

УДК 582.282.123.4:577.152.34

СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ – АКТИВАТОРА ПРЕКАЛЛИКРЕИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ, ОБРАЗУЕМОЙ МИКРОМИЦЕТОМ *Aspergillus terreus* 2

© 2023 г. Е. С. Звонарева¹, А. А. Осмоловский¹, *, Н. А. Баранова¹, И. Б. Котова¹, В. Г. Крейер¹

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

*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 17.01.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Из культуральной жидкости микромицета *A. terreus* 2 выделена внеклеточная протеиназа – активатор прекалликреина плазмы крови человека, изучены физико-химические, кинетические и биохимические свойства. Установлено, что внеклеточная протеиназа *A. terreus* 2 представляла собой сериновую гликозилированную протеиназу с изоэлектрической точкой 4.6, молекулярной массой ~37 кДа и оптимумом pH для проявления активности 10.0 и температуры 37°C. По ряду свойств выделенная протеиназа сходна с протеиназой-активатором протеина С, синтезируемой микромицетом *A. ochraceus* L-1.

Ключевые слова: активаторы прекалликреина, протеиназы микромицетов, препаративное изоэлектрофокусирование, *Aspergillus terreus*

DOI: 10.31857/S0555109923040207, EDN: QZVABD

В последнее время микроскопические грибы различных видов изучаются как продуценты протеолитических ферментов, способных воздействовать на белки системы гемостаза человека, проявляющих как фибринолитическое, так и активаторное по отношению к факторам свертывания крови действие [1–4]. Наиболее перспективными микромицетами считаются представители рода *Aspergillus*, некоторые протеиназы которых отличаются выраженностью определенных типов активности, оптимальными параметрами активности при физиологических показателях (pH 7–8, 37–40°C), относительной простотой очистки. Среди известных протеиназ аспергиллов известны активаторы таких проферментов плазмы крови как протеина С, фактора X и прекалликреина [5–7]. Ввиду ключевой роли этих белков в формировании тромбов и регуляции этого процесса, разработаны тест-системы на основе протеиназ яда змей, которые используются в диагностике этих белков [8]. Протеиназы аспергиллов, активирующих протеин С и фактор X, активно изучаются [9, 10], в то время как их свойства в качестве активаторов прекалликреина еще не описаны. Одним из известных продуцентов таких протеиназ является микромицет *Aspergillus terreus* 2 [11–13].

Для штаммов вида *A. terreus* известно образование протеиназ, различающихся по субстратной

специфичности и оптимумам pH-активности и термоактивности [14–16].

Ранее были изучены условия глубинного культивирования микромицета *A. terreus* 2 для увеличения секреции протеиназ с плазминоподобной и активирующей прекалликреин активностью. Наибольшая секреция протеиназ достигалась при выращивании микромицета, а также было показана их способность гидролизовать в равной степени фибрин и фибриноген [13, 17].

Цель работы – выделение и изучение свойств внеклеточной протеиназы микромицета *A. terreus* 2.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования. В работе использовали штамм микромицета *A. terreus* 2, отобранный в результате предыдущей работы в качестве продуцента протеиназ – активаторов прекалликреина плазмы крови человека [13].

Для получения посевного материала с поверхности культуры микромицета, выращенной в пробирках на скошенном сусло-агаре в течение 7 сут при 25°C, проводили смыв спор в качалочные колбы емкостью 750 со 100 мл питательной среды с суслом, глюкозой и пептоном [18]. Через 2 сут выращивания в термостатированном шейкере инкубаторе (ES-20/80, “Biosan”, Латвия) при 28°C и 200

об./мин, часть биомассы переносили в ферментационную среду следующего состава (%): глюкоза — 3.0, глицерин — 7.0, гидролизат рыбной муки — 0.5, NaNO_3 — 0.2, KH_2PO_4 — 0.05, MgSO_4 — 0.05, pH 5.5 [13]. Культивирование микроцета продолжали при тех же условиях в течение 5 сут.

