



УДК 557.156.07

**АСПЕРГИЛЛОПЕПСИН F — КАРБОКСИЛЬНАЯ ПРОТЕИНАЗА
ИЗ *ASPERGILLUS FOETIDUS*****Остославская В. И., Котлова Е. К., Степанов В. М.***Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва***Руденская Г. Н., Баратова Л. А., Белянова Л. П.***Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Из «пектофоептидина» — смеси ферментов, продуцируемых микроскопическим грибом *Aspergillus foetidus*, выделена карбоксильная протеиназа, стабильная при рН 2,5–6,0, с оптимумом рН 2,5, рI 4,07, ингибируемая N-2,4-динитрофенил-N'-диазоацетилендиаминном и пепстатином. Для очистки фермента применена хроматография на аминсилохроме С-80 и биоспецифическая хроматография на бацитрацин-сефарозе. По N-концевой последовательности, составу и функциональным свойствам фермент близок к аспергиллопепсину А, карбоксильной протеиназе из *Asp. awamori* и другим карбоксильным протеиназам грибов рода *Aspergillus*, которые образуют группу ферментов данного класса. Фермент гомологичен пенициллопепсину и в меньшей степени пепсину животных.

Известно большое число карбоксильных протеиназ различного происхождения. Многие из них, в том числе карбоксильные протеиназы микроскопических грибов, находят практическое применение [1]. Выделение грибных карбоксильных протеиназ представляет значительную трудность, так как экстракт поверхностной культуры грибов, обычно используемый в качестве исходного материала, является сложной смесью ферментов различных классов, белков, пигментов и других продуктов обмена [2]. Задача упрощается при применении аффинных сорбентов — грамицидин-S-сефарозы [3] и бацитрацин-сефарозы [4].

Ранее в нашей лаборатории была выделена карбоксильная протеиназа из *Aspergillus awamori* [5], названная аспергиллопепсином А [6]. Для очистки этой протеиназы в качестве биоспецифического сорбента была использована грамицидин-S-сефароза.

Данная работа посвящена выделению и характеристике карбоксильной протеиназы из *Asp. foetidus* — аспергиллопепсина F. Для выделения фермента наряду с общепринятыми методами была успешно применена хроматография на аминсилохроме С-80 и бацитрацин-сефарозе (табл. 1). После отделения небелковых примесей и части пигмента осаждением сульфатом аммония (80% насыщения) проводили гель-фильтрацию на акрилексе Р-10, что позволило отделить значительное количество темного пигмента, ферменты и белки с большим молекулярным весом и низкомолекулярные примеси. Применение полиакриламидного материала —

Очистка аспергиллопепсина F

| Операция | Уд. акт., ед. акт./ОЕ | Суммарная активность (ед. акт.) | Очистка, в раз | Выход, % |
|---|--------------------------|---------------------------------------|-------------------|----------|
| 1. Экстракция «пектофосфидина» 0,1 М ацетатным буфером, рН 5,2 | 0,0125 | 4410 | 1 | 100 |
| 2. Осаждение сульфатом аммония (80% насыщения) с последующей гель-фильтрацией на акрилексе Р-10 | 0,07 | 800 | 5,6 | 57 |
| 3. Хроматография на аминсилохроме С-80 | 0,7 | 800 | 56 | 57 |
| 4. Хроматография на бацитрацин-сефарозе | 2,1 | 730 | 168 | 52 |
| 5. Повторная хроматография на бацитрацин-сефарозе | 3,03 | 1070 | 240 | 76 |
| 6. Изоэлектрофокусирование * | 3,6 | 700 | 280 | 50 |

* Использовали препарат, полученный после стадии 4.

Таблица 2

Аминокислотный состав карбоксильных протеиназ рода *Aspergillus*
(число остатков на молекулу)

