

УДК 577.152.34:577.151.5

## КОЛАГЕНОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ МІКРООРГАНІЗМІВ

*МАЦЕЛЮХ О. В., ВАРБАНЕЦЬ Л. Д.*

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

*E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua*

Мікробні колагенолітичні ферменти гідролізують білки родини колагенів. У роботі наведено дані щодо здатності деградувати колаген ферментами, виділеними з різних груп мікроорганізмів — бактерій, грибів, актиноміцетів та дріжджів. Розглянуто фізико-хімічні властивості, методи виділення і очищення ферментних препаратів колагеназ. Проаналізовано існуючі й можливі шляхи використання цих ферментів у промисловості і медицині.

**Ключові слова:** колагенолітичні ферменти мікроорганізмів, фізико-хімічні властивості, методи виділення і очищення, практичне застосування.

Протеолітичні ферменти відіграють важливу роль в обміні речовин усіх живих організмів, починаючи від бактерій та мікроміцетів і закінчуючи вищими тваринами і людиною. Широке застосування протеаз у наукових дослідженнях, медицині, косметології, у легкій та харчовій промисловості спонукає до пошуку зручних та економічних джерел для одержання ферментів у промисловому масштабі. У цьому сенсі мікроорганізми є винятково перспективним об'єктом досліджень, оскільки багато широко розповсюджених мікроорганізмів виділяють велику кількість протеолітичних ферментів у навколишнє середовище, що значно полегшує завдання їх виділення та очищення.

Окрім своєї основної функції — розщеплення білків їжі до складових амінокислот, протеолітичні ферменти виконують низку не менш важливих функцій. Наприклад, протеоліз лежить в основі таких процесів, як зсідання крові та лізис тромбів, утворення ряду білкових гормонів (інсулін), а також фізіологічно важливих пептидів. Екстрацелюлярні протеолітичні ферменти мікроорганізмів розщеплюють білки, які містяться в навколишньому середовищі, і перетворюють їх на форму, що здатна легко проникати усередину мікробної клітини. Оскільки мікробну клітину, залежно від умов існування, оточують різні білкові субстрати, то й синтезуються різні за специфічністю протеази — широкою специфічністю (гідролізують декілька субстратів) або високоспецифічні (діють виключно на певний субстрат).

Колагенази в організмі людини і тварин беруть участь у морфогенезі сполучної тканини, а також в усуненні деяких патологічних процесів при артритах, метастазах тощо, при цьому розщеплюють нативний колаген у певних локусах на два фрагменти, не спричинюючи руйнування цілої молекули. Колагенолітичні ферменти мікроорганізмів є унікальними за своєю здатністю в різних умовах ( рН, температури, іонної сили) вибірково гідролізувати потрібну спіраль молекули нативного нерозчинного природного білка — колагену.

### Структура і властивості колагенів

Колагени є компонентами матриксу сполучної тканини (шкіра, сухожилля, кістки, зуби, тощо) вищих тварин і належать до фібрилярних білків групи склеропротеїнів. Розрізняють близько 20 типів колагенових молекул, які відрізняються молекулярною будовою і належністю до різних органів. Майже 30% білкової маси тіла людини і 6% загальної маси тіла припадає саме на колаген. Його кількість у біосфері оцінюють в 1 млрд. т [1].

Основна одиниця будови колагену — тропоколаген (рисунок), який складається з трьох поліпептидних  $\alpha$ -спіралей завдовжки близько 300 нм (молекулярна маса 95 кДа). В амінокислотному складі тропоколагенових молекул переважають залишки гліцину (33%), проліну і гідроксипроліну (18%), а також лізину. Три ланцюги, згортаючись

навколо спільної осі, утворюють потрійну спіраль. Для первинної структури характерним є чергування полярних (5%) і неполярних (95%) ділянок. Будова неполярних ділянок однорідна — це чергування послідовності -Gly-Pro-X-, де X — будь-яка амінокислота, але найчастіше пролін і оксипролін, які надають молекулі форми ламаної спіралі [2]. Полярні ділянки локалізовані на N-кінцях кожного ланцюга, мають глобулярну структуру і чутливі до атаки протеаз широкої специфічності дії. Їхню будову вивчено недостатньо, хоча й встановлено, що кожною третьою амінокислотою в них є гліцин. Структура колагену стабілізована численними міжмолекулярними, водневими, а також ковалентними зв'язками (між лізином і оксिलізином, проліном і оксипроліном). Усе це робить молекулу колагену достатньо міцною та стійкою до розтягнення. Так, наприклад, волокно колагену завтовшки 1 мм витримує навантаження до 100 Н. У тканинах волокна орієнтовані строго паралельно лініям напруги, що виникає в них в результаті виконання притаманних їм функцій (рисунок). Як й інші фібрилярні білки, колаген майже нерозчинний у нейтральних розчинах солей, слабких кислотах і лугах. Лише невелика частина колагенової молекули екстрагується при температурі 0 °С розчином хлориду натрію і кислими (нітратними, ацетатними) буферами. Процес не супроводжується денатурацією колагену, розчинені молекули якого за певних умов знову утворюють фібрили. Колаген, який екстрагується цитратним буфером з рН 4,0, називається проколагеном, а той, що екстрагується нейтральними розчинами солей, — тропоколагеном. Більшість протеаз можуть гідролізувати лише одиночні спіралі або денатуровані колагенові пептиди, і лише «істинні» колагенази (ферменти бактеріального походження, які атакують велику кількість сайтів уздовж спіралі, чим відрізняються від матриксних металопротеаз ссавців) та протеази з колагенолітичною дією здатні розщеплювати молекулу нативного колагену.

### Біологічні функції і джерела виділення колагеназ

Колагенази різних типів було виділено із тканин хребетних, крабів, личинок мух, екскретів комах, а також із культуральної рідини або клітин мікроорганізмів — бактерій, грибів, актиноміцетів. Колагенази, що їх одержано з різних джерел, мають деякі спільні структурні особливості, зокрема



в субстратзв'язувальній ділянці молекули ферменту. Проте вони відрізняються за структурою, специфічністю дії на колагенові волокна і використовуються для різних наукових та прикладних цілей. Виділення колагеназ із тваринних тканин є надто трудомістким і неекономічним через малий вміст порівняно з іншими білками. Також слід зазначити, що лише мікробні колагенази та колагенази амфібій можуть гідролізувати колагени до повного їх руйнування. Деякі з них було отримано як електрофоретично гомогенні препарати й охарактеризовано за молекулярною масою, ізоелектричною точкою, чутливістю до інгібіторів, специфічністю дії та класифіковано за складом активних центрів. Однак загалом питання щодо синтезу колагенолітичних ферментів мікроорганізмами, їхніх властивостей, можливостей використання досліджено недостатньо.

