



УДК 577.112.6:577.152.34'135

**СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ СЕРИНОВЫМИ
ПРОТЕИНАЗАМИ. ПРИМЕНЕНИЕ ЭФИРОВ АЦИЛПЕПТИДОВ
В КАЧЕСТВЕ КАРБОКСИЛЬНОГО КОМПОНЕНТА***Воюшина Т. Л., Люблинская Л. А., Степанов В. М.**Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

Описано применение субтилизина, эластазы и тиолзависимой сериновой протеиназы *Bac. thuringiensis* в ферментативном синтезе пептидов в водно-органических растворах при pH 7,8–8,1 из метиловых эфиров N-бензилоксикарбонильных проанодных аланина, глицил-аланина, аланил-аланина, аланил-аланил-лейцина с *n*-нитроанилидами лейцина, валина, аланина, фенилаланина в эквимольных количествах. Высокая эффективность эфиров N-ациламинокислот и N-ацилпептидов в реакции ацилирования ферментов позволила резко снизить используемые концентрации протеиназ. Молярные соотношения фермента и исходных реагентов составляли $1 : 1 \cdot 10^4 - 1 : 1 \cdot 10^6$. Выходы продуктов реакции 50–70%.

Ранее нами был описан ферментативный синтез хромогенного субстрата сериновых протеиназ Z-Ala-Ala-Leu-pNA в присутствии бактериальной металлопротеиназы (термолизина), исходя из бензилоксикарбонилдипептида со свободной карбоксильной группой Z-Ala-Ala-OH, а также из его метилового эфира [1]. Последний результат противоречил данным работы [2], свидетельствующим об отсутствии у термолизина эстеразной активности. Мы предположили, что синтез *n*-нитроанилида N-ацилтрипептида в этом случае мог быть обусловлен примесью сериновой протеиназы в использованном образце термолизина фирмы «Serva».

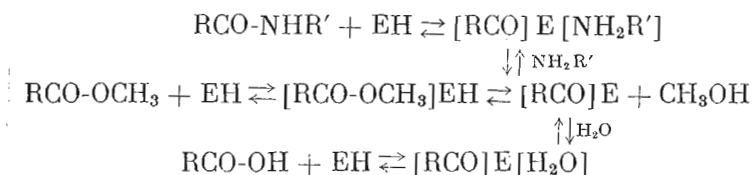
Было установлено, что в присутствии того же препарата термолизина, предварительно обработанного специфическими ингибиторами сериновых протеиназ (фенилметилсульфонилфторидом или диизопропилфторфосфатом), образования пептидной связи между Z-Ala-Ala-OCH₃ и Leu-pNA не происходит, хотя характерная для термолизина активность сохраняется, и синтез трипептида из Z-Ala-Ala-OH в присутствии обработанного ингибиторами термолизина протекает как обычно.

Эти данные подтвердили присутствие в препарате термолизина сериновой протеиназы. Для примерной оценки количества этой примеси проводили длительный гидролиз ферментным препаратом субстрата сериновых протеиназ Z-Ala-Ala-Leu-pNA. Чтобы предотвратить расщепление термолизином пептидной связи Ala-Leu в молекуле субстрата, гидролиз осуществляли в присутствии 8 мМ EDTA. Если предположить, что коэффициент молярного поглощения и удельная активность для сериновой протеиназы *Bacillus thermoproteolyticus* и детально изученной бактериальной сериновой протеиназы — субтилизина Карлсберг близки, то, по приближительной оценке, содержание примеси в данном образце термолизина составляет около $3 \cdot 10^{-3}$ %. Столь малое количество, разумеется, не может быть обнаружено обычными методами, применяющимися для проверки чистоты ферментных препаратов, — например, электрофорезом в полиакриламидном геле или гидролизом специфических субстратов в стандартных условиях. Таким образом, реакция образования Z-Ala-Ala-Leu-pNA из N-ацилированного эфира оказалась очень чувствительным тестом, определяющим следовые количества сериновых протеиназ в препаратах металлопротеиназ. Было показано, что термолизин фирмы «Boehringer», а также другие партии термолизина «Serva» подобных примесей не содержат и не катализируют образование пептидной связи между Z-Ala-Ala-OCH₃ и Leu-pNA.