| Аминокислота | Карбоксильные протеиназы из <i>Aspergillus</i> | | | | |
|----------------|--|----------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | <i>foetidus</i> | <i>awamori</i> | <i>sait i</i> [8] | <i>oryzae</i> [9] | <i>oryzae</i> [10] |
| Lys | 15 | 15 | 11 | 15 | 22 |
| His | 3 | 3 | 3 | 4 | 5-6 |
| Arg | 1 | 2 | 1 | 1 | 1-2 |
| Asp | 33 | 38 | 34-35 | 36 | 45 |
| Thr | 29 | 31 | 25 | 23 | 24-25 |
| Ser | 39 | 39 | 42-43 | 27 | 31 |
| Glu | 31 | 30 | 22 | 27 | 34-35 |
| Pro | 17 | 18 | 10 | 17 | 13 |
| Gly | 33 | 35 | 31-32 | 35 | 43 |
| Ala | 23 | 24 | 20 | 26 | 32 |
| Cys | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| Val | 22 | 24 | 22 | 24 | 29 |
| Met | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Ile | 13 | 14 | 11-12 | 14 | 16 |
| Leu | 20 | 19 | 19-20 | 19 | 24 |
| Tyr | 17 | 16 | 17-18 | 15 | 16 |
| Phe | 16 | 16 | 13 | 15 | 20 |
| Trp | 4 | 3 | 1 | 5 | 6 |
| Всего остатков | 318 | 329 | 284-290 | 307 | 364-368 |

акрилекса Р-10 на этой стадии предпочтительнее использования сефадекса, поскольку исходный препарат содержит ферменты, гидролизующие сефадекс. По аналогичным соображениям нецелесообразно использовать на ранних стадиях очистки фермента целлолозные ионообменные материалы и аффинные сорбенты на основе сефарозы.

При хроматографии аспергиллопепсина F на аминсилохроме С-80 — анионите, полученном модификацией макропористого кремнезема [7], происходит отделение пигмента, основных и нейтральных белков и удельная активность фермента повышается в 10 раз. Как видно из рис. 1, аспергиллопепсин F начинает элюироваться с аминсилохроме С-80 0,5 М ацетатным буфером (рН 4,1), однако при повторной хроматографии очищенный фермент не десорбируется этим буфером, а его элюция достигается 1 М ацетатным буфером, рН 4,1.

Сравнение свойств карбоксильных протеиназ

| Карбоксильная протеиназа [источник] | pI | Оптимум pH по гидро- лизу | | Содержание, остаток на молекулу | | |
|---|-------------|------------------------------|----------|------------------------------------|--------|--------|
| | | гемогло- бина | казеина | Lys | His | Arg |
| <i>Asp. foetidus</i> — аспергиллопепсин F | 4,07 | 2,5 | | 15 | 3 | 1 |
| <i>Asp. awamori</i> — аспергиллопепсин A [5] | 3,99 | 2,3 | 2,3–2,6 | 15 | 3 | 2 |
| <i>Asp. saitoi</i> [8] | 3,65 | | 2,7 | 11 | 3 | 1 |
| <i>Asp. niger</i> A [8] B [8] | 4,0 | | 2 2,6 | | | |
| <i>Asp. oryzae</i> [9] | 3,15; 3,5 | | 3 | 15 | 3 | 2 |
| [9] | 3,9 | | 3 | 15 | 4 | 1 |
| [10] | 3,9; 4,1 | | | 22 | 5–6 | 1–2 |
| <i>Rhizopus chinensis</i> [8] | 5–5,4; 5,95 | | 2,9–3,3 | 12 13 | 0 0 | 9 9 |
| <i>Penicillium janthinellum</i> [8, 11] | 3,8 | | | 5 | 3 | 0 |
| Свиной пепсин [12, 13] | 2,75; 2,07 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 |

Для аффинной хроматографии аспергиллопепсина F был применен сорбент, полученный присоединением пептидного антибиотика бацитрацина к сефарозе 4В, — бацитрацин-сефароза [4]. На этой стадии аспергиллопепсин F очищается в 3 раза (рис. 2), повторная хроматография на бацитрацин-сефарозе приводит к увеличению удельной и суммарной активности в 1,5 раза. Последнее можно объяснить тем, что при повторной хроматографии отделяются низкомолекулярные ингибирующие фермент примеси, например продукты автолиза. Следует отметить, что возрастание общей активности нередко наблюдалось в нашей лаборатории при аффинной хроматографии различных протеиназ.

При изоэлектрофокусировании в интервале pH 3–5 аспергиллопепсин F концентрируется в одном активном пике с pH 4,07 (рис. 3), удельная активность при этом возрастает в 1,7 раза. Возможно, здесь также происходит отделение низкомолекулярных ингибиторов. Пик в щелочной зоне соответствует примеси, которая, судя по УФ-спектру, не является белком. После изоэлектрофокусирования для отделения фермента от сахарозы и части амфолинов использовали бацитрацин-сефарозу с последующим обессоливанием на сефадексе G-50.