Уперше колагеназу мікробного походження було виділено в 1957 р. з анаеробної патогенної бактерії *Clostridium histolyticum*, яка є збудником клостридіального міонекрозу (газової гангрени) — захворювання з високим рівнем смертності [3, 4]. Цей фермент був здатен гідролізувати нативний колаген за фізіологічних значень рН і температури. Клостридіальній колагеназі дали назву « $\beta$ -токсин». У комплексі з іншими метаболітами бактерії фермент бере участь у поширенні тканинної деструкції. Останнім часом з'явилися дані про те, що колагенази роду *Clostridium* не є домінантою у вірулентній інфекції [5]. Так, на хромосомальних *colA* мутантах *C. perfringens* було встановлено, що колагеназа (каппа-токсин) не відіграє вирішальної ролі у вірулентному процесі [6, 7]. Здатність гідролізувати колаген мають ферменти й інших патогенних мікроорганізмів. Стрептококи групи В є головними патогенами в неонатальному сепсисі, пневмонії та менінгітах [8, 9]. У досліджах *in vitro* показано властивість стрептококів групи В окупувати багату на колаген амнеостатичну

мембрану плаценти, колагенові фібрили при цьому руйнуються, що призводить до передчасного розриву мембран. *Streptococcus mutans* є збудником коронального карієсу і відповідає за поширення його на всю порожнину рота [10]. Також проводяться дослідження, спрямовані на з'ясування ролі колагенази *Candida albicans* у розвитку карієсу зубів [11, 12]. Інша патогенна анаеробна бактерія *Porphyromonas gingivalis* також спричинює захворювання порожнини рота — періодонтити. Було встановлено, що цей мікроорганізм синтезує багато екзопротеаз і принаймні декілька з них — у формі більш високомолекулярних зимогенів [13, 14, 15]. Серед протеаз *P. gingivalis* виявлено як тіолові, так і серинові протеази, які деградують імуноглобуліни, фібриноген, фібрoneктин, колаген, еластин тощо [16, 17]. Для фітопатогенної бактерії *Corynebacterium (Clavibacter) rathayii* встановлено, що її колагеназа бере участь у прикріпленні клітин до волокон колагену [18, 19]. Колагеназа *Bacillus cereus* є одним з основних вірулентних факторів цієї бактерії — збудника швидкоплинних ендодальмітів. Очищений фермент, виділений із цього патогену, викликав некрози сітківки *in vivo*. Нещодавні досліді показали інфільтрацію бактеріальних клітин у склисте тіло, що пов'язано з руйнуванням протективної захисної колагенової капсули [20, 21]. *Staphylococcus aureus* продукує різні екзопротеїни, які зумовлюють здатність цього мікроорганізму колонізувати тканини і спричинювати захворювання організму-хазяїна. Майже всі штами секретують цитокіни і групу ферментів у складі гемолізинів ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), нуклеаз, протеаз, ліпаз, гіалуронідаз і колагеназ. Основна функція цих білків полягає у прикріпленні до тканини хазяїна і перетворенні її на джерело живлення [22, 23].

До 90-х років ХХ ст. панувала думка, що в мікроорганізмів украй рідко трапляється здатність деградувати колаген і використовувати його як джерело їжі. Однак було доведено, що колагенолітичні ферменти здатні виділяти в навколишнє середовище не лише патогенні штами. З ґрунту та стічної води можна виділити штами, які мають властивість синтезувати колагеназу. Так, за даними чеських учених [24], із 437 бактеріальних культур, що їх було виділено зі стічної води і різних зразків ґрунту, колагенолітичну дію мали (у % від кількості штамів у зразку): стічна вода — 6,6; ґрунт смерекових лісів — 15; польовий ґрунт — 30; присадибний ґрунт — 29; садовий ґрунт — 37. Згодом

ізолювали й охарактеризували багато ґрунтових мікроорганізмів з колагенолітичною активністю. Вони належали до різних таксономічних груп, але більшість із них була представлена стрептоміцетами та мікроміцетами [25, 26]. Так, ґрунтовий *Streptomyces wartii* був здатен гідролізувати колаген сухожиль, плаценти та деякі інші види колагену [27], а колагеназу із *Streptomyces* sp. А8 за фізико-хімічними властивостями і субстратною специфічністю можна віднести до «істинних» колагеназ [28]. Також здатність синтезу колагенази було виявлено у ґрунтовій бактерії *Cytophaga* sp. L43-1 [29], непатогенного мікроорганізму *Vibrio alginolyticus* [30, 31] та у термофільних (*Streptomyces* sp.) і психрофільних (*Azospirillum* sp., *Arthrobotrys tortor*) мікроорганізмів [32, 33, 34, 35].

### Фізико-хімічні властивості колагеназ

Колагенази, виділені з різних джерел, відрізняються за своїми фізико-хімічними властивостями (рН- і температурним оптимумом дії, молекулярною масою, ізоелектричною точкою, кінетичними характеристиками тощо). За здатністю гідролізувати колагенові волокна ферменти з колагенолітичними властивостями поділяють на «істинні» та «неспецифічні». «Істинна» колагеназа є ферментом, що гідролізує тільки колаген і не діє на інші білки. «Неспецифічна» колагеназа гідролізує й інші білкові субстрати, окрім нативного колагену [36].

