

УДК 577.15.08;577.152.34

РЕКОМБИНАНТНАЯ ХИМОТРИПСИНОПОДОБНАЯ ПЕПТИДАЗА *Tenebrio molitor* С НЕКАНОНИЧЕСКИМ СУБСТРАТ-СВЯЗЫВАЮЩИМ САЙТОМ

© 2024 г. В. Ф. Терешенкова¹, Н. И. Жиганов², А. С. Губаева¹, Ф. И. Акентьев^{3, 4}, Я. Е. Дунаевский⁵, Д. Г. Козлов³, М. А. Белозерский⁵, Е. Н. Эллидина^{5, *}

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

⁴“Курчатовский геномный центр”, НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

⁵Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия

*e-mail: elp@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 08.01.2024 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

Охарактеризована щелочная химотрипсиноподобная сериновая пептидаза большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* с неканоническим субстрат-связывающим субсайтом, которая может быть использована в качестве добавки в различные биопрепараты. Фермент был получен в форме рекомбинантного препарата, очистка была проведена с использованием аффинной хроматографии на Ni²⁺-НТА агарозе. Было определено, что константы специфичности (k_{cat}/K_m) для субстратов химотрипсина Glp-AAF-pNA, Suc-AAPF-pNA и Ac-Y-pNA составляли 7.0, 4.2 и 0.9 (мкМ·мин)⁻¹ соответственно. Оптимум активности наблюдался при pH 9.0. Фермент был стабилен при щелочных pH, в присутствии БСА также и при кислых pH. Пептидаза ингибировалась синтетическими ингибиторами, такими как RMSF, TPCK, химостатин, в то время как ЭДТА, E-64, пепстатин не влияли на активность фермента. Очищенный фермент продемонстрировал высокую стабильность в течение 2.5 ч в присутствии БСА. Короткий жизненный цикл насекомого и секреция множества пептидаз в средней кишке с высокой каталитической активностью и стабильностью могут сделать *T. molitor* отличным альтернативным источником промышленно важных ферментов для использования в качестве добавок в различных биопрепаратах (например, пятновыводителях, моющих средствах и т. п.).

Ключевые слова: сериновые пептидазы, химотрипсиноподобные пептидазы, протеолитические ферменты, пептидазы насекомых, SerP38, *Tenebrio molitor*

DOI: 10.31857/S0555109924030045 EDN: EXBTGS

В связи с бурным развитием биотехнологии наблюдается растущий интерес и спрос на ферменты с новыми свойствами. Пептидазы, которые играют важную роль в метаболизме всех форм жизни, включая прокариот, грибы, растения и животных, составляют почти 60% от общего объема промышленного рынка ферментов [1]. Изучение различных свойств пептидаз является необходимым и непрерывным процессом как из-за их физиологической важности, так и из-за широкого применения в научных исследованиях и промышленности [2, 3]. Большой коммерческий спрос обуславливает непрекращающийся поиск альтернативных источников пептидаз с подходящей специфичностью и широким диапазоном устойчивости к различным факторам внешней

среды. Щелочные пептидазы бактерий и грибов являются основным источником для промышленного применения [4, 5]. Пептидазам насекомых уделяется относительно меньшее внимание, чем микробным протеазам. Однако пептидазы насекомых могли бы стать отличными кандидатами для промышленного применения. Протеолиз – это важная часть переваривания пищи у насекомых, и он опосредуется согласованным действием нескольких пептидаз [6–8]. Сериновые пептидазы из кишечника насекомых, охарактеризованные у *Osphranteria coerulea* Redtenbacher, *Periplaneta americana* L., *Glyphodes pyloalis* Walker и др., обладали важными свойствами, такими как стабильность при высоких температурах и высокая активность при щелочных pH [8–10].