Выделение протеиназы — активатора прекалликреина. Протеиназу выделяли из 1 л фильтрата культуральной жидкости (КЖ) осаждением белков сульфатом аммония при степени насыщения 0.8 на холоду в течение 12 ч, центрифугированием полученного осадка и его последующим диализом в диализных мешках против 0.0001 М Трис-HCl-буфера, pH 8.2. Полученный после диализа раствор лиофильно высушивали. Фракционирование белков полученного препарата осуществляли препаративным изоэлектрофокусированием при 4°C в градиенте pH амфолинов 2.5–5.0 и градиенте плотности сахарозы 0–40% в колонке объемом 110 мл (“LKB”, Швеция) при напряжении 800 В в течение 36 ч [11, 12]. Во фракциях, полученных с колонки, определяли pH, поглощение при 280 нм и протеолитическую активность. Чистоту протеиназы определяли с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ с Na-ДДС по методу Лэммли.

Для определения молекулярной массы фермента использовали набор метчиков Unstained Protein Molecular Weight Marker (“Thermoscientific”, США). Окрашивание геля осуществляли ацетатно-спиртовым раствором Кумасси бриллиантового синего R-250. Для отмывки геля от красителя использовали 7%-ную уксусную кислоту.

Определение белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм в кювете с длиной пути в 1 см [19].

Определение активности протеиназы *A. terreus* 2. Протеолитическую активность определяли по расщеплению хромогенного пептидного субстрата плазмина — H-D-валил-L-лейцил-L-лизин-п-нитроанилида (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), как описано ранее [13]. Активаторную к прекалликреину активность определяли по расщеплению хромогенного пептидного субстрата H-D-пролил-L-фенилаланил-L-аргинин-п-нитроанилида (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA) после предварительной инкубации пробы с плазмой человека как писано в работе [13].

За 1 единицу активности (Е) принимали количество мкмоль *p*-нитроанилина, образующегося в результате гидролиза в 1 мл пробы за 1 мин. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм на спектрофотометре Hitachi 200-20 (“Hitachi”, Япония).

Выявление углеводного компонента протеиназы. Углеводный компонент в составе выделенной протеиназы определяли с использованием периодной кислоты и реактива Шиффа (фуксинсернистой кислоты) методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах [20]. В качестве положитель-

ного контроля на реакцию использовали раствор внеклеточной дрожжевой инвертазы, в качестве отрицательного — БСА, в концентрациях 0.5 мг/мл.

Определение субстратной специфичности. Субстратную специфичность протеиназы определяли по гидролизу хромогенных пептидных субстратов — пара-нитроанилидов, расщепляемых протеиназами системы гемостаза: плазмина — H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), Ха фактора — 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 тканевого активатора плазминогена — H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288); а также хромогенные субстраты трипсина Bz-Arg-pNA, химотрипсина Ac-Phe-pNA и субтилизина Z-Ala-Ala-Leu-pNA, использовали субстраты с разным сочетанием аминокислот в хромопептиде: Ac-Leu-Gly-Arg-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA, pGlu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA, Suc-Ala-Ala-Ala-pNA и Ac-Leu-Tyr-pNA. Реакции с данными субстратами проводили по методике определения активности как описано выше.

Изучение действия ингибиторов протеиназ. Использовали ингибиторы: ЭДТА (1.1 мг/мл) и *o*-фенантролин (0.5 мг/мл) — ингибиторы металлопротеиназ; *n*-ХМБ (0.5 мг/мл) — ингибитор цистеиновых протеиназ; PMSF (фенилметилсульфонил фторид, 0.3 мг/мл) — ингибитор сериновых протеиназ; TPCK (тозилфенилаланилхлорметилкетон, 0.4 мг/мл) — ингибитор химотрипсиноподобных протеиназ; TLCK (тозиллизинхлорметилкетон, 0.4 мг/мл) и соевый ингибитор трипсина (1.1 мг/мл) — ингибиторы трипсиноподобных протеиназ. Действие ингибиторов исследовали в молярном соотношении фермент : ингибитор 1 : 10 и 1 : 100 [15]. Начальную и остаточную протеолитическую активности фермента определяли при 37°C как описано выше после предынкубации фермента с ингибитором в течение 60–120 мин при 25°C и выражали в процентах от контроля (без ингибитора).