Использованы сокращения аминокислот, предложенные комиссией IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре. pNA — *n*-нитроанилидо, DMF — диметилформамид. Все аминокислоты L-ряда.

Высокая активность обнаруженной нами примеси сериновой протеиназы в пептидном синтезе позволила предположить, что эфиры N-ацилпептидов могут быть с успехом использованы в синтезе пептидов бактериальными сериновыми протеиназами.

Синтез пептидной связи в присутствии сериновых протеиназ протекает с образованием промежуточного ацилферментного комплекса.



Карбоксильная группа в эфирах N-ацилпептидов в достаточной мере активирована, и ацилирование ими фермента происходит значительно быстрее, чем соответствующими N-ацилпептидами со свободной COOH-группой. Ацилфермент подвергается нуклеофильной атаке аминным компонентом или водой. Результатом первой реакции является пептидный синтез, результатом второй — гидролиз эфира. Так как аминокомпонент, соответствующий специфичности положения S₁' фермента, связывается с ним, его локальная концентрация оказывается высокой, что обеспечивает преимущественное образование пептидной связи.

Ранее были описаны попытки использования субтилизина — сериновой протеиназы бацилл для синтеза пептидной связи, однако во всех случаях карбоксильными компонентами служили N-ацилпептиды и N-ациламинокислоты со свободной COOH-группой [3–5]. При этом синтез дипептидов из Z-Phe и различных производных лейцина в присутствии субтилизина практически не происходил при 10-кратном избытке аминокомпонента и молярном соотношении фермент — карбоксильный компонент 1 : 50. При удлинении пептидной цепи карбоксильного компонента улучшается его связывание ферментом, и удолетворительные выходы достигаются уже при 4-кратном избытке аминокомпонента. Тем не менее использовались очень высокие концентрации фермента, например молярное соотношение фермент — карбоксильный компонент 1 : 1000 [3], что, видимо, вызвано стремлением увеличить скорость синтеза.

Изова и сотрудники применили субтилизин для синтеза тетра- и гексапептидов, используя N-ацилдипептид в качестве карбоксильного компонента при эквимольном соотношении исходных реагентов и высокой концентрации фермента (молярное соотношение фермента и исходных реагентов 1 : 200 и 1 : 500). Выходы тетра- и гексапептида составили 35 и 73% соответственно [4, 5].

Так как субтилизин является сериновой протеиназой и, следовательно, синтез пептидной связи в его присутствии протекает через промежуточный ацилфермент, образующийся с высокой скоростью, можно предположить, что использование эфиров N-ацилпептидов в качестве карбоксильных компонентов позволит существенно снизить концентрацию фермента.

Целью настоящей работы было исследование синтеза пептидной связи из эфиров N-ацилированных пептидов и n-нитроанилидов аминокислот в присутствии сериновых протеиназ *Bac. subtilis*, *Bac. thuringiensis* и эластазы.

В качестве модельной реакции мы использовали конденсацию Z-Ala-Ala-OCH₃ с Leu-pNA. Синтез проводили в водно-органической среде при 20°С и эквимольном соотношении компонентов (табл. 1). Общая концентрация органических растворителей (диметилформамид и этилацетат) в смеси составляла ~65% по объему. Буферность реакционной среды обеспечивалась высокой концентрацией аминокомпонента (~0,54 М) — n-нитроанилида лейцина, который, являясь слабым основанием, поддерживает рН в интервале 7,8–8,1, удобном для проведения конденсации.

