *Clostridium histolyticum*.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, активность по отношению к фибриллярным белкам, коллагенолитические ферменты, аспергиллы, твердофазное культивирование

DOI: 10.31857/S0555109921020124

На протяжении многих лет выявление и изучение новых продуцентов высокоактивных протеиназ остается важной задачей современной микробиологии. В связи с разнообразием сфер их использования сохраняется потребность в протеолитических ферментах с различными свойствами. Микромицеты имеют ряд важных преимуществ по сравнению с другими продуцентами таких ферментов, поскольку они способны образовывать комплекс протеиназ, проявляющих активность в широком диапазоне рН и температур. Так, ранее было показано, что микромицет *Aspergillus ustus* 1 способен синтезировать протеиназы, обладающие высокой коллагенолитической, фибринолитической и эластинолитической активностью [1]. Такие протеиназы широко применяются в фармацевтической [2], легкой [3] и пищевой [4] отраслях промышленности. Можно было предположить, что протеолитические ферменты, образуемые микромицетом *A. ustus* 1, окажутся более доступными по сравнению с аналогами, сохраняя при этом высокую активность.

Цель работы – выделение комплекса протеиназ, синтезируемых микромицетом *A. ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования, и изу-

чение свойств наиболее активного фермента, способного гидролизовать коллаген, фибрин и эластин.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования. Использовали штамм микромицета *A. ustus* 1, отобранный ранее в качестве продуцента протеиназ, обладающих коллагенолитической, фибринолитической и эластинолитической активностью [1]. Твердофазное культивирование проводили в культуральных флаконах Т-75 (“Eppendorf”, Германия) в статических условиях при 28°C. В качестве носителя использовали вермикулит, на 1 г которого добавляли 4.2 мл ферментационной среды следующего состава (%): глюкоза – 3.0, глицерин – 7.0, гидролизат рыбной муки – 0.5, NaNO₃ – 0.2, KH₂PO₄ – 0.05 и MgSO₄ – 0.05. Инокулирование осуществляли 1 мл суспензии спор с поверхностной культуры микромицета в 0.0001%-ном растворе Твин-80. По окончании культивирования в культуральные флаконы добавляли 20 мл 0.05 М Na-ацетатного буфера, рН 5.5, и инкубировали при перемешивании на

орбитальной качалке (200 об./мин) в течение 30 мин. Культуральную жидкость отделяли фильтрованием через фильтровальную бумагу (“ФС”, Россия).

Выделение и фракционирование комплекса протеиназ микромицета *A. ustus* 1. Внеклеточные белки микромицета получали осаждением сульфатом аммония (608 г на 1 л культуральной жидкости). Осадок белков отделяли центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин при 4°C, растворяли в 0.01 М Na-ацетатном буфере, pH 5.5, диализовали в диализных трубках против этого же буфера в течение 12 ч при 4°C и лиофильно высушивали.

Полученные белки фракционировали методом изоэлектрофокусирования в течение 36 ч в колонке объемом 110 мл (“ЛКВ”, Швеция) в градиенте pH 2.5–10 (амфолинов) и плотности сахарозы 0–40% при напряжении 800 В [5]. Содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1.5 мл, в каждой из которых определяли pH, содержание белка (при 280 нм) и протеолитическую активность.

Определение протеолитической активности. Определяли общую протеолитическую, коллагенолитическую, фибринолитическую и эластинолитическую активность.

Общую протеолитическую (казеинолитическую) активность определяли модифицированным методом Ансона–Хагихары по гидролизу 1%-ного раствора казеина по Хаммерштайну в 0.1 М Na-ацетатном буфере, pH 5.5, в течение 10 мин при 37°C, как описано ранее [6]. Активность рассчитывали по количеству тирозина в продуктах протеолиза, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Оптическую плотность определяли спектрофотометрически при 275 нм и рассчитывали количество высвободившегося тирозина в пробе. Активность выражали в мкмольх тирозина, освобожденного за мин ($E_{\text{Тир}}$).

Фибринолитическую активность определяли аналогично общей протеолитической активности при гидролизе 1%-ной суспензии бычьего фибрина в 0.1 М Na-ацетатном буфере, pH 5.5, в течение 30 мин при 37°C [6, 7]. Активность выражали в $E_{\text{Тир}}$.