Определение физико-химических свойств протеиназы. Кинетические параметры — максимальную скорость реакции ($V_{\max}$), и константу Михаэлиса (K_m) определяли по гидролизу субстратов плазмина и тромбина, которые использовали в концентрациях 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 мг/мл соответственно. Кинетику реакции снимали в автоматическом режиме при использовании компьютерного обеспечения на спектрофотометре Cary 50 UV-Vis (“Varian”, США). Зависимость скорости реакции от концентрации субстратов строили в координатах Лайнуивера — Берка.

pH-оптимум активности протеиназы определяли в 0.4 М универсальном (натрий-ацетат-фосфат-боратном) буфере со значениями pH от 3.0 до 11.0. К 150 мкл буфера с соответствующим значением pH добавляли 100 мкл раствора фермента и 100 мкл раствора субстрата.

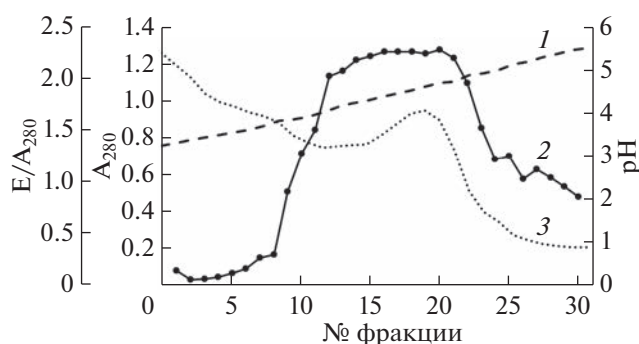


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных белков культуральной жидкости *A. terreus* 2. 1 — pH, 2 — активаторная к прекалликреину активность, 3 — белок.

Для определения pH-стабильности фермента проводили инкубацию протеиназы в растворах буфера с разными значениями pH при 37°C в течение 2 ч, после чего определяли активность с субстратом тромбина. Остаточную активность выражали в % от исходной.

Температурный оптимум действия протеиназы определяли в 0.05 М Трис-НСl-буфере, pH 8.2 по тромбиноподобной активности при 25, 30, 37, 45, 55 и 65°C. Термостабильность фермента оценивали после инкубации фермента при заданных температурах в течение 2 ч и выражали в % от исходной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Протеиназу — активатор прекалликреина, образуемую *A. terreus* 2, выделяли из культуральной жидкости осаждением сульфатом аммония, затем с помощью препаративного колоночного изоэлектрофокусирования. Фракции с наибольшей активаторной к прекалликреину и плазминоподобной активностью имели pI 4.6–4.7 (рис. 1). Удельная активаторная к прекалликреину активность выделенной протеиназы составила $1.1 \text{ Е/мг белка} \times 10^{-3}$.

Для проверки гомогенности полученной белковой фракции с наибольшим значением целевых активностей после изоэлектрофокусирования и установления молекулярной массы активного фермента использовали разделение белков с помощью электрофореза в ПААГ с Na-ДДС по методу Лэммли. Было установлено, что внеклеточная протеиназа микромицета *A. terreus* 2 представляла собой белок с молекулярной массой около 37 кДа (рис. 2).