Гомогенность аспергиллопепсина F была подтверждена наличием одной полосы при электрофорезе в полиакриламидном геле (рис. 4) и определением N-концевой последовательности.

Данные об аминокислотном составе аспергиллопепсина F и других карбоксильных протеиназ рода *Aspergillus* (табл. 2) указывают на большое сходство аспергиллопепсинов F и A. Близки этим ферментам по аминокислотному составу карбоксильные протеиназы из *Asp. saitoi* [8] и из *Asp. oryzae* (вторая выделена и охарактеризована Циута и Эндо [9]). По сравнению с аспергиллопепсинами A и F наблюдаются различия в содержании серина, пролина и триптофана у карбоксильной протеиназы из *Asp. saitoi* и в содержании серина, триптофана, метионина и полуцистина — у фермента из *Asp. oryzae*. Карбоксильная протеиназа из *Asp. oryzae* [10] существенно отличается от перечисленных выше протеиназ прежде всего содержанием основных аминокислот, аспарагиновой кислоты, глицина, аланина. Причины таких различий пока неясны, причем Циута и

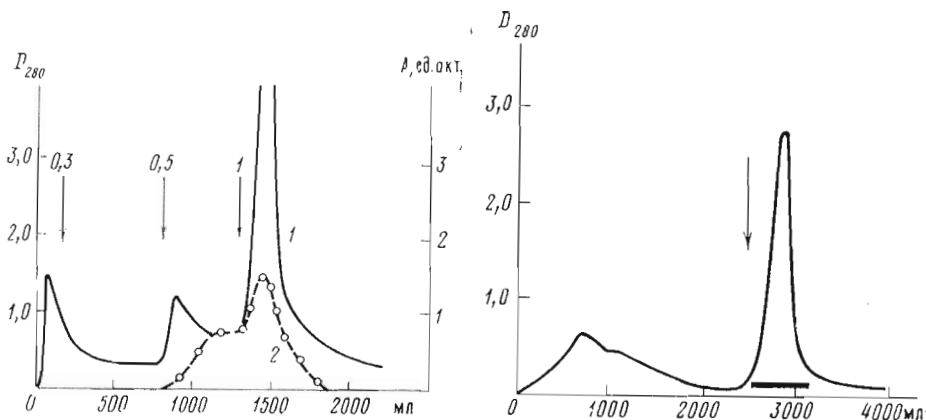


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Хроматография аспергиллопепсина F на аминосилохроме С-80 (колодка 2,5×35 см) в градиенте концентрации ацетатного буфера, рН 4,1. Цифры у стрелок соответствуют молярности ступеней градиента; 1 — поглощение, 2 — активность

Рис. 2. Хроматография аспергиллопепсина F на бацитрацин-сефарозе (колодка 2,5×7 см) с промывкой 0,1 М ацетатным буфером, рН 4,1, и элюцией (показано стрелкой) 20% изопропиловым спиртом в том же буфере, содержащем 1 М NaCl. Отмечена фракция, отбираемая для рехроматографии и изоэлектрофокусирования

Эндо [9] предполагают, что данные, полученные ими и группой Хоффмана [10], относятся к одному и тому же ферменту.

Оптимум действия аспергиллопепсина F по гидролизу гемоглобина находится при рН 2,5, при 20° фермент сохраняет активность в интервале рН 2,5—6,0 в течение 24 ч (рис. 5).

Принадлежность аспергиллопепсина F к классу карбоксильных протеиназ подтверждается также ингибированием фермента N-2,4-динитрофенил-N'-диазоацетилэтилендиамином (на 99,6%) и пепстатином (на 100%).