Полученные данные показали, что в этих условиях действительно для синтеза достаточны очень малые количества субтилизина. Реакция идет

Оптимизация условий синтеза Z-Ala-Ala-Leu-pNA, субстрата сериновых протеиназ, субтилизином Карлеберг *

рН среды	Фермент, ммоль	Выход, %	Аминокислотный состав	
			Ala	Leu
7,8–8,1	0,17	52	1,96	1,04
7,8–8,1	0,69	66	1,95	1,05
7,8–8,1 ^{2*}	0,14	75	1,89	1,10
7,8–8,1 ^{3*}	0,10	55	2,0	1,0
8,9	0,17	69	1,90	1,09
7,88	0,17	73	1,95	1,05
7,40	0,17	43	2,0	1,0

* Условия реакции: 0,5 ммоль Z-Ala-Ala-OCH₃, 0,5 ммоль H-Leu-pNA, 500 мкл DMF, 100 мкл, этилацетата 320 мкл H₂O.

^{2*} Содержание H-Leu-pNA 0,75 ммоль.

^{3*} Реакционная смесь содержит дополнительно 1 M NaCl.

с хорошими выходами при молярном соотношении фермента и исходных реагентов 1 : 3·10⁶. При этом концентрации фермента и исходных реагентов составляли 1,7·10⁻⁴ мМ и 0,54 M соответственно. Это соотношение на порядок больше использованного другими авторами при образовании пептидной связи из эфиров N-ацилированных пептидов, катализируемом сериновыми протеиназами. Например, применялись следующие молярные соотношения фермента и одного из исходных веществ: для трипсина — 1 : 1380 [6], 1 : 390 — 1 : 1250 [7], 1 : 1·10⁴ [8]; для α-химотрипсина — 1 : 36 [6], 1 : 360 — 1 : 590 [7], 1 : 145 — 1 : 800 [9], 1 : 5·10³ [10]; для карбоксипептидазы Y — 1 : 500 [7], 1 : 6,6·10³ [11], 1 : 5·10⁴ [11]. При синтезе в присутствии карбоксипептидазы Y пониженное содержание фермента компенсировалось 250-кратным избытком аминокомпонента.

Применение столь высоких концентраций ферментов в этих и некоторых других случаях объяснить не просто. Зачастую, видимо, условия конденсации не оптимизировались, и используемые количества протеиназ значительно превышали действительно необходимые. В некоторых случаях для синтеза использовались эфиры ациламино кислот, что могло вызвать необходимость существенного увеличения содержания фермента в смеси. Кроме того, содержание ферментов могли повышать, стремясь компенсировать снижение их каталитической активности, а иногда и стабильности в присутствии органических растворителей.

В примененной нами схеме синтеза пептидов сдвиг равновесия в сторону образования конечных продуктов достигается за счет использования эфиров N-ацилпептидов, облегчающих ацилирование фермента, однако различие растворимостей конечных и исходных продуктов, видимо, также играет существенную роль. В описанном ранее синтезе Z-Ala-Ala-Leu-pNA из Z-Ala-Ala-OH и Leu-pNA в присутствии термолизина выходы близки к теоретическим и составляли 92% [1]. Оба исходных вещества обладают ионогенными группами и в отличие от продукта реакции достаточно хорошо растворимы в 25% водном диметилформамиде, что способствует высокому выходу. Однако в цитируемой работе концентрация фермента при синтезе намного больше, чем в случае использования субтилизина (молярное соотношение термолизин — исходные реагенты 1 : 1000).