Выявление углеводного компонента у протеиназы-активатора прекалликреина, образуемой *A. terreus* 2, показало, что фермент гликозилирован (рис. 3). Примечательно, что протеиназа-активатор другого профермента системы

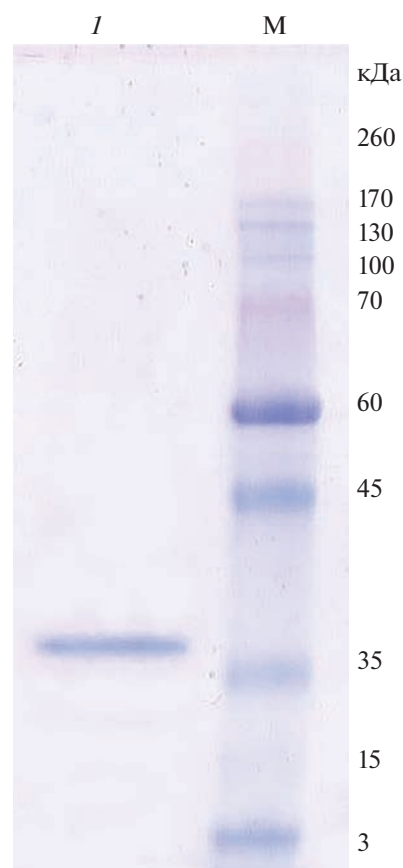


Рис. 2. Денатурирующий электрофорез в ПААГ (по Лэммли) протеиназы — активатора прекалликреина, образуемой *A. terreus* 2. 1 — активная фракция после изоэлектрофокусирования, М — метки.

гемостаза — протеина С, полученная при культивировании *A. ochraceus* L-1 не была гликозилированным белком [20].

Была изучена субстратная специфичность внеклеточной протеазы *A. terreus* 2 с хромогенными пептидными субстратами. Из представленных в табл. 1 данных видно, что выделенная протеиназа-активатор проявляла высокую протеолитическую активность только с субстратами тромбина и плазмينا. С остальными использованными хромогенными субстратами наблюдались лишь следовые активности, вне зависимости от аминокислотной последовательности в хромопептиде. Замена аминокислот в положениях P₁, P₂ и P₃ хромогенных пептидных субстратов не оказывала существенного влияния на их расщепление (табл. 1).

Таким образом, на основе проведенного анализа субстратной специфичности, можно сделать вывод, что протеиназа-активатор прекалликреина, образуемая микромицетом *A. terreus* 2, имела довольно широкую субстратную специфичность. По-видимому, в результате процессинга, протеиназа проявляет автокаталитическую функцию,

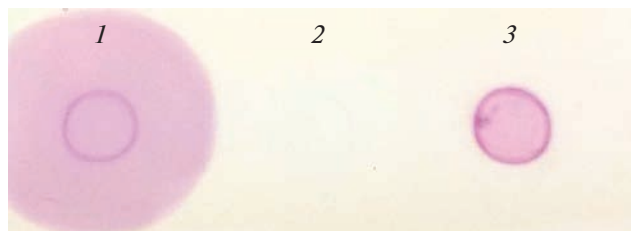


Рис. 3. Результат качественной реакции на гликопротеины с протеиназой — активатором прекалликреина, образуемой *A. terreus* 2. 1 — инвертаза (положительный контроль); 2 — БСА (отрицательный контроль), 3 — протеиназа *A. terreus* 2.

чем обусловлена ее способность к реакции ограниченного протеолиза — активации прекалликреина — в участке полипептидной цепи, гомологичной по аминокислотному составу, а экскретируясь, она обеспечивает микроицет разнообразием аминокислот, расщепляя различные белковые субстраты.