Свойства аспергиллопепсина F были сравнены со свойствами изучаемого в нашей лаборатории аспергиллопепсина A, других карбоксильных грибных протеиназ и свиного пепсина (табл. 3). Аспергиллопепсин F близок по ряду свойств к другим карбоксильным протеиназам, продуцируемым грибами рода *Aspergillus*. Они характеризуются изоэлектрическими точками в интервале рН 3,65—4,10, оптимумом активности при рН 2,3—2,7 (по гидролизу гемоглобина или казеина), стабильностью в интервале рН 2,5—6,0. Исключение составляет карбоксильная протеиназа гликопротеидной природы из *Asp. oryzae*, выделенная Циута и Эндо [9]. Ими были разделены протеиназы A₁ и A₂, обладающие идентичным аминокислотным составом, но различающиеся по содержанию углеводов и изоэлектрической точке. Карбоксильная протеиназа A₁ содержит 50% углеводов и дает при изофокусировании две активные фракции с pI 3,15 и 3,5. Карбоксильная протеиназа A₂ не содержит углеводов, так же как и другие карбоксильные протеиназы рода *Aspergillus*, близка к ним по аминокислотному составу (см. табл. 2), имеет pI 3,9.

Как видно из табл. 2, карбоксильные протеиназы рода *Aspergillus* содержат относительно много лизина и всего 1—2 остатка аргинина. Карбоксильные протеиназы из *Rhizopus chinensis* [8] содержат значительно больше остатков аргинина и имеют соответственно более высокие значения pI (см. табл. 3). Карбоксильная протеиназа из *Penicillium janthinellum* [8, 11] не содержит аргинина и значительно беднее лизином. Пепсин животных, в частности свиной пепсин, отличается от карбоксильных протеиназ рода *Aspergillus* низким содержанием основных аминокислот и низкой изоэлектрической точкой.

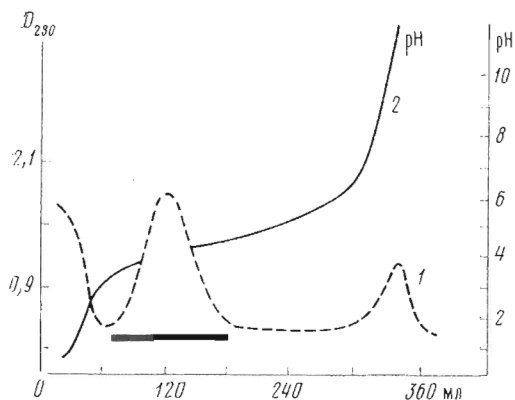


Рис. 3

Рис. 3. Изофокусирование очищенного аспергиллопепсина F (условия см. «Экспер. часть»): 1 — поглощение, 2 — pH. Отмечена фракция, проявляющая ферментативную активность

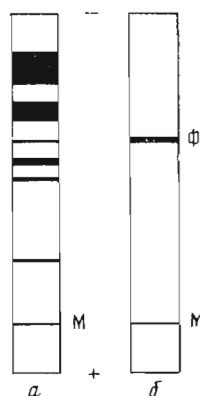
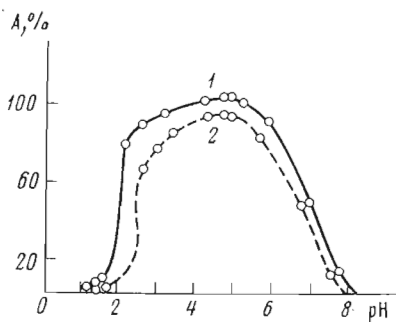


Рис. 4

Рис. 4. Электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле (pH 5,5) исходного препарата «пектофетидина ПЮХ» (а) и препарата аспергиллопепсина F после хроматографии на бацитрацин-сефарозе (2,1 ед. акт./ОЕ) (б). Ф — фермент, М — электрофоретический фронт

N-Концевая последовательность аспергиллопепсина F, определенная автоматическим методом Эдмана (табл. 4), совпадала с N-концевыми последовательностями аспергиллопепсина A и карбоксильной протеиназы из *Asp. saitoi*. К сожалению, пока не удалось идентифицировать некоторые остатки в последовательностях аспергиллопепсинов F и A, в том числе

Рис. 5. Зависимость устойчивости аспергиллопепсина F от pH раствора при инкубации (20°) в течение 1,5 (1) и 24 ч (2). За 100% принята максимальная активность фермента



остатки 18, 19, 26. Есть основания полагать, что эти места заняты соответственно остатками треонина, пролина и треонина. Консерватизм первичных структур N-концевых последовательностей у аспергиллопепсинов трудно объяснить особым функциональным значением этих участков ферментов. N-Концевые участки пепсинов животного происхождения отличаются большей вариабельностью. Приходится предположить, что виды грибов рода *Aspergillus* дивергировали сравнительно недавно и структурный ген, ответственный за синтез карбоксильных протеиназ, не претерпел существенных изменений в процессе эволюции. При сравнении N-концевых последовательностей карбоксильной протеиназы из *Penicillium janthinellum* и карбоксильных протеиназ рода *Aspergillus* обнаруживается минимум 11 замен для 41 аминокислотного остатка. В таком же участке свиного пепсина наблюдается минимум 20 замен по сравнению с аспергиллопепсинами A и F, что свидетельствует о существенных эволюционных изменениях соответствующих структурных генов.