Применение в качестве карбоксильных компонентов эфиров N-ацилпептидов, менее растворимых в условиях проведения конденсации, требует повышенного содержания органического растворителя (~65%), что приводит к лучшей растворимости продукта в реакционной среде и, следовательно, несколько меньшему его выходу. Сколько-нибудь заметного отщепления *n*-нитроанилина, которое могло быть результатом вторичного гидролиза субтилизином продукта реакции, находящегося в растворе, не наблюдалось. Повышение ионной силы раствора, а также 8-кратное уве-

Влияние структуры amino- и карбоксильного компонента на выход продукта реакции при синтезе пептидов субтилизином Карлсберг *

Карбоксильный компонент	Амино-компонент	Фермент ммоль	Выход, %	Аминокислотный состав		$[\alpha]_D^{25}$, град
Z-Ala-Ala-OCH ₃	Phe-pNA	0,16	21	Ala : Phe	1,94 : 1,07	+18
Z-Ala-Ala-OCH ₃	Val-pNA	0,05	62	Ala : Val	2,09 : 0,93	-10
Z-Gly-Ala-OCH ₃	Leu-pNA	0,32	54	Gly : Ala : Leu	1,05 : 0,98 : 0,96	-9
Z-Gly-Ala-OCH ₃	Ala-pNA	0,32	80	Gly : Ala	1,09 : 1,91	+8
Z-Ala-Ala-Leu-OCH ₃	Phe-pNA	0,32	14	Ala : Leu : Phe	2,10 : 1,09 : 0,81	-13
Z-Ala-Ala-Leu-OCH ₃	Phe-pNA	1,09	68	Ala : Leu : Phe	2,06 : 0,94 : 0,98	-35
Z-Ala-Ala-Leu-OCH ₃	Ala-pNA	0,32	41	Ala : Leu	3,00 : 1,00	-35
Z-Ala-OCH ₃ **	Leu-pNA	6,90	53	Ala : Leu	1,01 : 0,98	+8

* Условия реакции: исходные компоненты по 500 мкмоль, 500 мкл DMF, 100 мкл этилацетата, 340 мкл воды.

** Реакционная смесь содержит по 100 мкмоль исходных компонентов.

личение концентрации фермента и использование 1,5-кратного избытка аминокислотного компонента существенного влияния на выход не оказывают.

В табл. 2 представлен ряд синтезированных в присутствии субтилизина *n*-нитроанилидов *N*-ацилпептидов. Изучая специфичность субтилизина при гидролизе синтетических субстратов, Морихара и сотр. [12] показали, что скорость гидролиза падает с увеличением бокового радикала гидрофобной аминокислоты в положении P_1 в ряду Ala > Gly > D-Ala > Leu > Phe.

Природа этого аминокислотного остатка влияет в основном на каталитическую константу, а не на связывание субстрата. Такой же характер специфичности фермента к аминокислотам в положении P_1 сохраняется и при синтезе. При конденсации Z-Ala-Ala-OCH₃ с различными аминокислотными компонентами выход продукта реакции падает с увеличением боковой цепи гидрофобной аминокислоты в ряду Ala > Val > Leu > Phe.

Однако этот ряд, видимо, отражает соотношение скоростей образования пептидов, а не положение равновесия, поэтому увеличение концентрации фермента повышает выход пептидов, содержащих аминокислоты, мало соответствующие его специфичности. Так, при конденсации Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ и Phe-pNA при молярном соотношении субтилизина и исходных реагентов 1 : 1,4 · 10⁶ и 1 : 4,6 · 10⁵ выход продукта реакции составил 14 и 68% соответственно.

Несколько большая концентрация фермента требуется при синтезе дипептидов. Например, Z-Ala-Leu-pNA получен с выходом 53% из Z-Ala-OCH₃ и Leu-pNA при эквимолярном соотношении реагентов и соотношении субтилизина и исходных 1 : 1,4 · 10⁴. Для получения аналогичного пептида Z-Phe-Leu-NHC₆H₅ из Z-Phe и анилида лейцина с выходом 89% Морихара и др. [3] использовали 20-кратный избыток аминокислотного компонента и соотношение фермент — карбоксильный компонент 1 : 5.

Практически такие же результаты дает применение другой сериновой трипозависимой протеиназы — *Bac. thuringiensis* [13], фермента, по специфичности близкого к субтилизину (табл. 3). Молярное соотношение протеиназы и исходных веществ при синтезе составляло 1 : 1,4 · 10⁶.