Серед колагеназ мікробного походження добре відомими і найбільш вивченими є колагенази *C. histolyticum* (КФ 3.4.24.3), які характеризуються високою специфічністю дії на колагенові волокна і належать до «істинних» колагеназ. Їх широко застосовують у біотехнології та для лабораторних цілей (наприклад, препарати фірм Sigma-Aldrich, Serva). Проте для культивування цієї бактерії потрібні складні заповіжні заходи, живильні середовища і відповідні умови культивування. У результаті багатостадійного процесу очищення позаклітинного ферментного комплексу клостридій одержують групу з 6–7 колагеназ із молекулярною масою від 68 до 125 кДа [37, 38]. Усі колагенази є нейтральними металопротеазами, у зв'язку з чим у процесі вирощування продуцента для біосинтезу їх необхідні іони цинку та кальцію. Дані, отримані під час вивчення атомно-адсорбційних спектрів і впливу інгібіторів, свідчать про наявність цинку в активному центрі молекули ферменту, а для зв'язування з колагеновим



## Фізико-хімічні властивості деяких колагеназ мікробного походження

Джерело виділення колагенази	Молекулярна маса, кДа	Оптимум дії		Ізоелектрична точка, рІ	Інгібітор	Субстрат
		рН	t, °С			
<i>Candida albicans</i> [68]	46	6,5–7,0	37–55	6,2	ЕДТА	БСА, колаген, FALGPA
<i>Candida albicans</i> ATCC 1002 [11]	40	4,0	40–50	4,0	Пепстатин, сечовина, цистеїн	БСА, колаген, FALGPA
<i>Achromobacter iophagus</i> (EC 3.4.24.3) [31]	82	–	–	–	ДПФФ, гістидин	Казеїн, пролактин, міозин, фібронектин, аденілаткіназа
<i>Hypoderma lineatum</i> (3.4.21.49) [60]	25,2	7,0–7,5	25–37	4,1	ДПФФ	Нативний колаген, окиснений В-ланцюг інсуліну
<i>Cytophaga</i> sp. L43-1 [29, 72]	120	–	–	4,96	ЕДТА	Колаген, желатин, казеїн
<i>Streptococcus mutans</i> [10]	52 50	–	–	–	ЕДТА, о-фенантролін	Желатин, колаген, FALGPA
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i> NTAP-1 [69]	37	3,9	–	–	Пепстатин	Колаген, FALGPA
<i>Clostridium histolyticum</i> [37]	68 115 79 100 110 125	7,0–7,5	37	5,9 5,6 6,1 5,8 5,9 5,4	ЕДТА, цистеїн, о-фенантролін	Желатин, колаген, FALGPA
<i>Azospirillum</i> sp. [34]	48,6	8,5	40	8,5	ЕДТА	Нативний колаген

Примітка: «–» — даних немає; ДПФФ — діізопропілфторфосфат; ЕДТА — етилендіамінтетраацетат.

субстратом і повної каталітичної активності потрібні іони кальцію, які також запобігають інактивації. Так, на кожен молекулу ферменту припадає, за даними [39], 1 моль цинку. Препарати з колагенолітичною дією, виділені з *C. histolyticum*, мають специфічність до X-Gly зв'язку (X — нейтральна амінокислота) у послідовності -Pro-X-Gly-Pro-. Усе це свідчить про «істинність» клостридіальних колагеназ. Високоочищені клостридіальні колагенази активні щодо нативного і денатурованого колагену, желатину, деяких синтетичних субстратів, які імітують послідовності амінокислот у молекулі колагену: 2-фуранакрилоїл-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA), Pz-Pro-Arg-Gly-Pro (Pz-пептид), [Pro-OxyPro-Gly]<sub>n</sub>, [Pro-Pro-Gly]<sub>n</sub>, але не діють на інші глобулярні й фібрилярні білки (казеїн, гемоглобін, альбумін, фібрин, кератин, еластин). Водночас неочищені препарати, що містять домішку неспецифічних протеаз, здатні розщеплювати ще й інші білки, у зв'язку з чим їх широко застосовують для ізоляції клітин у різних типах тваринних тканин. Утім, специфічність цих колагеназ може бути ще вужчою, оскільки у досліджах із фракціонування препарату встановили

наявність фракцій, неактивних навіть щодо желатину [40, 41].

Окрім групи клостридіальних колагеназ, одержана в гомогенному стані, детально вивчена і застосовується для промислових потреб колагеназа (КФ 3.4.24.3), яку виділено з культуральної рідини бактерії *Achromobacter iophagus* [42]. Було показано, що цей фермент складається з двох ідентичних субодиниць з молекулярною масою 35 кДа. Дисоціація димеру в різних умовах призводила до втрати ферментативної активності [43]. Цей фермент також можна віднести до групи «істинних» колагеназ. Субстратами ферменту можуть бути, окрім нативного й денатурованого колагену, синтетичні пептиди, що імітують амінокислотну послідовність колагену. Встановлено, що колагеназа з *A. iophagus* так само, як і ферменти, виділені з *C. histolyticum*, містить в активному центрі цинк і для вияву активності потребує іонів кальцію.

Протеолітичні ферменти з активною колагенолітичною дією, як з металом в активному центрі, так і серинового типу, отримано з культуральної рідини штамів, які належать до родів *Streptomyces* і *Actinomyces*. Металозалежними протеазами є ко-

лагенази, виділені з культуральної рідини таких мікроорганізмів, як *Streptomyces* sp. C-51 і *Streptomyces* sp. A8 [44, 45]. Специфічність цих ферментів ширша, ніж клостридіальних, оскільки вони деградують, поряд з колагеном, ще й казеїн, кератин, еластин та інші білкові субстрати. Зі штаму *Streptomyces* sp. 3B [46] було виділено два металозалежних ферменти з колагеназною активністю. Молекулярна маса їх становила 116 і 97 кДа. Вони належать до нейтральних протеаз і мають досить вузьку специфічність — активно деградують лише колаген, желатин і синтетичні субстрати — аналоги послідовностей у молекулі колагену. Для *Streptomyces* sp. 1349 було показано, що цей штам виділяє в середовище культивування принаймні три ферменти з колагенолітичною активністю: два з них є металопротеазами, а один — сериною протеазою з молекулярною масою 30–40 кДа. Ці ферменти мають високу субстратну специфічність, активні в досить широкому діапазоні рН — від 5,0 до 11,0 і мають декілька термооптимумів: при 37–40 °C і 60 °C [47].

Металозалежні колагенолітичні протеази було знайдено і в бацил. Так, із культуральної рідини *Geobacillus collagenovorans* MO-1 виділено дві металопептидази, які гідролізували синтетичні субстрати, що містять специфічну послідовність молекули колагену -Gly-Pro-X- [48]. Окрім того, ця бактерія синтезує серинову колагенолітичну протеазу з молекулярною масою 210 кДа, що складається з двох субодиниць 105 кДа кожна. Цей фермент унікальний тим, що має найвищу молекулярну масу серед мікробних колагеназ. Він активний стосовно колагенів I і IV типів і желатину, однак не гідролізує синтетичні пептидні субстрати FALGPA і Pz-пептид [49].