Сериновые пептидазы представляют собой очень разнообразную группу протеолитических ферментов и относятся к наиболее хорошо изученным и охарактеризованным с биохимической точки зрения пептидазам млекопитающих. Одно из наиболее важных семейств сериновых пептидаз S1 включает такие ферменты, как трипсины, химотрипсины и эластазы, которые обладают очень консервативной каталитической триадой His-Asp-Ser. Однако в случае насекомых число работ, связанных с выделением и биохимической идентификацией сериновых пептидаз, достаточно ограничено, хотя они являются важнейшими протеолитическими ферментами, ответственными за пищеварение, развитие и другие процессы, включая передачу сигналов и иммунные реакции у насекомых [11–14]. Активные химотрипсиноподобные пептидазы мало охарактеризованы, что мешает их коммерческому использованию. Между тем биоинформатические исследования последних лет выявили огромное разнообразие сериновых пептидаз у насекомых. Так, у плодовой мушки *Drosophila melanogaster* было выявлено 190 генов предположительно активных сериновых пептидаз [15], у комара *Anopheles gambiae* 220 генов [16], у капустной моли *Plutella xylostella* (L.) 120 генов [17]. В геномных и транскриптомных исследованиях гены пищеварительных пептидаз демонстрируют максимальные уровни экспрессии. Но если свойства трипсинов насекомых очень близки к ферментам других животных, то химотрипсины и химотрипсиноподобные пептидазы отличаются по ряду свойств от ферментов позвоночных животных. Отнесение указанных ферментов к химотрипсинам во многом обусловлено их субстратной специфичностью, проявляющейся в способности гидролизовать синтетические субстраты, содержащиеся в положении P1 остатке ароматических аминокислот – Phe, Tyr, реже остаток алифатического Leu. Для химотрипсинов насекомых при этом наблюдается явное предпочтение более длинных пептидных субстратов, таких как Suc-AAPF-pNA, в то же время короткие субстраты, такие как Suc-F-pNA, гидролизуются гораздо менее эффективно. Это наблюдение было подтверждено для пищеварительных химотрипсинов насекомых, относящихся к разным видам (*Tenebrio molitor*, *Periplaneta americana*, *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda*) [18, 19]. В работе [20] было показано, что для химотрипсинов насекомых наиболее предпочтителен остаток Phe в положении P1, гораздо менее эффективен остаток Tyr. Поэтому для обнаружения химотрипсиноподобных пептидаз у насекомых обычно используют более длинные субстраты, содержащие остаток Phe в P1.

Многообразие химотрипсиноподобных пептидаз с разной чувствительностью к ингибиторам у насекомых позволяет им адаптироваться к пище, содержащей различные ингибиторы. Так, в работе

[21] на насекомых *Helicoverpa zea* и *Agrotis ipsilon* было продемонстрировано, что если в их диете отсутствовал соевый ингибитор трипсина (STI), способный ингибировать также химотрипсин, то их химотрипсины были чувствительны к данному ингибитору. В то же время, если диета насекомых включала 1% STI, их химотрипсины оказывались нечувствительны к его действию.

Был проведен анализ объединенных транскриптомов кишечника личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* и транскриптомов разных стадий онтогенеза этого жука, который позволил обнаружить 269 транскриптов сериновых пептидаз семейства химотрипсина S1, включающих транскрипты 137 активных пептидаз, 125 неактивных гомологов и 7 полипептидаз, содержащих в своем составе как активные пептидазы, так и неактивные гомологи. Их подробное изучение позволит получить новые знания об эволюции пептидаз, а также о механизмах пищеварения и метаболизма у насекомых.

В ряду выявленных пептидаз обращает на себя внимание пептидаза SerP38 (Serine Peptidase 38). Ген этого фермента относится к числу наиболее высокоэкспрессируемых сериновых пептидаз семейства S1 в кишечнике личинок *T. molitor* и предположительно участвует в пищеварительном процессе. Важным отличием SerP38 является неканонический состав субстрат-связывающего субсайта S1, характерный только для членистоногих животных. В настоящее время такие ферменты у млекопитающих неизвестны. Выявленная у сериновой пептидазы SerP38 структурная особенность вызывает интерес к ее изучению. У крабов пептидаза с подобным составом субсайта S1 гидролизует субстраты как химотрипсина, так и трипсина, а также коллаген [22, 23], в то время как у единственного охарактеризованного фермента насекомого, *Solenopsis invicta*, выявлена только активность по отношению к субстратам химотрипсина [24].