Кинетические параметры выделенной протеиназы *A. terreus* 2 определяли в реакциях с хромогенными пептидными субстратами плазмина и тромбина. Рассчитанные значения K_m для субстрата H-D-Val-Leu-Lys-pNA составило 3.17 ммоль/мл, V_{max} — 4.16 ммоль/мин × мл. Для субстрата Tos-Gly-Pro-Arg-pNA значения K_m и V_{max} составили

Таблица 1. Субстратная специфичность протеиназы — активатора прекалликреина *A. terreus* 2

Хромогенный субстрат	Амидолитическая активность, $E/A_{280} \times 10^{-3}$
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	98.0
pGlu-Pro-Arg-pNA	2.2
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	5.0
pGlu-Gly-Arg-pNA	4.4
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	2.9
Ac-Leu-Gly-Arg-pNA	3.3
Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA	0
Bz-Arg-pNA	6.6
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	55.8
Z-Ala-Ala-Met-Lys-pNA	7.0
Z-Ala-Ala-Phe-Lys-pNA	3.5
For-Ala-Phe-Lys-pNA	8.6
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	9.1
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	6.1
Z-Gly-Gly-Leu-pNA	4.0
pGlu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA	0
Ac-Phe-pNA	4.4
Ac-Leu-Tyr-pNA	0

2.91 ммоль/мл и 4.26 ммоль/мин × мл соответственно.

Значения K_m и V_{max} для протеиназ, образуемых *A. ochraceus* L-1 и *A. terreus* 2 оказались близки. Однако, судя по сравнению величин K_m , скорость реакции протеиназы *A. ochraceus* L-1 ниже по сравнению с протеиназой-активатором из *A. terreus* 2 [20, 21].

По результатам ингибиторного анализа было сделано заключение о принадлежности протеиназы-активатора *A. terreus* 2 к классу сериновых протеаз. Ингибирование активности протеиназы-активатора PMSF в молярном соотношении фермент : ингибитор 1 : 100 составило 86%. Остальные использованные ингибиторы существенного влияния на активность протеиназы не оказывали (табл. 2).

Изучение зависимости активности протеиназы — активатора прекалликреина *A. terreus* 2 от pH показало, что наибольшее значение активности приходилось на значение pH 10 (рис. 4). Из литературы известно, что микроицеты вида *A. terreus* способны образовывать щелочные протеиназы, в том числе, находящие применение в промышленности в качестве компонентов моющих средств [14].

Кроме того, фермент при pH 10 был и наиболее стабилен (рис. 4). После инкубации при этом pH, протеиназа проявляла высокую тромбиноподобную активность, тогда как при pH 11 активность резко снижалась и составляла после выдерживания в течении 2 ч уже порядка 32% от максимального. Также высокая активность протеиназы-активатора сохранялась после инкубации в растворе с pH 9 (76% от максимальной активности).

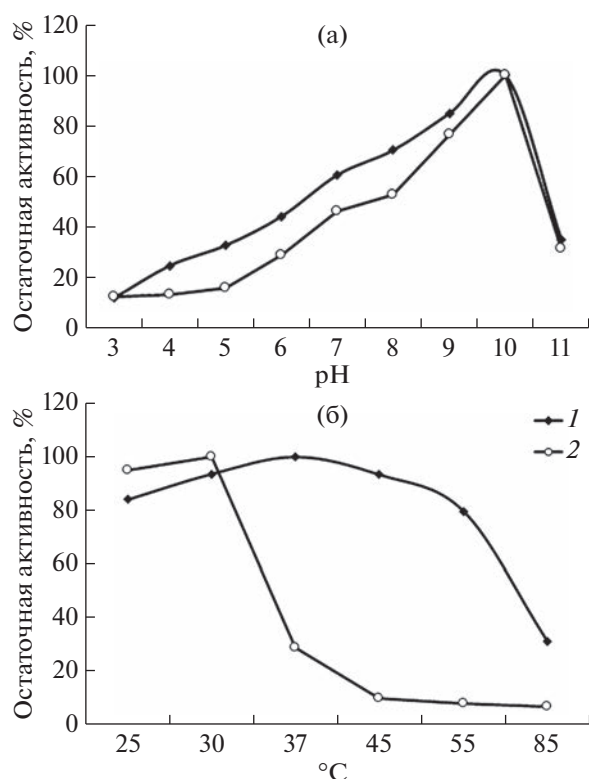
Была установлена оптимальная температура для проявления активности внеклеточной протеиназы *A. terreus* 2 — 37°C, однако протеиназа проявляла активность в широком диапазоне температур: от 25 до 55°C (рис. 5). Активность протеиназы при 65°C снижалась почти в 3 раза по сравнению с максимальным значением активности при 37°C. Эта характеристика протеиназы крайне важна, так как максимум активности соответствовал физиологической температуре человеческого тела, что может быть значимым при разработке диагностического набора на прекалликреин плазмы крови человека с использованием выделенной протеиназы.