Багато мікробних ферментів мають високу стійкість до температури і денатуруючих агентів. Зі штаму *Aneurinibacillus thermoaerophilus* DSM 10154T було виділено термостабільну металозалежну пролінспецифічну амінопептидазу, яка ефективно гідролізувала й колаген. За даними SDS-PAGE, її молекулярна маса становить 51 кДа. Фермент максимально активний при температурі 55 °C і втрачає до 50% вихідної активності при 36 і 75 °C [50]. Термостабільний ферментний комплекс, який містив декілька компонентів і мав колагенолітичну дію, було одержано з культуральної рідини *Thermoactinomyces vulgaris* [51, 52]. У найбільшій кількості в комплексі містилася серинова протеаза, яку назвали термітазою (КФ

3.4.21.66), з максимумом стабільності при температурі 60–85 °C. За каталітичними властивостями цей фермент нагадує субтилізини. З іншого штаму *Thermoactinomyces vulgaris* sp. 21E виділено термофільну серинову колагеназу з молекулярною масою 50 кДа. Температурний оптимум дії для цього ферменту становив 60–65 °C, а в присутності іонів кальцію підвищувався до 70–75 °C. У разі нагрівання до 85 °C, знову ж таки у присутності іонів кальцію, протягом 30 хв залишалось до 50% вихідної активності. Фермент виявляв досить вузьку специфічність дії — гідролізував лише колаген I типу, желатин і Pz-пептид [53].

Деякі представники *Streptomyces* і *Actinomyces* є джерелами промислових протеолітичних препаратів, які мають і колагенолітичну активність (проназа, протелін, римопротелін, протофрадин) [54]. Проназа, виділена із *S. griseus*, є комплексом протеаз та пептидаз, які належать до класів серинових і металопротеаз [55]. Проназа, на відміну від клостридіальних колагеназ, гідролізує внутрішньомолекулярні зв'язки, які з'єднують молекулу колагену латерально і на кінцях, при цьому не порушуються поліпептидні ланцюги потрійної спіралі. Протелін також одержують із *S. griseus*. Він гідролізує внутрішньо- і міжмолекулярні поперечні зв'язки колагену. Подібним чином діє комплексний ферментний препарат римопротелін, виділений із *S. rimosus*. Комплексний препарат протофрадин, який містить трипсиноподібні серинові протеази з колагенолітичною дією, виділено із *S. fradiae*. Встановлено [56], що він може спричинити глибокий гідроліз колагену лише за довшого тривалого протеолізу і в разі великої концентрації ферменту.

У деяких мікроорганізмів виявлено здатність до синтезу позаклітинних колагенолітичних протеаз серинового типу, які відрізняються від «істинних» колагеназ передусім будовою активного центру, в якому міститься серин. Такі самі колагенази виділено з комах *Hypoderma lineatum*, краба *Uca pugilator*, деяких земноводних і ссавців [57, 58, 59, 60, 61]. Серинові протеази з колагенолітичною дією мають низьку молекулярну масу. За властивостями і механізмом дії вони схожі на трипсиноподібні протеази тварин. Відома властивість серинових протеаз із родини субтилізинів, джерелом яких є деякі штами *B. subtilis* [62], розщеплювати нативний і денатурований колаген. Так, із бактерії *Bacillus* sp. B16, якій притаманна нематодотоксична активність (на *Panagrellus*

*redivivus*), виділено позаклітинний білковий комплекс, що вбивав до 80% нематод у досліді протягом 24 год. Основним компонентом цього комплексу і основним патогенним агентом є серинова колагенолітична протеаза з молекулярною масою 28 кДа. Цей фермент виявляв максимум активності при температурі 50 °C і рН 10 [63].

Одним із мікроорганізмів, який синтезує серинову протеазу з широкою субстратною специфічністю, у тому числі з колагенолітичною дією, є патогенний гриб *Entomophthora coronata* [64]. Цей фермент гідролізує нативний колаген шкіри людини, а також синтетичні пептиди — аналоги амінокислотних послідовностей колагену. Із цією протеазою схожа за дією на колаген серинова протеаза, виділена з гриба *Malbranchea pulchella* var. *sulfuraria* [52], однак вона має нижчу активність.

Серинові протеази з грибів роду *Aspergillus* також виявляють високу колагенолітичну активність, проте за специфічністю дії відрізняються від колагенази *E. coronata*. Відомий штам *A. niger*, який синтезує аспергілопептидазу з високою колагенолітичною активністю [65]. Фермент здатен розщеплювати синтетичні пептиди зі специфічною колагеновою структурою. Його молекулярна маса становить 21 кДа, оптимальні умови дії — при температурі 45 °C і значеннях рН середовища 7,5–7,8. Подібні за властивостями аспергілопептидази було виділено з культуральної рідини *A. oryzae* [66]. Молекулярна маса виділеного ферменту становила 20 кДа, оптимальні умови для вияву колагенолітичної активності — рН 9,0–10,0 і 40 °C. Ця протеаза має широку специфічність дії і гідролізує низку білкових субстратів — нативний колаген, сироватковий альбумін, β-лактоглобулін, пептон.

Серед протеаз з колагеназною активністю виявлено також кислі протеази. Їх виділяють з таких мікроорганізмів, як *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans* та *Alicyclobacillus sendaiensis*. Так, із клінічного ізоляту *P. gingivalis* 1101 [67] — грамнегативної патогенної анаеробної бактерії, яка спричиняє захворювання ротової порожнини, — було виділено і очищено протеазу зі специфічністю до людського колагену і синтетичних пептидів. Колагеназа інактивувалась інгібіторами тіолових протеаз (пепстатин, N-етилмалеїмід) і відновлювальними агентами (β-меркаптоетанолом). Фермент синтезується у вигляді зимогену з молекулярною масою 94 кДа і розщеплюється на фрагменти — 75,5 і 19 кДа. Припускають, що зи-

моген відіграє певну роль не тільки в деградації колагену, але й у його адгезії на субстраті.

У штамів роду *Candida* встановлено здатність до синтезу як внутрішньо- (*C. albicans* [68]), так і зовнішньоклітинних протеаз із колагенолітичною дією. Останні, у переважній більшості, є кислими протеазами. Так, *C. albicans* ATCC 1002 синтезує кислу колагеназу з молекулярною масою 46 кДа і оптимальною дією при рН 3,5–4,0, що є чутливою до дії пепстатину, сечовини і цистеїну. Зі збільшенням рН до 6,0 відбувається денатурація ферменту. Активність також знижується в разі підвищення температури до 55 °C. Нещодавно було виділено кислу колагеназу з ацидофільного штаму *A. sendaiensis* NTAP-1 [69]. Окрім оптимальної дії при рН 3,9 ця протеаза відзначається термостабільністю. Структура ферменту мономерна, молекулярна маса — 37 кДа. Активність ферменту інгібується пепстатином, він виявляє специфічність до нативного колагену і за типом дії належить до карбоксипептидаз.