Коллагенолитическую активность определяли с использованием в качестве субстрата суспензии азоколлаген (2 мг/мл) по общепринятой методике [8, 9]. Активность выражали в мкг азоколлагена, расщепившегося в течение 1 мин ($E_{\text{Азк}}$).

Эластинолитическую активность определяли по расщеплению Suc-Ala-Ala-Ala-pNA (0.05%-ный раствор), являющегося хромогенным пептидным субстратом эластазы, по общепринятой методике [1, 10] при pH 5.5 и 37°C. Активность выражали в мкмольх *n*-нитроанилина в мин ($E_{\text{пНА}}$), содержание которого устанавливали спектрофотометри-

чески при 405 нм на спектрофотометре Bio-Spectrometer kinetic (“Eppendorf”, Германия).

Аналогичным способом определяли активность по отношению к другим хромогенным субстратам, таким как p-Glu-Pro-Arg-pNA (субстрат активированного протеина C), Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (субстрат тромбина), H-D-Val-Leu-Lys-pNA (плазмина), H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (тканевого активатора плазминогена), p-Glu-Gly-Arg-pNA (субстрат урокиназы), Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (Ха-фактора), Ac-Phe-pNA (химотрипсина), Bz-Arg-pNA (трипсина) и Z-Ala-Ala-Leu-pNA (субтилизина).

Гидролиз осуществляли при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 (“BioSan”, Латвия). Опыты проводили в трех повторностях. Приведенные результаты представляли собой средние значения, ошибка которых не превышала 5–7%.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ). Нативный электрофорез в ПААГ проводили по методу Дэвиса в трис-глициновом буфере, pH 8.3 [11]. Денатурирующий электрофорез проводили в ПААГ по методу Лэммли с изменениями при силе тока 50 мА [12].

Ингибиторный анализ. Ингибиторный анализ осуществляли как описано ранее [13], используя ингибиторы металлопротеиназ (этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и *o*-фенантролин), а также цистеиновых (пара-хлормеркурийбензоат, *n*-ХМБ) и сериновых (фенилметилсульфонилфторид, ФМСФ) протеиназ в молярном соотношении фермент : ингибитор 1 : 10 и 1 : 100. Остаточную активность фермента определяли при 37°C после его прединкубации с ингибитором в течение 90 мин при 25°C, используя в качестве субстрата азоколлаген. Активность выражали в процентах от контроля.

Определение углеводного компонента в молекуле протеиназы. Для выявления содержания углеводного компонента в молекуле выделенной протеиназы проводили качественную реакцию с периодной кислотой и реактивом Шиффа (фуксинсернистая кислота) методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах [14]. В качестве положительного контроля использовали раствор 0.5 мг/мл внеклеточной дрожжевой инвертазы, а в качестве отрицательного – 0.5 мг/мл БСА.

Определение pH-оптимума действия и pH-стабильности протеиназы. Зависимость активности протеиназы от pH определяли в 0.4 М универсальном (натрий-ацетат-фосфат-боратном) буфере, pH от 4.0 до 7.0. К 150 мкл буфера с соответствующим значением pH добавляли 100 мкл пробы фермента и 100 мкл суспензии азоколлагена (2 мг/мл). Для определения стабильности фермента при различных значениях pH его инкубировали в течение 2 ч в 0.4 М универсальном буфере с различными значениями pH (от 4.0 до 10.0)