Таблица 4

N-Концевые последовательности карбоксильных протеиназ

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|-------------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|-----|--------------------|
| APF | Ser | Lys | Gly | Ser | Ala | Val | Thr | Thr | Pro | Gln | Asn | Asp | Glu | ¹⁵ Glu- |
| APA | Ser | Lys | Gly | Ser | Ala | Val | Thr | Thr | Pro | Gln | Asn | Asp | Glu | Glu- |
| PP | Ala | Ser | Gly | Val | Ala | Thr | Asn | Thr | Pro | Thr | Ala | Asp | Glu | Glu- |
| SP | | Ile | Gly | Asp | Glu | Pro | Leu | Glu | Asn | Tyr | Leu | Asp | Thr | Glu- |
| APF | -Tyr | Leu | ¹⁸ Thr | ¹⁹ Pro | Val | Thr | Val | Gly | Xxx | Xxx | Thr | - | Leu | Xxx- |
| APA | -Tyr | Leu | Thr | Pro | Val | Thr | Val | Gly | Lys | Ser | Thr | - | Leu | His- |
| PP | -Tyr | Ile | Thr | Pro | Val | Thr | Ile | Gly | Gly | Thr | Thr | - | Leu | Asp- |
| SP | -Tyr | Phe | Gly | Thr | Ile | Gly | Ile | Gly | Thr | Pro | Ala | Asp | Phe | Thr- |
| APF | -Leu | Asx | ³⁰ Phe | Xxx | Xxx | Gly | Xxx | Ala | Asx | Leu | Trp | ⁴¹ Phe | | |
| APA | -Leu | Asx | Phe | Asp | Thr | Gly | Ser | Ala | Asx | Leu | Trp | Phe | | |
| PP | -Leu | Asn | Phe | Asp | Thr | Gly | Ser | Ala | Asp | Leu | Trp | Phe | | |
| SP | -Val | Ile | Phe | Asp | Thr | Gly | Ser | Ser | Asn | Leu | Trp | Pro | | |

Обозначения: APF — карбоксильная протеиназа из *Asp. foetidus*, APA — из *Asp. avamori* [15], PP — из *Penicillium janthinellum* [14], SP — свиной пепсин [14], Xxx — неидентифицированные остатки. Идентификация остатков 18, 19 в аспергиллопепсинах F и A и остатка 26 в аспергиллопепсине F требует подтверждения. Не исключено присутствие Pro в положениях 18 и 26, Thr — в положении 19.

Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья для выделения аспергиллопепсина F использовали коммерческий препарат «пектофоетидин» ПЮХ.

Определение протеолитической активности. [5, 16]. К 1 мл 2% раствора гемоглобина при pH 1,8 и 37° добавляли 0,1 мл испытуемого раствора фермента и инкубировали в течение 10 мин при 37°, затем добавляли 5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты. Осадок отфильтровывали и измеряли оптическую плотность раствора при 280 нм. В контрольных пробах к раствору гемоглобина добавляли сначала трихлоруксусную кислоту, а затем раствор фермента. За единицу протеолитической активности (А) принимали такое количество фермента, которое в условиях определения за 1 мин давало прирост D_{280} 1. Удельную активность выражали в единицах протеолитической активности, отнесенных к оптической плотности исследуемого раствора при 280 нм.

Бацитрацин-сефарозу получали по методике [4].