Деякі фізико-хімічні властивості колагеназ різного походження подано в таблиці.

#### Методи виділення і очищення мікробних колагеназ

Для виділення індивідуальних колагеназ застосовують різні методи. Так, діалізат супернатанту культуральної рідини *C. histolyticum* після осадження сульфатом амонію 90%-го насичення піддавали гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-50, а потім — G-75. У результаті очищений препарат містив окрім β-токсину (колагеназа) ще й неспецифічні протеїнази. Для одержання комерційних препаратів колагенази проводили багатостадійне очищення на гідроксилапатиті, сефакрилі S-200, а також із застосуванням афінної хроматографії з біоспецифічними лігандами (L-Arg-Affi-Gel202 і забарвленим червоним лігандом) [38]. Отриманий таким чином препарат піддають іонобмінній хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі та гель-фільтрації на SP-сефадексі й одержують 6 очищених індивідуальних колагеназ, які позначають α, β, γ, δ, ε та ζ.

Для очищення колагенази *C. albicans* вдаються до центрифугування культуральної рідини, ультрафільтрації супернатанту крізь мембрани Diaflo марки PU-10, хроматографії на ДЕАЕ-сефацелі, внаслідок чого отримують очищений у 600 разів фермент [11, 70].

Колагеназу з *P. gingivalis* виділяють екстрагуванням із клітин 1%-м розчином тритону X-100 та гель-хроматографією на сефадексі G-50 і G-75 [71]. Для очищення кола-



генази з *Cytophaga* sp. L43-1 використовували ультрафільтрацію й дворазову хроматографію на ДЕАЕ-сефарозі і таким чином одержували препарат ферменту, гомогенність якого підтверджували дані SDS-PAGE [72].

Очищення аспергілопептидази з *A. niger* здійснювали шляхом осадження з культуральної рідини ацетоном. Препарат, розчинений у воді, пропускали через хроматографічну колонку з ДЕАЕ-целюлозою. Гомогенність препарату визначали аналітичним диск-електрофорезом. У результаті виявили два компоненти, один з яких видаляли за допомогою вторинного осадження ацетоном і отримували гомогенну протеазу з колагенолітичною дією і молекулярною масою 21 кДа [73].

### Практичне застосування колагеназ мікроорганізмів

Колагенолітичні ферменти мікробного походження відзначаються здатністю гідролізувати колагенові волокна різних типів. Їх можна використовувати для повного або часткового гідролізу відповідних колагенів, зокрема для вивчення і визначення амінокислотного складу тропоколагенової молекули [74, 75].

Інші важливі галузі застосування колагеназ — медицина і біотехнологія. Так, для дезінтеграції сполучної тканини, одержання суспензії клітин або клітинних новоутворень зі збереженням життєздатності клітин необхідним є вибіркове руйнування позаклітинного матриксу без ушкодження поверхні живих клітин. Механічні засоби у цьому разі неефективні через високу стійкість матриксу порівняно з клітинами. Протеази з широкою субстратною специфічністю сильніше руйнують білкове покриття клітин, аніж матрикс, оскільки колаген практично не піддається їхній дії. Єдиним ефективно діючим засобом є високоспецифічні колагенази, які вибірково руйнують молекули колагену і не діють на інші білки.

Колагенолітичні ферменти мікроорганізмів можуть бути використані в медицині — для лікування деяких захворювань печінки, грижі інвертебрального диска хребта, опіків, обморожень, для прискорення відторгнення струпів і некротичних тканин, трофічних виразок, щоб пришвидшити очищення гнійно-некротичних нальотів. Поряд із цим колагенази необхідні для одержання і культивування клітинних культур людських і тваринних тканин, які є джерелами активаторів плазміногену в тромболітичній терапії. У біології клітин колагенолітичні ферменти застосовують для руйнування по-

заклітинного матриксу тканин з метою отримання індивідуальних клітин з культури або для вирощування культуральних клітин. Виділені за допомогою мікробних колагеназ життєздатні клітини острівків Лангерганса застосовують у лікуванні діабету [76]. Колагеназу А, одержану з *C. histolyticum*, використовують, наприклад, для ізоляції гепатоцитів із печінки щурів (зберігається до 80% живих клітин), а також ендотеліальних клітин [77]. Колагеназа А також входить до складу мазей «Норуксол» та «Імозимаза», що їх застосовують для ферментативного очищення ран від опіків, обморожень, варикозних виразок. Ці препарати не викликають алергічних реакцій і скорочують строки лікування у 1,5–2 рази [78]. Колагеназу В того самого продуцента використовують для ізолювання клітин із тканин. Колагеназа із *Streptomyces* sp. може застосовуватись для лізису пухлинних клітин інвертебрального диска хребта. На основі колагеназ створюють нові засоби для перев'язування, у тому числі плівкові покриття.

Використання ферментів у косметичці відкриває можливість для створення косметичних засобів лікувально-профілактичного напрямку, які не мають побічної дії (подразнень, алергії, токсикозів). Колагеназа ефективна у складі очищувальних кремів і масок, оскільки прискорює процес гідролізу колагену в шкірі і сприяє синтезу нового колагену та «омолодженню» шкіри [57].

Використання колагенази дозволить досягти високого рівня виробництва і якості готової продукції в таких галузях, як, наприклад, шкіряна промисловість. Тут колагеназу застосовують як у складі препаратів для пом'якшення голини, так і на стадії утилізації відходів виробництва [79]. Усе це сприяє поліпшенню якості голини, оскільки ферментативний процес відбувається за м'яких умов, а тому структура отриманої голини виходить якіснішою, ніж при хімічному пом'якшенні. Ферментативні процеси також зумовлюють зниження температури оброблення шкіри, зменшують забруднення виробничих стоків і агресивні умови праці [80].