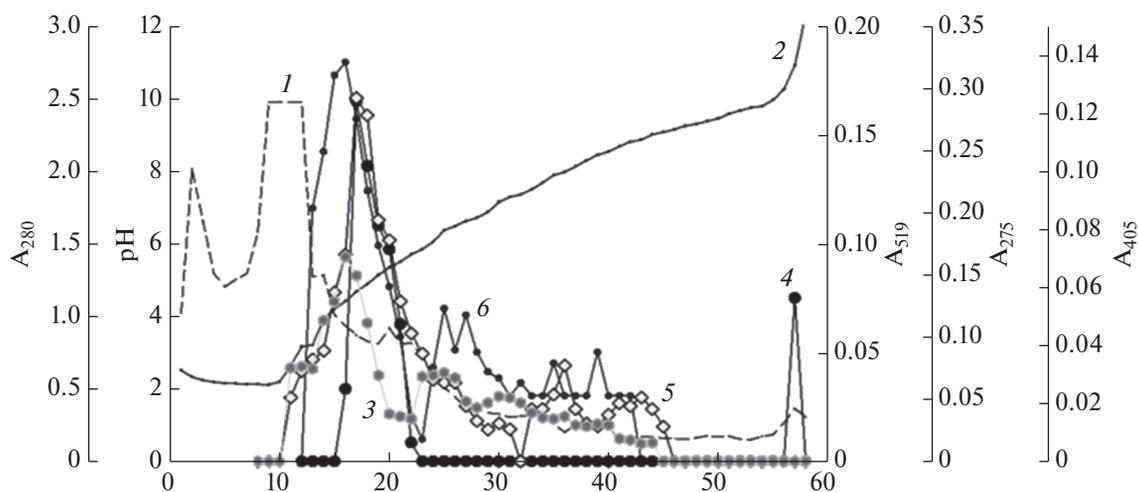


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков в культуральной жидкости *A. ustus* 1: A_{280} (1), pH (2), казеинолитическая (3), фибринолитическая (4), эластинолитическая (5) и коллагенолитическая (6) активность.

при 37°C и измеряли остаточную активность. Полученные результаты выражали в % от исходной активности.

Определение температурного оптимума активности и термостабильности протеиназы. Температурный оптимум действия протеиназы при гидролизе коллагена определяли в 0.05M трис-HCl-буфере, pH 8.2, в диапазоне от 20 до 55°C.

Термостабильность фермента изучали после его инкубации в течение 2 ч при заданных температурах (от 24 до 65°C). Полученные результаты выражали в % остаточной активности от исходной.

Сравнение протеиназы *A. ustus* 1 с протеиназами других микромицетов. Для сравнения коллагенолитической активности протеиназ, секретируемых *A. ustus* 1 и *A. terricola*, проводили гидролиз нативного бычьего коллагена в течение 5 ч при 37°C. Для этого к 7.0 мкл каждого фермента (1 мг белка/мл) добавляли 343 мкл суспензии коллагена (2 мг/мл) и инкубировали в течение 5 ч при 37°C. Реакцию останавливали 350 мкл 0.05 M трис-HCl буфера, pH 8.2, содержащего 12% полиэтиленгликоля 6000 (PEG 6000) и 25 мкМ ЭДТА, и нингидринового реагента. Затем смесь нагревали в течение 10 мин до 80°C. После охлаждения добавляли 500 мкл бидистиллированной воды и измеряли оптическую плотность при 570 нм [15]. Для расчета коллагенолитической активности строили калибровочную кривую по L-лейцину. Активность выражали в единицах (ед.) высвобождения из коллагена (CDU). Одна ед. CDU высвобождала из коллагена (бычий, нативный из ахиллового сухожилия) пептиды, в количестве, эквивалентном 1.0 мкмоль L-лейцина в течение 5 ч при pH 7.4 и 37°C (после окраски нингидрином).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение внеклеточных протеиназ микромицета *A. ustus* 1, активных по отношению к фибриллярным белкам, показало их перспективность для потенциального практического применения. Полученный комплексный препарат внеклеточных белков *A. ustus* 1 обладал как казеинолитической активностью, которая составляла 33.9 $E_{\text{тир}}/\text{мг}$ белка, так и коллагенолитической активностью — 16.8 $E_{\text{азк}}/\text{мг}$ белка $\times 10^{-3}$. В результате проведения изоэлектрофокусирования полученных внеклеточных белков было обнаружено несколько групп протеолитически активных фракций, концентрирующихся при различных значениях pH, что свидетельствовало о присутствии нескольких ферментов. Так, фракции, обладающие наибольшей фибринолитической, коллагенолитической, казеинолитической и эластинолитической активностью, концентрировались в одной фракции при pH 4.5–4.7 (рис. 1). Можно предположить, что в этой фракции присутствовала основная протеиназа, которая имела изоэлектрическую точку (pI) 4.6. В диапазоне pH 6.3–6.6 концентрировалась фракция, обладающая коллагенолитической, казеинолитической и эластинолитической активностью, при pH 7.5–7.8 — фракция с коллагенолитической и эластинолитической активностью, а при pH 8.2–8.4 — фракция, которая проявляла только коллагенолитическую активность. Однако уровень активности в этих фракциях оказался существенно ниже (рис. 1).