Представляет интерес применение в ферментативном синтезе не использовавшейся ранее для этой цели эластазы (табл. 3). Более узкая специфичность этого фермента по отношению к аминокислотам в положениях P_1 и P_2 ограничивает область его применения гидрофобными аминокислотами с небольшим боковым радикалом — Ala, Gly. Кроме того, для достижения удовлетворительных выходов продукта по сравнению с субтилизином требуются большие концентрации фермента (молярное соотношение фермент — исходные компоненты 1 : 5 · 10⁴), которые тем не менее намного ниже ранее применявшихся концентраций других сериновых протеиназ.

Для сравнения был проведен ряд синтезов, катализируемых субтилизином, с использованием *N*-ацилпептидов со свободной COOH-группой в качестве карбоксильного компонента в условиях, аналогичных синтезу

Синтез *n*-нитроанилидов N-ацилпептидов эластазой и тиолзависимой сериновой протеиназой *

Карбоксильный компонент	Аминокомпонент	Фермент, ммоль	Выход, %	Аминокислотный состав		
				Gly	Ala	Leu
<i>Bac. thuringiensis</i>						
Z-Ala-Ala-OCH ₃	Leu-pNa	0,10	69	—	1,96	1,03
Z-Ala-Ala-OCH ₃	Leu-pNa	0,04	54	—	2,0	1,1
Z-Ala-Ala-OCH ₃	Leu-pNa	0,07	81	—	1,95	1,04
<i>Эластаза</i>						
Z-Ala-Ala-OCH ₃	Leu-pNa	2,0	73	—	2,06	0,95
Z-Gly-Ala-OCH ₃	Ala-pNA	4,0	69	1,02	1,98	—
Z-Ala-OCH ₃	Ala-pNA	10,0	77	—	—	—
Z-Ala-OCH ₃ **	Leu-pNA	2,0	49	—	0,96	1,03

* Условия реакции: исходные реагенты по 100 мкмоль, 100 мкл DMF, 20 мкл этилацетата, 80 мкл H₂O.

** Реакционная смесь содержит по 50 мкмоль исходных компонентов, остальное так же.

Таблица 4

Использование N-ацилпептидов со свободной COOH-группой в пептидном синтезе в присутствии субтилизина *

Карбоксильный компонент	Аминокомпонент	Фермент, ммоль	Выход, %	Аминокислотный состав			
				Gly	Ala	Leu	Phe
Z-Ala-Ala-OH	Leu-pNA	17,20	Следы	—	—	—	—
Z-Ala-Ala-Leu-OH	Phe-pNA	5,40	12	—	1,90	1,05	1,09
Z-Ala-Ala-Leu-OH ^{2*}	Phe-pNA	5,17	74	—	2,00	0,99	0,99
Z-Ala-Ala-Leu-OH ^{2*}	Phe-pNA	13,70	82	—	2,00	1,01	1,00
Z-Gly-Ala-Ala-OH ^{3*}	Ala-pNA	5,17	29	0,94	3,00	—	—

* Реакционная смесь содержит по 100 мкмоль исходных компонентов, 100 мкл DMF, 100 мкл воды.

^{2*} Реакционная смесь содержит 200 мкмоль Z-Ala-Ala-Leu и 100 мкмоль Leu-pNA, остальное так же.

^{3*} Реакционная смесь содержит по 200 мкмоль исходных компонентов, 100 мкл DMF, 100 мкл воды.

в присутствии термолизина (табл. 4). При этом еще раз выявилось преимущество использования эфиров ацилпептидов. Конденсация Z-Ala-Ala-OH и Leu-pNA в присутствии субтилизина практически не идет даже при относительно высоких концентрациях фермента (молярное соотношение фермент — исходные реагенты 1 : 3 · 10⁴). Удлинение карбоксильного компонента на одну аминокислоту при той же концентрации фермента приводит к заметному образованию тетрапептида, видимо, за счет лучшего связывания Z-Ala-Ala-Leu с протяженным активным центром субтилизина.