Таким чином, деякі колагенази, що продукуються мікроорганізмами, використовують для наукових і практичних потреб. Для колагеназ *Clostridium histolyticum* створено технологічні лінії виробництва. Утім, цю групу протеолітичних ферментів виявлено лише у небагатьох представників світу мікробів, і тому вона викликає заінтересованість і увагу дослідників для подальшого пошуку і вивчення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Неклюдов А. Д. Пищевые волокна животного происхождения. Коллаген и его фракции как необходимые компоненты новых и эффективных пищевых продуктов // Прикл. биохимия и микробиология. — 2003. — Т. 39, №3. — С. 261–272.
2. Ramachadran G. N., Reddi A. H. Biochemistry of collagen. — N.Y. and London: Plenum Press, 1976. — 576 p.
3. Bond M. D., Van Wart H. E. Relationship between the individual collagenases of *Clostridium histolyticum*: evidence for evolution by gene duplication // Biochemistry. — 1984. — V. 23, N13. — P. 3092–3099.
4. Mandl J., Zipper H., Ferguson L. T. *Clostridium histolyticum* collagenase: its purification and properties // Arch. Biochem. Biophys. — 1958. — V. 74. — P. 465–472.
5. Bruggemann H., Baumer S., Fricke W. F. et al. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — V. 100, N3. — P. 1316–1321.
6. Awad M. M., Ellemor D. M., Bryant A. E. et al. Construction and virulence testing of a collagenase mutant of *Clostridium perfringens* // Microb. Pathog. — 2000. — V. 28, N2. — P. 107–117.
7. Shimamoto S., Moriyama R., Sugimoto K. et al. Partial characterization of an enzyme fraction with protease activity which converts the spore peptidoglycan hydrolase (SleC) precursor to an active enzyme during germination of *Clostridium perfringens* s40 spores and analysis of a gene cluster involved in the activity // J. Bacteriol. — 2001. — V. 183, N2. — P. 3742–3751.
8. Jakson R. J., Dao M. L., Lim D. V. Cell-associated collagenolytic activity by group B *Streptococci* // Infect. Immunol. — 1994. — V. 62, N12. — P. 5647–5651.
9. Jakson R. J., Lim D. V., Dao M. L. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans* // Curr. Microbiol. — 1997. — V. 34, N1. — P. 49–54.
10. Harrington D. J., Russell R. R. B. Identification and characterization of two extracellular proteases of *Streptococcus mutans* // FEMS Microbiol. Lett. — 1994. — V. 121, N2. — P. 237–242.
11. Nishimura M., Nikawa H., Yamashiro H. et al. Cell-associated collagenolytic activity by *Candida albicans* // Mycopathologia. — 2002. — V. 153, N3. — P. 125–128.
12. Sepulveda P., Murgui A., Lopez-Ribot J. L. et al. Evidence for the presence of collagenous domains in *Candida albicans* cell surface proteins // Infect. Immun. — 1995. — V. 63, N6. — P. 2173–2179.
13. Sela M. N., Kohavi D., Krausz E. et al. Enzymatic degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria // Clin. Oral. Implants. Res. — 2003. — V. 14, N3. — P. 263–268.
14. Lamont R. J., Jenkinson H. F. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1998. — V. 62, N4. — P. 1244–1263.
15. Wittstock M., Flemmig T. F., Schmidt H. et al. Serodiagnosis of *Porphyromonas gingivalis* infection by immunoblot analysis with recombinant collagenase // J. Clin. Microbiol. — 1996. — V. 34. — P. 2411–2413.
16. Lawson D. A., Meyer T. F. Biochemical characterization of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* collagenase // Infect. Immun. — 1992. — V. 60, N4. — P. 1524–1529.
17. Bleeg H. S., Polenik P. Sodium dodecyl sulfate potentiates collagen degradation by proteases from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* // FEMS Microbiol. Ecol. — 1991. — V. 85, N2. — P. 125–132.
18. Labadie J. Synthesis of collagenase by phytopathogenic bacterium *Corynebacterium rathayii* // J. Appl. Bacteriol. — 1990. — V. 69, N6. — P. 828–833.
19. Labadie J. C., Gaillard B., Potier P. Involvement of the collagenase produced by *Corynebacterium rathayii* in its adhesion to collagen // FEMS Microbiol. Lett. — 1991. — V. 79, N1. — P. 75–82.
20. Lund T., Granum P. E. The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity // FEMS Microbiol. Lett. — 1999. — V. 178, N2. — P. 355–361.
21. Beecher D. J., Olsen T. W., Somers E. B., Wong A. C. L. Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preffering phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis // Infect. Immun. — 2000. — V. 68. — P. 6269–5276.
22. Chakrabarty A. N., Dastidar S. G., Sen A. et al. *Leprosy bacillus* — possibly the first chemoautotrophic human pathogen cultivated in vitro and characterised // Indian J. Exp. Biol. — 2001. — V. 39, N10. — P. 962–983.
23. Dinges M. M., Orwin P. M., Schlievert P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* // Clin.