Были изучены свойства выделенной основной протеазы. Результаты электрофореза в ПААГ по Лэммли в присутствии ДС-Na представлены на рис. 2. Аналогичные результаты были получены при нативном электрофорезе в ПААГ по Дэвису

(данные не представлены). Полученные результаты свидетельствовали о гомогенности выделенного фермента, который характеризовался молекулярной массой ~33 кДа.

В дальнейших экспериментах по установлению физико-химических свойств выделенной протеиназы использовали определение ее коллагенолитической активности.

Ингибиторный анализ внеклеточной протеиназы *A. ustus* 1 показал, что ее коллагенолитическая активность практически полностью ингибировалась ФМСФ, в то время как другие использованные ингибиторы не влияли на ее активность (табл. 1). Полученные результаты позволили отнести выделенный фермент к группе сериновых протеиназ.

В результате изучения влияния температуры на коллагенолитическую активность протеиназы *A. ustus* 1 было показано, что оптимальная активность проявлялась при 41°C (рис. 3). Следует отметить, что более 80% коллагенолитической активности сохранялось в достаточно широком диапазоне температур от 39 до 55°C. Также было показано, что протеиназа сохраняла 100% коллагенолитической активности при инкубации в течение 2 ч при температурах от 24 до 45°C (рис. 3).

Изучение оптимального pH для проявления активности протеиназы *A. ustus* 1 показало, что наибольшая коллагенолитическая активность фермента была обнаружена при pH 6.0 (рис. 3). Фермент сохранял 100% активности в диапазоне pH от 5.0 до 8.0 и терял 26.6% активности при pH 9.0. При этом более 75% активности сохранялось в пределах от pH 5.5 до 6.5. При pH 4.0 и 10.0 активность составляла менее 30% от максимальной (рис. 3).

Определение содержания гликопротеинов в молекуле протеиназы *A. ustus* 1 показало, что фермент не гликозилирован (рис. 4), что позволяет в будущем рассматривать возможность его клонирования и экспрессии в прокариотических системах. На рис. 5 представлены результаты определения активности протеиназы *A. ustus* 1 при гидролизе хромогенных пептидных субстратов активированного протеина С, тромбина, плазмина, тканевого активатора плазминогена, урокиназы, Ха-фактора и трипсина. Видно, что наивысшую активность, равную $29.9 E_{pNA}/мл \times 10^{-3}$, фермент проявлял при гидролизе субстрата тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA). Следует отметить также, что протеиназа *A. ustus* 1 преимущественно гидролизовала субстраты, содержащие остаток основной аминокислоты в положении P1, кроме того активность зависела от длины пептида.

Свойства новой внеклеточной протеиназы, выделенной из комплекса внеклеточных белков микромицета *A. ustus* 1, сходны со свойствами некоторых протеиназ, синтезируемых другими ви-

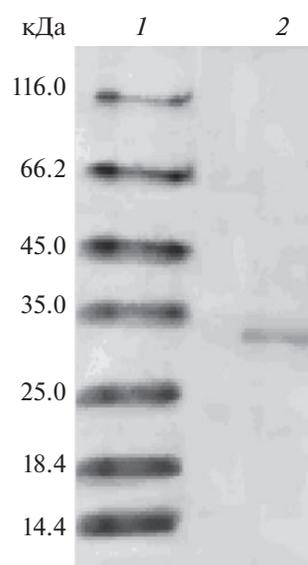


Рис. 2. Электрофорез по Лэммли в присутствии ДДС-Na внеклеточной протеиназы *A. ustus* 1 (1) и белков-маркеров (2) молекулярной массы: бета-галактозидаза (116 кДа), БСА (66.2 кДа), овальбумин (45 кДа), лактатдегидрогеназа (35 кДа), эндонуклеаза рестрикции Bsp981 (25 кДа), бета-лактоглобулин (18.4 кДа) и лизоцим (14.4 кДа).

дами рода *Aspergillus* (табл. 2), но отличались более широким спектром расщепляемых субстратов, включая такие, как фибрин и эластин. Эта особенность может быть востребована, например, при производстве белковых кормовых добавок, поскольку позволит снизить затраты на их ферментативную обработку.