Характеристика пептидазы SerP38 может расширить наши представления о разнообразии и функциональных свойствах сериновых пептидаз семейства S1 и позволит углубить понимание их роли в биологических процессах.

Цель работы – характеристика физико-химических и энзиматических свойств рекомбинантной сериновой пептидазы rSerP38 *T. molitor*.

МЕТОДИКА

Материалы. В работе использовали следующие реактивы: акриламид, метилен-бис-акриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) (“Reanal”, Венгрия), персульфат аммония, додецилсульфат натрия, кумасси G-250 (“Serva”, Германия), 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил] этансульфоновая кислота (HEPES), имидазол

(“Panreac”, США), уксусная кислота (“Реахим”, Россия), бычий трипсин (КФ 3.4.21.4) (“Sigma”, США). Ингибиторы: транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо-(4-гуанидино)-бутан (E-64), пепстатин А, N α -тозил-L-лизин хлорметилкетон гидрохлорид (TLCK), химостатин (“Sigma”, США), фенолметилсульфонил фторид (PMSF) (“Serva”, Германия), тозил-L-фенилаланин хлорметилкетон (TPCK) (“Merck”, США), соевый ингибитор трипсина Кунитца (“Fluka”, Швейцария), ингибитор трипсина из яичного белка, ингибитор трипсина из фасоли (“ICN Biomedicals”, США), Ni²⁺-NTA агароза (“GE Healthcare”, США). Субстраты: Suc-AAPF-pNA (Suc N-сукцинил, pNA остаток *n*-нитроанилина), Suc-AAA-pNA, MeOSuc-AAPV-pNA (MeOSuc N-метоксисукцинил), Suc-AAPL-pNA, Glp-AAL-pNA (Glp остаток пироглутаминовой кислоты), Z-FR-pNA (Z N-бензилоксикарбонил), Z-RR-pNA, Bz-R-pNA (Bz N α -бензоил), Suc-AAPF-AMC (AMC остаток 7-амино-4-метил-кумарина), Z-FR-AMC (“Bachem”, Швейцария); Ac-Y-pNA (Ac ацетил) (“Serva”, Германия), Glp-FL-pNA, Glp-AAF-pNA, Glp-F-pNA, Ac-F-pNA, Suc-F-pNA, For-AAL-pNA (For формил), Glp-FQ-pNA и Glp-FA-pNA – были синтезированы по стандартным методикам [25] в лаборатории химии белка кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова. Рекомбинантные препараты пробелка rProSerP38 и зрелой пептидазы rSerP38 *T. molitor* были получены в НИЦ “Курчатовский институт” (Россия) [26].

Определение активности рекомбинантного препарата rSerP38 *T. molitor* по хромогенным субстратам. Ферментативную активность пептидазы определяли по начальной скорости гидролиза хромогенного пептидного субстрата, содержащего остаток *n*-нитроанилина для детекции. В ячейку микропланшета вносили от 5 до 20 мкл препарата фермента, после чего добавляли 20 мМ Tris-HCl буфер, pH 8.0, или 0.1 М ацетат-фосфат-боратный универсальный буфер (УБ), pH 7.9 [27] до конечного объема 195 мкл. Смесь инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Затем добавляли 5 мкл раствора субстрата в диметилформамиде (ДМФА). Стандартная конечная концентрация субстрата в пробе 0.25 мМ, концентрация ДМФА в реакционной смеси – 2.5% об. Количество образовавшегося *n*-нитроанилина определяли в 96-луночных планшетах на микропланшетном фотометре ELx808 (“BioTek Instruments, Inc.”, США), измеряя оптическую плотность раствора при 405 нм в нулевой момент времени и через каждые 5 мин. Смесь инкубировали при 37°C во встроенном термостате прибора ELx808 или в термостатируемом шкафу (“Binder”, Германия).