Изоэлектрофокусирование проводили по методу Вестерберга и Свенсона [17] на приборах LKB (Швеция) в диапазоне pH 3–5 на колонке объемом 440 мл в течение 3 сут при мощности 4,0 Вт. Исходный раствор содержал 700 ед. акт. аспергиллопепсина F с уд. акт. 2,1 ед. акт./ОЕ. По окончании опыта к раствору, содержащему активную фракцию, добавляли 1 М ацетатный буфер (pH 4,1) так, чтобы его концентрация в растворе составила 0,1 М, и наносили на колонку с бацитрацин-сефарозой (5×1 см). Далее колонку промывали тем же буфером и элюировали фермент 25% изопропанолом на 1 М NaCl в 0,1 М ацетатном буфере, pH 4,1. Обессоливание проводили на сефадексе G-50 superfine (100×2 см). Получено 730 ед. акт. аспергиллопепсина F с уд. акт. 3,6 ед. акт./ОЕ.

Определение оптимума pH. Протеолитическую активность аспергиллопепсина F определяли, используя 2% раствор гемоглобина в 0,05 М глицин-HCl-буфере (pH 1,5–2,5) и в 0,1 М ацетатном буфере (pH 2,5–4,0). За 100% принимали максимальную активность фермента. Концентрация фермента в пробах 0,1 мг/мл.

Определение устойчивости при различных pH. Раствор фермента с концентрацией 1 мг/мл выдерживали в течение 1,5 и 24 ч при 20° в 0,2 М ацетат-HCl-буфере (pH 0,7–6,5) и в 0,05 М трис-HCl-буфере (pH 6,8–8,6). Для определения протеолитической активности использовали 2% раствор гемоглобина в 0,05 М глицин-HCl-буфере, pH 2,5. За 100% принимали максимальную активность фермента.

Ингибирование. Ингибирование N-2,4-динитрофенил-N'-диазоацетил-этилпептидином проводили по методу [5]. Ингибирование пепстатином проводили в 0,1 М ацетатном буфере (pH 4,5) при соотношении фермент — ингибитор 1:1 и 1:2 [18].

N-Концевую последовательность определяли автоматическим методом Эдмана на секвенаторе фирмы Beckman (модель 890) [19]. Для растворения аспергиллопепсинов F и A использовали гексафторацетон. Идентификацию фенилтиогидантоинов осуществляли методами газовой и тонкослойной хроматографии. В отдельных случаях проводили в течение 4 ч гидролиз фенилтиогидантоинов 5,7 М HCl при 150° [20], аминокислоты в гидролизатах идентифицировали на аминокислотном анализаторе фирмы Durrum D-500.

Триптофан определяли спектрофотометрически по методике [21].

Электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле проводили в β-аланин-какодилатном буфере (pH 5,5) по методике [22].

Выделение аспергиллопепсина F. 80 г порошка «пектофоетидина» ПЮХ (1410 ед. акт.) растворяли в 1 л 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,25, смесь оставляли на ночь на холоде, осадок отделяли центрифугированием. К раствору добавляли сульфат аммония до 80% насыщения и 5,7 М HCl до pH 5,7. Смесь оставляли на 20 ч на холоде, затем центрифугировали.

Осадок растворяли в 0,01 М ацетатном буфере (рН 5,25) и хроматографировали на акрилексе Р-10 (колонка 100×5 см), уравновешенном тем же буфером. Фракцию, содержащую карбоксильную протеиназу (500 мл раствора, 800 ед. акт.), наносили на колонку с аминсилохромом С-80¹ (2,5×35 см), уравновешенную 0,01 М ацетатным буфером, рН 5,25; колонку промывали этим же буфером, далее буфером рН 4,1 возрастающей концентрации: 0,3; 0,5 и 1 М (рис. 1). Элюат, содержащий карбоксильную протеиназу (750 мл, 800 ед. акт.), разбавляли в 2 раза водой и наносили на колонку с бацитрацин-сефарозой (2,5×7 см), промывали 0,1 М ацетатным буфером (рН 4,1), фермент элюировали 20% раствором изопропилового спирта в 1 М NaCl на 0,1 М ацетатном буфере (рН 4,1), обессоливали на сефадексе G-50 medium. Выход аспергиллопепсина F по активности 52%, уд. акт. 2,1 ед. акт./ОЕ. После лиофильной сушки получено 250 мг фермента. Повторную хроматографию на бацитрацин-сефарозе проводили в тех же условиях (см. табл. 1).