Для сравнения коллагенолитической активности протеиназы *A. ustus* 1 и *A. terreicola*, входящей в

Таблица 1. Ингибиторный анализ внеклеточной протеиназы *A. ustus* 1

Ингибитор	Молярное соотношение фермент : ингибитор	Остаточная активность, %
Контроль (без ингибитора)	-	100.0
ЭДТА	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
n-ХМБ	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
o-фенантролин	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
ФМСФ	1 : 10	3.7
	1 : 100	4.0

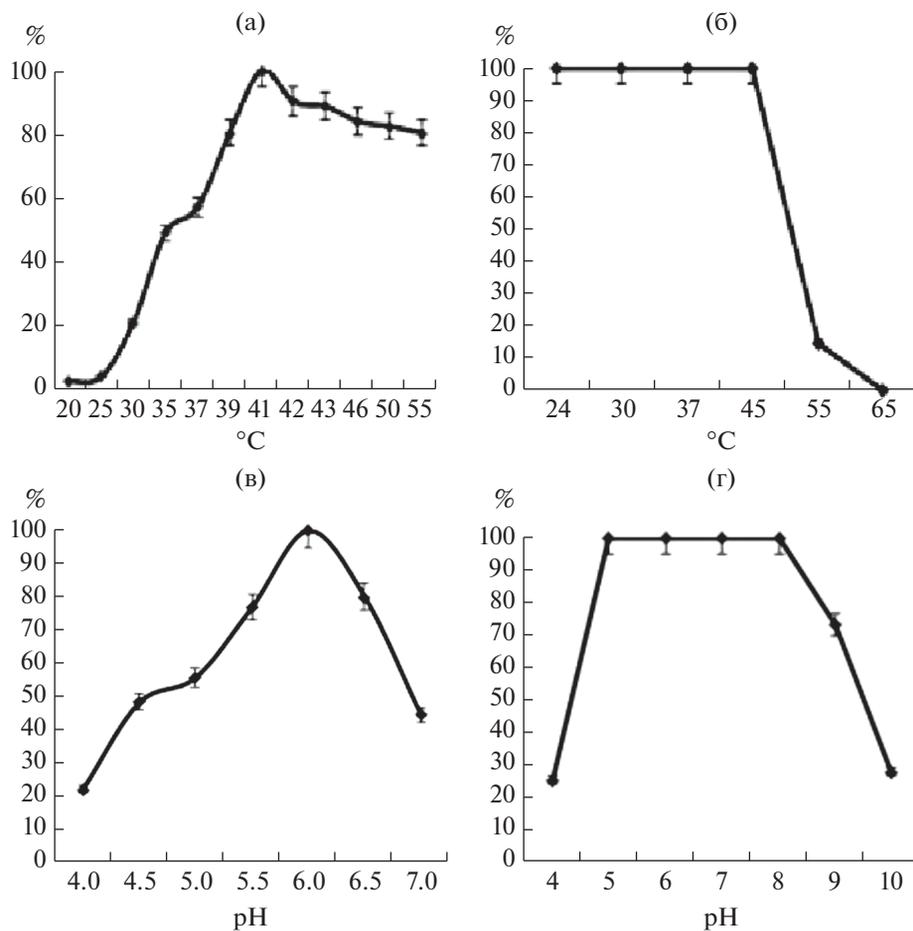


Рис. 3. Активность (а, в) и стабильность (б, г) протеиназы *A. ustus* 1 при различных температурах (а, б) и рН (в, г).