- Microbiol. Rev. — 2000. — V. 13, N1. — P. 16–34.
24. *Vrahy B., Hnatkova Z., Letel A.* Occurrence of collagen-degrading microorganisms in associations of mesophilic heterotrophic bacteria from various soils // *Folia Microbiol (CSSR)*. — 1988. — V. 33, N6. — P. 458–461.
25. *Kabadjova P., Vlahov S.* Investigation on collagenolytic activity of some *Streptomyces* strains isolated from Bulgarian soils // Докл. Българ. АН. — 1995. — V. 48, N9–10. — P. 115–118.
26. *Слабоспицкая А. Т., Крымовская С. С., Резник С. Р.* Коллагенолитическая активность бактерий рода *Bacillus*, выделенных из различных экологических источников // Микробиол. журн. — 1989. — Т. 51, N6. — С. 54–56.
27. *Chacraborty R., Chandra A.L.* Purification and characterization of a streptomycete collagenase // *J. Appl. Bacteriol.* — 1986. — V. 61, N4. — P. 331–337.
28. *Endo A., Murakawa S., Shimizu H., Shiraishi Y.* Purification and properties of collagenase from *Streptomyces species* // *J. Biochem (Tokyo)*. — 1987. — V. 102, N1. — P. 163–170.
29. *Sasagawa Y., Izaki K., Matsubara Y. et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the collagenase from *Cytophaga sp.* L43-1 strain // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 1995. — V. 59, N11. — P. 2068–2073.
30. *Takeuchi H., Shibano Y., Morihara K. et al.* Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase // *Biochem. J.* — 1992. — V. 281. — P. 703–708.
31. *Hare P., Scott-Burden T., Woods D. R.* Characterization of extracellular alkaline proteases and collagenase induction in *Vibrio alginolyticus* // *J. Gen. Microbiol.* — 1983. — V. 129. — P. 1141–1147.
32. *Gousterova A., Lilova A., Trenev M. et al.* Thermophilic actinomycetes as producers of collagenase // Докл. Българ. АН. — 1998. — V. 51, N3–4. — P. 71–74.
33. *Christov P., Gousterova A., Goshev I. et al.* Optimization of the biosynthetic conditions for collagenase production by certain thermophilic actinomycete strains // *Ibid.* — 2000. — V. 53, N1. — P. 115–118.
34. *Oh K. H., Seong C. S., Lee S. W. et al.* Isolation of a psychrotrophic *Azospirillum sp.* and characterization of its extracellular protease // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1999. — V. 174, N1. — P. 173–178.
35. *Tosi S., Annovazzi L., Tosi I. et al.* Collagenase production in an antarctic strain *Arthrobotrys tortor Jarowaja* // *Mycopathologia.* — 2002. — V. 153, N3. — P. 157–162.
36. *Демина Н. С., Лысенко С. В.* Коллагенолитические ферменты, синтезируемые микроорганизмами // *Микробиология.* — 1996. — Т. 65, N3. — С. 293–304.
37. *Bond M. D., van Wart H. E.* Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum* // *Biochemistry.* — 1984. — V. 23, N13. — P. 3085–3091.
38. *Bond M. D., van Wart H. E.* Purification and separation of individual collagenases of *Clostridium histolyticum* using red dye ligand chromatography // *Biochemistry.* — 1984. — V. 23, N13. — P. 3077–3085.
39. *Jung C. M., Matsushita O., Katayama S. et al.* Identification of metal ligands in the *Clostridium histolyticum* ColH collagenase // *J. Bacteriol.* — 1999. — V. 181. — P. 2816–2822.
40. *Matsushita O., Jung C.M., Katayama S. et al.* Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum* // *Ibid.* — 1999. — V. 181. — P. 923–933.
41. *Yoshihara K., Matsushita O., Minami J., Okabe A.* Cloning and nucleotide sequence analysis of the colH gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a gelatinase // *Ibid.* — 1994. — V. 176, N21. — P. 6489–6496.
42. *Nguyen T. T., Dumas J., Keil-Dlouha V.* New *Achromobacter* collagenase and its immunological relationship with a vertebrate collagenase // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1988. — V. 955, N1. — P. 43–49.
43. *Keil-Dlouha V., Keil B.* Subunit structure of *Achromobacter* collagenase // *Ibid.* — 1978. — V. 522, N1. — P. 218–228.
44. *Демина Н. С., Лысенко С. В.* Коллагенолитическая активность *Streptomyces sp.* // *Микробиология.* — 1992. — Т. 61, N4. — С. 629–633.
45. *Chacraborty R., Chandra A.L.* Collagenolytic activity of a soil actinomycete // *Folia Microbiol. (Praha)*. — 1982. — V. 27, N6. — P. 471–474.
46. *Petrova D., Dereikova A., Vlahov S.* Purification and properties of individual collagenases from *Streptomyces sp.* strain 3B // *Ibid.* — 2006. — V. 51, N2. — P. 93–98.
47. *Іванко О. В., Варбанець Л. Д.* Очистка та фізико-хімічні властивості колагенази *Streptomyces sp.* 1349 і кератинази *Streptomyces sp.* 1382 // *Мікробіол. журн.* — 2004. — Т. 66, N2. — С. 11–24.
48. *Miyake R., Shigeri Y., Tatsu Y. et al.* Two thimet oligopeptidase-like Pz peptidases

- produced by a collagen-degrading thermophile, *Geobacillus collagenovorans* MO-1 // J. Bacteriol. — 2005. — V. 187, N12. — P. 4140–4148.
49. Okamoto M., Yonejima Y., Tsujimoto Y. et al. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — V. 57, N1–2. — P.103–108.
  50. Murai A., Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K. An *Aneurinibacillus* sp. strain AM-1 produces a proline-specific aminopeptidase useful for collagen degradation // J. Appl. Microbiol. — 2004. — V. 96, N4. — P. 810–818.
  51. Хайдарова Н. В., Руденская Г. Н., Степанов В. М., Егоров Н. С. Продукция протеиназ в процессе развития культуры *Streptomyces thermovulgaris* Т-54 // Прикл. биохимия и микробиология. — 1991. — Т. 27, N3. — С. 375–380.
  52. Tsushiya K., Nakamura Y., Sakashita H., Kimura T. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682 // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1992. — V. 56. — P. 246–250.
  53. Petrova D. H., Shishkov S. A., Vlahov S. S. Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: purification and some properties // J. Basic Microbiol. — 2006. — V. 46, N4. — P. 275–285.
  54. Петрова И. С. Протеолитические ферменты актиномицетов. — М.: Наука, 1976. — 60 с.
  55. Narahashi Y., Yoda K. Alkaline Proteinase E of *Streptomyces griseus* K-1<sup>1</sup> // J. Biochem. — 1976. — V. 79, N5. — P. 1119–1122.
  56. Galas E., Kaluzewska M. T. Proteinases of *Streptomyces fradiae*. I. Preliminary characterization and purification // Acta Microbiol. Pol. — 1989. — V. 38, N3. — P. 247–258.
  57. Климова О. А., Чеботарев В. Ю. Препараты коллагенолитических протеаз беспозвоночных: биохимические аспекты медицинского и косметологического применения // Бюллетень эксперим. биологии и медицины. — 2000. — Т. 130, N7. — С. 70–75.
  58. Carbonnaux C., Ries-Kautt M., Ducruix A. Relative effectiveness of various anions on the solubility of acidic *Hypoderma lineatum* collagenase at pH 7,2 // Protein Sci. — 1995. — V. 4. — P. 2123–2128.
  59. Chen Y. L., Lu P. J., Tsai I. H. Collagenolytic activity of crustacean midgut serine proteases. Comparison with the bacterial and mammalian enzymes // Comp. Biochem. Physiol. — 1991. — V. 100, N4. — P. 763–768.
  60. Lecroisey A., Boulard C., Keil B. Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from insect *Hypoderma lineatum* // Eur. J. Biochem. — 1979. — V. 101. — P. 385–393.
  61. Stolorow M. A., Bauzon D. D., Li J. et al. Identification and characterization of a novel collagenase in *Xenopus laevis*: possible roles during frog development // Mol. Biol. Cell. — 1996. — V. 7. — P. 1471–1483.
  62. Lim D. V., Jakson R. J., Pullongruenigen C. M. Purification and assay of bacterial collagenases // J. Microbiol. Methods. — 1993. — V. 18, N3. — P. 241–253.
  63. QiuHong N., Xiaowei H., Baoyu T. et al. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2006. — V. 69, N6. — P.722–730.
  64. Hurion N., Fromentin H., Keil B. Specificity of the collagenolytic enzyme from the fungus *Entomophthora coronata*: comparison with the bacterial collagenase from *Achromobacter iophagus* // Arch. Biochem. Biophys. — 1979. — V.192, N2. — P. 438–445.
  65. Stevenson K. J., Gaucher G. M. The substrate specificity of thermomycolase, an extracellular serine proteinase from the thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* var. *Sulfurea* // J. Biochem. — 1975. — V. 51, N3. — P.527–542.
  66. Nordwig A., Jahn W. F. A collagenolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*. Purification and properties // Eur. J. Biochem. — 1968. — V. 3, N4. — P. 519–529.
  67. Kuramitsu H. K., Yoneda M., Madden T. Proteases and collagenases of *Porphyromonas gingivalis* // Adv. Dent. Res. — 1995. — V. 9. — P. 37–40.
  68. Hidenori K., Yoshisato H., Sachio H., Tamaki C. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans* // Infect. Immunol. — 1986. — V. 53, N2. — P. 312–316.
  69. Tsuruoka N., Nakayama T., Ashida M. et al. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — V. 69, N1. — P. 162–169.
  70. Kaminishi H., Hagihara Y., Hayashi S., Cho T. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans* // J. Infect. Immun. — 1986. — V. 53, N2. — P. 312–316.
  71. Lawson D. A., Meyer T. F. Biochemical characterization of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* collagenase // Infect.