Стадией, лимитирующей скорость процесса при синтезе пептидной связи в присутствии субтилизина из N-ацилпептидов со свободной COOH-группой, является ацилирование фермента, поэтому для достижения хороших выходов продуктов реакции требуется гораздо более высокая, чем в случае эфиров N-ацилпептидов, концентрация фермента и 2-кратный избыток карбоксильного компонента. Так, при синтезе Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA из Z-Ala-Ala-Leu-OH и Phe-pNA молярное соотношение фермента и карбоксильного компонента 1 : 6,7 · 10³, а при синтезе из соответствующего эфира — 1 : 4,6 · 10³.

Таким образом, использование эфиров N-ацилпептидов в качестве карбоксильных компонентов при ферментативном синтезе сериновыми про-

теиназамы позволяет получать хорошие выходы продукта при незначительном расходе фермента, что может оказаться удобным для препаративных целей.

Экспериментальная часть

В работе использованы кристаллический термоллизин (Serva, Boehringer, ФРГ) субтилизин Карлсберг (Novo, Дания), суспензия эластазы (Serva, ФРГ) и чистая тиолзависимая сериновая протеиназа из культуральной жидкости *Bac. thuringiensis*, выделенная в нашей лаборатории [13], с удельной активностью по синтетическому субстрату Z-Ala-Ala-Leu-pNA 130 ед. акт./ОЕ₂₈₀*

Производные аминокислот и пептидов: Leu-pNA, Ala-pNA, Phe-pNA (Олайн), Z-Ala-Ala-OH, Z-Ala-Ala-OCH₃, Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃, Z-Gly-Ala-OCH₃ [14], Val-pNA [15] — получены в нашей лаборатории. Гомогенность полученных соединений подтверждали с помощью ТСХ на пластинках марки «Silufol» в системах *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота (10 : 15 : 12 : 3), хлороформ — 5% муравьиная кислота.

Кислотный гидролиз проводили в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 110° С, 24 ч), гидролизат анализировали на автоматическом аминокислотном анализаторе Biotronik LC 5000 (ФРГ).

Ниже приведены типичные методики получения пептидов с помощью субтилизина, эластазы и тиолзависимой сериновой протеиназы *Bac. thuringiensis*.

Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA. К раствору 213 мг (0,5 ммоль) Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ и 144 мг (0,5 ммоль) Phe-pNA в 500 мкл DMF и 100 мкл этилацетата при перемешивании по каплям добавляли 140 мкл воды и 90 мкл раствора субтилизина в воде (1 мл содержит 0,35 ОЕ₂₈₀). Смесь перемешивали 2 ч при 20° С, затем выдерживали 12 ч при 5° С. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре последовательно 0,5 н. NaHCO₃ (5×25 мл), водой (2×25 мл), 0,5 н. HCl (5×25 мл), водой (5×25 мл) и высушивали в вакуум-эксикаторе над P₂O₅. Выход 235 мг (68%). $[\alpha]_D^{25} -13^\circ$ (с 1, DMF).

Z-Ala-Leu-pNA. К раствору 23,7 мг (100 мкмоль) Z-Ala-OCH₃ и 25,0 мг (100 мкмоль) Leu-pNA в 100 мкл DMF и 10 мкл этилацетата при перемешивании добавляли 50 мкл воды и 55 мкл раствора эластазы в воде, содержащего 275 мкг фермента. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при 20° С и 12 ч при 5° С. Осадок растворяли в этилацетате (2 мл) и промывали последовательно 0,5 н. NaHCO₃ (5×1 мл), водой (2×1 мл), 0,5 н. HCl (5×1 мл), водой (5×1 мл), высушивали над Na₂SO₄, упаривали в вакууме. Выход 22 мг (49%). $[\alpha]_D^{25} +8^\circ$ (с 1, DMF).