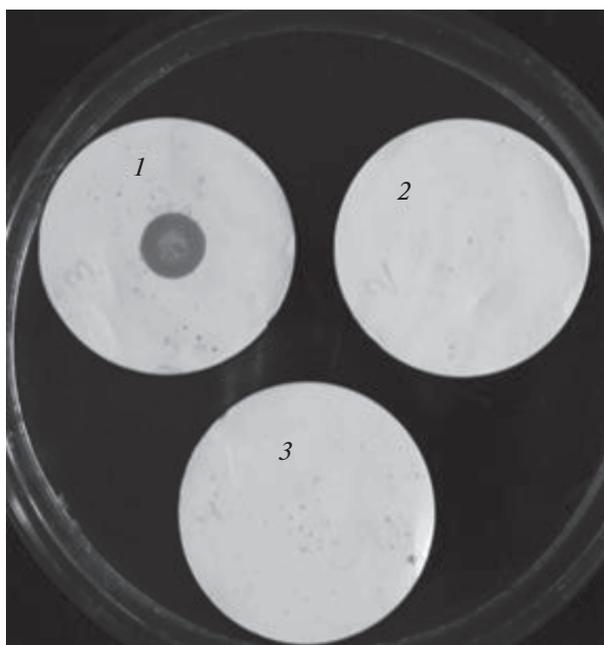


Рис. 4. Определение с ШИК-реактивом методом дот-блоттинга гликопротеинов в молекулах протеиназы *A. ustus* 1 (3), инвертазы (1, положительный контроль) и БСА (2, отрицательный контроль).

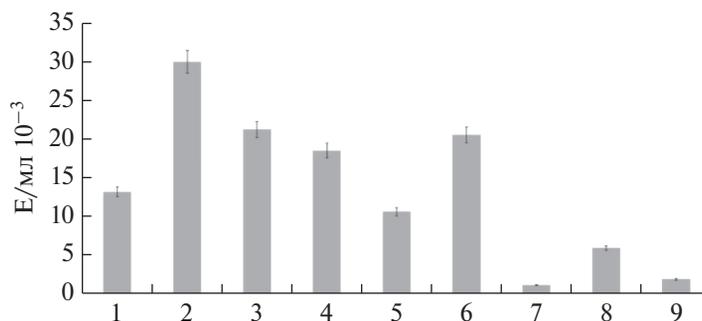


Рис. 5. Активность протеиназы *A. ustus* 1 по отношению к хромогенным субстратам, 1 – p-Glu-Pro-Arg-pNA (субстрат активированного протеина C), 2 – Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (тромбина), 3 – H-D-Val-Leu-Lys-pNA (плазмина), 4 – H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (тканевого активатора плазминогена), 5 – p-Glu-Gly-Arg-pNA (урокиназы), 6 – Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (Ха-фактора), 7 – Ac-Phe-pNA (химотрипсина), 8 – Bz-Arg-pNA (трипсина), 9 – Z-Ala-Ala-Leu-pNA (субтилизина).

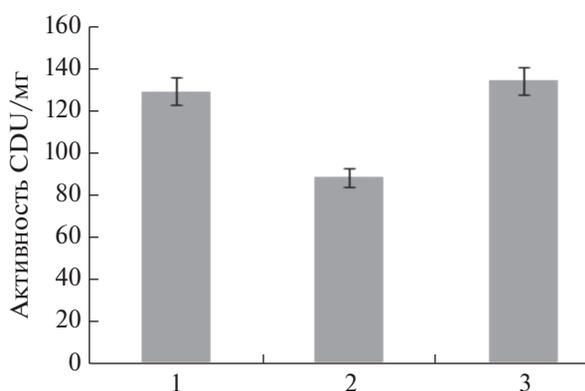


Рис. 6. Сравнение коллагенолитической активности протеиназы *A. ustus* 1 (1), препарата “Террилитин” (2) и коммерческой коллагеназы *C. histolyticum* (3).

качестве действующее вещества в состав коммерческого коллагенолитического противоожогового препарата “Террилитин”, нативный бычий коллаген гидролизовали в течение 5 ч этими ферментами. Результаты данного эксперимента

представлены на рис. 6. Как видно на гистограмме, коллагенолитическая активность протеиназы *A. ustus* 1 не только в 1.46 раз превышала активность протеиназы *A. terricola*, но и была сопоставима с активностью коллагеназы *Clostridium histolyticum* (“Sigma-Aldrich”, США). Полученные данные позволили рассматривать протеиназу *A. ustus* 1 в качестве основы для разработки более активных и простых в получении ферментных препаратов, способных стать полноценной альтернативой уже имеющимся препаратам противоожогового действия.

Таким образом, было установлено, что высокоактивный при гидролизе фибриллярных белков внеклеточный фермент, синтезируемый микромицетом *A. ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования, представлял собой негликозилированную сериновую протеиназу с молекулярной массой 33 кДа и *pI* 4.6, которая характеризовалась проявлением максимальной активности при pH 6.0 и 41°C.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 20-16-00085).