Изучение термостабильности протеиназы, показало, что она наиболее стабильна при инкубации при температуре 30°C. Несколько меньшие значения активности протеаза показала при температуре 25°C. После длительной инкубации при температуре от 37°C и выше протеиназа стремительно теряла активность (рис. 4).

Выделенная протеиназа-активатор, образуемая *A. terreus* 2 по ряду свойств, таких как значение pI, гликозилирование и активация прекалликреина, отличалась от близкой протеиназы-активатора, микроицета *A. ochraceus* L-1 (табл. 3). Установлен

Таблица 2. Ингибиторный анализ внеклеточной протеиназы *A. terreus* 2

Ингибитор	Молярное соотношение фермент : ингибитор	Остаточная активность, %
Контроль (без ингибитора)	—	100.0
ЭДТА	1 : 10	99.0
	1 : 100	89.0
<i>o</i> -фенантролин	1 : 10	98.2
	1 : 100	98.7
<i>n</i> -ХМБ	1 : 10	97.5
	1 : 100	92.2
PMSF	1 : 10	6.5
	1 : 100	14.0
Соевый ингибитор трипсина	1 : 10	96.2
	1 : 100	95.8
TLCK	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
TPCK	1 : 10	100.0
	1 : 100	99.0

**Рис. 4.** Влияние pH (а) и температуры (б) на активность (1) и стабильность (2) протеиназы – активатора прекалликреина, образуемой *A. terreus* 2.

ные различия позволяют рассматривать протеиназы аспергиллов, способные к реакциям ограниченного протеолиза как новый пул ферментов, имеющих перспективы применения в диагностике при нарушениях системы гемостаза, а именно в качестве экзогенных активаторов с широкой или узкой субстратной специфичностью к проферментам этой системы.

Активатор прекалликреина человека, представляющий собой активированный β -фрагмент фактора Хагемана, интересен тем, что запускает трансформацию прекалликреина в калликреин, а это, в свою очередь, через серию биохимических реакций приводит к синтезу вазоактивного пептида – брадикинина. Поиск экзогенных активаторов этого фактора системы гемостаза может позволить проводить более корректную диагностику ряда заболеваний и делает протеиназу *A. terreus* 2 интересным компонентом таких тест-систем.

Таким образом, протеиназа-активатор прекалликреина плазмы крови человека, выделенная из культуральной жидкости микромицета *A. terreus* 2, представляет собой сериновую гликозилированную протеиназу с молекулярной массой ~34 кДа и оптимумом pH для проявления активности 10.0 и оптимумом температуры 37°C. По ряду свойств данная протеиназа сходна с протеиназой-активатором протеина С, образуемой микромицетом *A. ochraceus* L-1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ № СП-3906.2021.4.