Определение N-концевой последовательности и аминокислотного состава аспергиллопепсина А проводили с препаратом, полученным из сгущенного экстракта поверхностной культуры *Asp. awamori* по приведенной выше методике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Билай В. И. (1965) Биологически активные вещества микроскопических грибов и их применение, «Наукова думка», Киев.
2. Ферменты микроорганизмов (1973) Сб. статей под ред. А. А. Имшенецкого. М.
3. Степанов В. М., Лобарева Л. С., Руденская Г. Н., Боровикова В. П., Ковалева Г. Г., Лавренова Г. И. (1977) Биоорганич. химия, 3, 831–835.
4. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Янович В. В., Остославская В. И., Гончар М. В., Котлова Е. К., Стронгин А. Я. (1978) Биоорганич. химия, 4, 1256–1263.
5. Лобарева Л. С., Ковалева Г. Г., Шиманская М. П., Степанов В. М. (1972) Биохимия, 37, 198–208.
6. Ковалева Г. Г., Юсупова М. П., Лысогорская Е. Н., Балавдина Г. Н., Степанов В. М. (1977) Биохимия, 42, 534–538.
7. Соловьева Т. А., Беляев С. В., Степанов В. М. (1977) Химия природн. соедин., № 3, 398–403.
8. Лобарева Л. С., Степанов В. М. (1978) Успехи биол. химии, т. 19, с. 83–105, «Наука», М.
9. Tsujita Y., Endo A. (1976) Biochim. et biophys. acta, 445, 194–204.
10. Davidson R., Gertler A., Hofmann T. (1975) Biochem. J., 147, 45–53.
11. Cunningham A., Hsin-Min Wang, Jones S. R., Kurosky A., Rao L., Harris C. J., Sung H. Rhoe, Hofmann T. (1976) Can. J. Biochem., 54, 902–904.
12. Стронгин А. Я., Левин Е. Д., Степанов В. М. (1973) Биохимия, 38, 1098–1100.
13. Shlamovitz M., Peterson L. U. (1959) J. Biol. Chem., 234, 3137–3144.
14. Hsu I-Nan, Delbaere L. T. J., James M. N. G., Hofmann T. (1977) Nature, 266, 140–145.
15. Исаева Г. Г., Немцова Е. Я., Лысогорская Е. Н., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Степанов В. М. (1976) Советско-американский симпозиум по химии и физике белка. Тез. докл., с. 67, Рига.
16. Anson M. L. (1938) J. Gen. Physiol., 22, 79–83.
17. Westerberg O., Swensson H. (1966) Acta chem. scand., 20, 820–822.
18. Umezawa H., Aovaji T., Morishima H., Matsuzaki M., Hamada M., Takeushi T. (1970) J. Antibiot., 23, 259–262.
19. Edmann P., Begg G. (1967) Eur. J. Biochem., 1, 80–91.
20. Mendez E., Lai C. Y. (1975) Anal. Biochem., 68, 47–53.
21. Bredderman P. G. (1974) Anal. Biochem., 61, 298–301.
22. Стронгин А. Я., Левин Е. Д., Степанов В. М. (1974) Химия природн. соедин., № 2, 226–229.

Поступила в редакцию
15.IX.1978.

ASPERGILLOPEPSIN F—A CARBOXYLIC PROTEINASE FROM
ASPERGILLUS FOETIDUS

OSTOSLAVSKAYA V. I., KOTLOVA E. K., STEPANOV V. M.,
RUDENSKAYA G. N., BARATOVA L. A., BELYANOVA L. P.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow;
Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

From the mixture of enzymes produced by *Aspergillus foetidus*, a carboxylic proteinase — aspergillopepsin F was isolated. It hydrolyzes hemoglobin with pH-optimum 2.5, has an isoelectric point at 4.07, is stable at pH 2.5–6.0 and is inhibited by N-2,4-dinitrophenyl-N'-diazoacetylhexamethylenediamine, and pepstatin. The enzyme was purified by ion-exchange chromatography on aminosilochrome S-80 and affinity chromatography on bacitracin-Sepharose 4B. The sequence of 41 amino acids from the N-terminal portion of the enzyme, established by automated Edman procedure, shows no difference from that of aspergillopepsin A — a carboxylic proteinase from *Aspergillus awamori*. These proteinases are very similar but not identical as follows from somewhat different amino acid composition. Structural and functional similarities among carboxylic proteinases produced by *Aspergilli* allow to consider them as a separate group of acid proteinases. Aspergillopepsin F reveals pronounced homology with penicillopepsin from *Penicillium janthinellum* and also a substantial extent of homology with swine pepsin.