Таблица 2. Сравнение свойств протеиназы *A.ustus* 1 и протеиназ других аспергиллов

Продуцент	pH- и температурный оптимум действия фермента	Молекулярная масса, кДа	Действие ингибиторов	Гидролизуемые субстраты	Источник
<i>Aspergillus oryzae</i>	pH 7.0; 55°C	43	ФМСФ	Казеин	[16]
<i>Aspergillus</i> sp. (UCP 1276)	pH 8.0; 40°C	28.7	ФМСФ	Казеин, кератин, коллаген	[17]
<i>Aspergillus ustus</i> 1	pH 6.0; 41°C	33	ФМСФ	Казеин, коллаген, фибрин, эластин	Настоящая работа

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А.П. и С.К.К. – получение и обработка результатов, написание статьи, В.Г.К. и С.В.Ш. – анализ и обсуждение результатов, А.А.О. – концептуализация работы, участие в написании статей, общее руководство работой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попова Е.А., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Котова И.Б., Егоров Н.С. // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 4. С. 229–235.
2. Erdevе O., Atasay B., Arsan S. // Ped. Dermatol. 2007. V. 24. № 2. P. 195–196.
3. Bhagwat P.K., Dandge P.B. // Biocat. Agric. Biotechnol. 2018. V. 15. P. 43–55.
4. Thapa S., Li H., OHair J., Bhatti S., Chen F.-C., Al Nasr K., Johnson T., Zhou S. // Mol. Biotechnol. 2019. V. 61. № 2. P. 579–601.
5. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 6. С. 580–586
6. Осмоловский А.А., Попова Е.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Вестник Московского университета. 2016. Т. 71. № 1. P. 71–76.
7. Осмоловский А.А., Рукавицына Е.Д., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Микробиология. 2017. V. 86. № 4. P. 504–509.
8. Chavira Jr.R., Burnett T.J., Hageman J.H. // Anal. Biochem. 1984. V. 136. № 2. P. 446–450.
9. Шаркова Т.С., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 316–322.
10. Bieth J., Wermuth C.G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. V. 53. № 2. P. 383–390.
11. Davis B.J. // Ann. N.Y. Ac. Sci. 1964. V. 121. № 2. P. 404–427.
12. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
13. Крейер В.Г., Руденская Г.Н., Ландау Н.С., Покровская С.С., Степанов В.М., Егоров Н.С. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 8. С. 1365–1373.
14. Thronton D.J., Carlstadt I., Sheehan J.K. // Mol. Biotechnol. 1996. V. 5. № 2. P. 171–176.
15. Zhang Y., Fu Y., Zhou S., Kang L., Li C. // Anal. Biochem. 2013. V. 437. № 1. P. 46–48.
16. Ao X.L., Yu X., Wu D.T., Li C., Zhang T., Liu S.L., Chen S.J., He L., Zhou K., Zou L.K. // AMB Exp. 2018. V. 8. № 1. P. 1–10.
17. Ferreira C.M.O., Correia P.C., Brandão-Costa R.M.P., Albuquerque W.W.C., Lin Liu T.P.S., Campos-Takaki G.M., Porto A.L.F. // Biomed. Chromatogr. 2017. V. 31. № 5. P. e3882.

Properties of a Highly Active Extracellular Proteins for Fibrillary Proteins Produced by Micromycete *Aspergillus ustus* 1

Е. А. Popova^a, V. G. Kreyer^a, S. K. Komarevtsev^b, S. V. Shabunin^b, and A. A. Osmolovskiy^{a, b, *}

^aFaculty of Biology, Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, 119234 Russia

^bFederal State Budgetary Scientific Institution “All-Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy”, Voronezh, 394087 Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

A new non-glycosylated serine proteinase capable of hydrolysis of collagen, elastin, and fibrin was isolated from a complex preparation of proteins formed by *A. ustus* 1 micromycete under solid-phase cultivation conditions. The enzyme had a molecular weight of 33 kDa and a *pI* of 4.6. Also, the pH-optimum (6.0) and temperature optimum (41°C) of the work of this proteinase were determined.

Keywords: enzymes highly active in relation to fibrillar proteins, collagenolytic enzymes, proteinases of micromycetes