Таблица 3. Сравнение свойств протеиназ-активаторов, *A. terreus* 2 и *A. ochraceus* L-1

Свойство	Протеиназа <i>A. terreus</i> 2	Протеиназа <i>A. ochraceus</i> L-1 [12, 21]
Тромбиноподобная активность с Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	+	+
Плазминоподобная активность с H-D-Val-Leu-Lys-pNA	+	+
Расщепление H-D-Pro-Phe-Arg-pNA вследствие активации прекалликреина	+	—
Расщепление pGlu-Pro-Arg-pNA вследствие активации протеина C	—	+
Расщепление Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA вследствие активации фактора X	—	+
Спектр расщепляемых хромогенных пептидных субстратов с остатками Arg/Lys в положении P ₁	Широкий	Узкий
K _m (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), ммоль	2.9	2.3
Молекулярная масса, кДа	37	33
Изоэлектрическая точка	4.6	6.0
Оптимум pH активности	10.0	8.0–9.0
Гликозилирование	+	—
Класс протеиназ	Сериновая	Сериновая

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Успехи современной биологии. 2021. Т. 141. № 5. С. 467–482.
- Sharma C., Osmolovskiy A., Singh R. // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. № 11. А. 1880. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111880>
- Diwan D., Usmani Z., Sharma M., Nelson J.W., Thakur V.K., Christie G., Molina G., Gupta V.K. // *Int. J. Molec. Sci.* 2021. V. 22. № 19. А. 10468. <https://doi.org/10.3390/ijms221910468>
- Chung D., Yu W.-J., Lim J.-Y., Kang N.-S., Kwon Y.-M., Choi G., Bae S.-S., Cho K., Lee D.-S. // *Microorganisms*. 2022. V. 10. № 1. А. 29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010029>
- Лукьянова А.А., Корниенко Е.И., Виган П.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Осмоловский А.А. // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биол. 2020. Т. 75. № 1. С. 37–42.
- Осмоловский А.А., Шаш Б., Александрова А.В., Баранова Н.А., Крейер В.Г. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2022. Т. 77. № 2. С. 138–144.
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биол. 2018. Т. 73. № 1. С. 47–51.
- Waheed H., Moin S.F., Choudhary M.I. // *Curr. Med. Chem.* 2017. V. 24. № 17. Р. 1874–1891.
- Osmolovskiy A.A., Schmidt L., Orekhova A.V., Komarevtsev S.K., Kreyer V.G., Shabunin S.V., Egorov N.S. // *Life*. 2021. V. 11. А. 782. <https://doi.org/10.3390/life11080782>
- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 6. С. 688–694.
- 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.
- 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.
- Chakrabarti S.K., Matsumura N., Ranu R.S. // *Curr. Microbiol.* 2000. V. 40. № 4. Р. 239–244.
- 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. Р. 298–304.
- de Lima E.E., Franco D.G., Galeano R.M.S., Guimarães N.C.A., Masui D.C., Giannesi G.C., Zanoelo F.F. // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2021. V. 51. № 4. Р. 320–330.
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. // Микология и фитопатология. 2021. Т. 55. № 3. С. 225–228.
- Батомункеева Б.П., Егоров Н.С. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 602–606.
- Gertler A., Trop M. // *Eur. J. Biochem.* 1971. V. 19. № 1. Р. 90–96.
- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия микробиология. 2017. Т. 53. № 4. С. 373–379.

**Properties of Extracellular Proteinase – Activator of Blood Plasma
Prekallikrein Produced by Micromycetes *Aspergillus terreus* 2**

E. S. Zvonareva^a, A. A. Osmolovskiy^a, *, N. A. Baranova^a, I. B. Kotova^a, and V. G. Kreyer^a

^a*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

^{*}*e-mail: aosmol@mail.ru*

The extracellular proteinase – activator of human plasma prekallikrein was isolated from the culture fluid of the micromycete *A. terreus* 2, and their physicochemical, kinetic and biochemical properties were studied. It has been established that *A. terreus* 2 extracellular proteinase is a glycosylated serine proteinase with an isoelectric point of 4.6, molecular weight about 37 kDa and the optimum activity at pH 10.0 and a temperature of 37°C. In a number of properties, this proteinase is similar to proteinase – activator of protein C, which is produced by the micromycete *A. ochraceus* L-1.

Keywords: prekallikrein activators, micromycete proteinases, preparative isoelectric focusing, *Aspergillus terreus*