- Immun. — 1992. — V. 60, N4. — P. 1524–1529.
72. *Sasagawa Y., Kamio Y., Matsubara Y. et al.* Purification and properties of collagenase from *Cytophaga sp.* L43-1 strain // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 1993. — V. 57, N11. — P. 1894–1898.
73. *Barthomeuf C., Pourrat H., Pourrat A.* Collagenolytic activity of a new semi-alkaline protease from *Aspergillus niger* // *J. Ferment. Bioengin.* — 1992. — V. 73, N3. — P. 233–236.
74. *Mookhtiar K. A., Mallya S. K., Wart H. E.* Properties of radiolabeled type I, II and III collagens related to their use and as substrates in collagenase assays // *Anal. Biochem.* — 1986. — V. 158. — P. 322–338.
75. *Aubert-Foucher E., Font B., Eichenberger D. et al.* Purification and characterization of native type XIV collagen // *J. Biol. Chem.* — 1992. — V. 267, N22. — P. 15759–15764.
76. *Леонович С. И., Слука Б. А., Игнатович И. Н., Горанов В. А.* Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочной железы в красный костный мозг // *Белорус. мед. журн.* — 2004. — Т. 1, №37. — С. 38–41.
77. *Timar F., Botyanszki J., Suli-Vargha H. et al.* The antiproliferative action of a melphalan hexapeptide with collagenase-cleavable site // *Cancer Chemother. Pharmacol.* — 1998. — V. 41, N 4. — P. 292–298.
78. *Lisi P., Brunelli L.* Extensive allergic contact dermatitis from a topical enzymatic preparation (Noruxol) // *Contact Dermatitis.* — 2001. — V. 45, N3. — P. 186–187.
79. *Гребешова Р. Н., Рышкова Т. М., Федорова Л. Г. и др.* Интенсификация процессов обработки кожевенного сырья с использованием щелочной протеазы // *Биотехнология.* — 1998. — V. 4, N6. — С. 788–791.
80. *Dalev P. G., Simeonova L. S.* An enzyme biotechnology for the total utilization of leather waster // *Biotechnol. Lett.* — 1992. — V. 14, N6. — P. 531–534.

## КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Е. В. Мацелюх  
Л. Д. Варбанец*

Институт микробиологии и вирусологии НАН  
Украины, Киев

*E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua*

Микробные коллагенолитические ферменты гидролизуют белки семейства коллагенов. В работе представлены данные о способности расщеплять коллаген ферментами, выделенными из разных групп микроорганизмов — бактерий, грибов, актиномицетов и дрожжей. Рассмотрены физико-химические свойства, методы выделения и очистки ферментных препаратов коллагеназ. Проанализированы существующие и возможные пути использования этих ферментов в промышленности и медицине.

**Ключевые слова:** коллагенолитические ферменты микроорганизмов, физико-химические свойства, методы выделения и очистки, практическое применение.

---



---

## MICROBIAL COLLAGENOLYTIC ENZYMES

*O. V. Matselyukh,  
L. D. Varbanets*

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

*E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua*

Microbial collagenolytic enzymes are able to hydrolyze such a hard insoluble protein substrate as collagen. In this article are gathered data concerning the ability to degrade collagen amongst various groups of microorganisms, such as bacteria, fungi, actinomycetes and yeasts. The physical and chemical properties of collagenolytic enzyme preparations and methods of their separation and purification have been examined. The possible application ways of these enzymes in industry and medicine have been discussed.

**Key words:** microbial collagenolytic enzymes, physical and chemical properties, methods of isolation and purification, practical application.



# Световые микроскопы от компании Carl Zeiss



#### Прямые микроскопы:

- рабочие - Axiostar Plus
- лабораторные - Axioskop 40
- исследовательские - Axio Imager A1 / M1
- универсальные - Axio Imager D1 / Z1 *Новинка!*

#### Инвертированные микроскопы:

- рабочие / лабораторные - Axiovert 40 / 40CFL
- исследовательские / универсальные - Axio Observer A1/D1/Z1 *Новинка!*

#### Стереоскопические микроскопы:

- лабораторные - Stemi 2000 / 2000C
- исследовательские - SteREO Discovery.V12 *Новинка!*
- универсальные - SteREO Lumar.V12 *Новинка!*

#### ООО "Карл Цейсс"

Россия, 105 005, Москва  
Денисовский пер., 26  
Тел.: +7 495 933 51 67  
Факс: +7 495 933 51 55  
E-mail: office@zeiss.ru

#### Филиал ООО "Карл Цейсс"

Россия, 191 104,  
Санкт-Петербург  
ул. Жуковского, 3, оф. 204  
Тел./факс: +7 812 272 13 51  
E-mail: info@zeiss.spb.ru

#### ООО "Карл Цейсс"

Украина, 04050, Киев,  
ул. Герцена, 10  
Тел.: +380 44 581 29 00  
Факс: +380 44 581 29 02  
E-mail: office@zeiss.ua



We make it visible.

[www.zeiss.ru](http://www.zeiss.ru)