Z-Ala-Ala-Leu-pNA. К раствору 31 мг (100 мкмоль) Z-Ala-Ala-OCH₃ и 25,4 мг (100 мкмоль) Leu-pNA в 100 мкл и 10 мкл этилацетата добавляли 60 мкл воды и 2 мкг сериновой протеиназы *Bac. thuringiensis* в 20 мкл воды. Смесь выдерживали 1 ч при 20° С и 12 ч при 5° С. Выпавший осадок растворяли в 2 мл этилацетата и промывали, как описано выше. Выход 21 мг (81%). $[\alpha]_D^{25} -9^\circ$ (с 1, DMF).

ЛИТЕРАТУРА

1. Люблинская Л. А., Воюшина Т. Л., Степанов В. М. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 12, с. 1620–1623.
2. Holmquist B., Vallee B. L. Biochemistry, 1976, v. 15, № 1, p. 101–107.
3. Morihara K., Oka T. J. Biochem., 1981, v. 89, № 2, p. 385–395.
4. Iwata Y., Ohmori M., Ichikawa T., Kurita H., Sato M., Mori K. Bull. Chem. Soc. Jap., 1977, v. 50, № 10, p. 2762–2765.
5. Iwata Y., Ohmori M., Sato M., Mori K. Bull. Chem. Soc. Jap., 1977, v. 50, № 10, p. 2766–2772.
6. Kullmann W. J. Org. Chem., 1982, v. 17, № 27, p. 5300–5303.
7. Kullmann W. J. Prot. Chem., 1984, v. 2, № 4, p. 289–301.
8. Morihara K., Oka T. J. Biochem., 1978, v. 84, № 5, p. 1277–1283.
9. Kullmann W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 17, p. 3234–3239.

* Авторы благодарят О. П. Загнитко за работу по выделению фермента.

10. Oka T., Morihara K. In: Peptide Chemistry/Ed. Nakajima T., 1976, S. 9, Protein Research Foundation, Osaka, 1977. Цит. по Jakubke H.-D., Kuhl P. Pharmazie, 19 2, B. 37, H. 2, S. 89-106.
11. Breddam K., Johansen J. T. Carlsberg Res. Communs, 1983, v. 48, № 4, p. 231-237.
12. Morihara K., Oka T., Tsuzuki H. Arch. Biochem. and Biophys., 1970, v. 138, № 2, p. 515-525.
13. Епремян А. С., Честухина Г. Г., Азизбеян Р. Р., Нетыхса Е. М., Руденская Г. Н., Степанов В. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 5, с. 920-929.
14. Bosshard H. R., Schechter J., Berger A. Helv. chim. acta, 1973, v. 56. № 2, p. 717-723.
15. Раменский Е. В., Богвилик М. М., Бейсембаева Р. У. Химия природн. соедин., 1968, т. 4, № 1, с. 23-27.

Поступила в редакцию
26.XII.1984

PEPTIDE SYNTHESIS CATALYZED BY SERINE PROTEINASES. ACYLPEPTIDE ESTERS AS CARBOXYL COMPONENTS

VOYUSHINA T. L., LYUBLINSKAYA L. A., STEPANOV V. M.

All-Union Institute of Genetics and Selection of Industrial

Microorganisms, Moscow

Subtilisine, elastase and a thiol-dependent serine proteinase from *B. thuringiensis* have been used to prepare peptides Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Z-Gly-Ala-Leu-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-pNA, and Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA by condensation of methyl esters of peptide derivatives with corresponding *p*-nitroanilides in water-organic solvent at pH 7.8-8.1. Molar ratios of the enzyme and starting substaces were $1,1 \cdot 10^4$ to $1,1 \cdot 10^6$, with the yields of products 50 to 70%.