Активность пептидазы рассчитывали по формуле:

$$A = kdA_{405}/dt,$$

где *A* – активность препарата, нмоль/мин, $k = 31.9$ нмоль/опт.ед. – количество *n*-нитроанилина, при котором оптическая плотность раствора была равна 1 опт. ед. (коэффициент определялся в специальном опыте путем построения калибровочной прямой зависимости поглощения растворов от концентрации *n*-нитроанилина), dA_{405}/dt – изменение оптической плотности раствора при 405 нм в момент времени *t*, опт.ед./мин.

Каждый опыт проводили не менее чем в трех повторностях. Для статистической обработки полученных данных использовали Microsoft Excel 2013 с применением встроенных функций для оценки стандартного отклонения и доверительного интервала с использованием распределения Стьюдента (уровень значимости (альфа) – 0.1, используемый для вычисления доверительного уровня).

Процессинг рекомбинантного препарата пептидазы rProSerP38. Стандартные условия процессинга профермента rProSerP38 включали его инкубацию при 25°C в 0.1 М УБ, pH 7.9, в течение 45 мин в присутствии трипсина; концентрации компонентов в инкубационной смеси: 47 нМ rProSerP38, 5.7 нМ трипсина. При определении оптимального времени процессинга rProSerP38 и изучении стабильности процессированного препарата после активации профермента трипсином в реакционную смесь для ингибирования трипсина с целью остановки реакции добавляли TLCK (3.3 мМ).

Характеристика стабильности препаратов рекомбинантной пептидазы rSerP38. Зрелую пептидазу rSerP38 (5 мкг/мл) смешивали с 0.1 М УБ, pH 7.9, в объемном соотношении 1 : 38 и инкубировали при 25°C в течение 0, 30, 60, 90, 120 мин. Затем вносили по 195 мкл данной смеси в 96-луночный планшет, добавляли 5 мкл субстрата Suc-AAPF-pNA и определяли активность как указано выше.

В случае профермента проводили процессинг rProSerP38 трипсином, после чего раствор процессированной пептидазы rProSerP38 и трипсина смешивали с 0.13 М раствором TLCK и инкубировали в течение 0, 30, 60, 90, 120 мин. Затем вносили по 195 мкл данного раствора в 96-луночный планшет, добавляли 5 мкл субстрата и определяли активность. Стабильность препаратов характеризовали по скорости падения активности со временем.

Аффинная хроматография процессированной рекомбинантной пептидазы rProSerP38. Профермент rProSerP38 процессировали трипсином как указано выше, затем наносили на колонку, содержащую 1 мл Ni²⁺-NTA агарозы. Элюцию осуществляли ступенчато с использованием градиента концентрации имидазола 0, 25, 250 мМ в буфере А (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 300 мМ NaCl). Активность во фракциях определяли по субстрату rSerP38 Suc-AAPF-pNA и субстрату трипсина Z-FR-pNA.

Последующее обессоливание и концентрирование препарата проводили на центриконах Amicon Ultra 3K (“Millipore”, Германия) на центрифугах Centrifuge 5415C и Minispin (“Eppendorf”, Германия) при 16800 g 20 мин.

Электрофорез в ПААГ в нативных условиях и постэлектрофоретическое тестирование активности по флуорогенным субстратам. Электрофорез в нативных условиях проводили в 12%-ном разделяющем и 4%-ном концентрирующем ПААГ в буфере, содержащем 35 мМ HEPES и 43 мМ имидазол, при pH 7.2, по методу, описанному в [28]. Объемы проб, которые наносили на гель, рассчитывали, уравнивая препараты по активности расщепления соответствующих хромогенных субстратов Z-FR-pNA и Suc-AAPF-pNA.

Постэлектрофоретическое тестирование активности сериновых пептидаз проводили непосредственно в ПААГ с использованием селективных флуорогенных субстратов Z-FR-AMC для трипсиноподобных пептидаз и Suc-AAPF-AMC для химотрипсиноподобных. После проведения электрофореза гель инкубировали в 0.125 мМ растворе субстрата в 0.1 М УБ, pH 7.9, в течение 10 мин. Флуоресцирующие полосы продуктов реакции визуализировали под УФ-лампой при 366 нм и фотографировали.

Изучение влияния бычьего сывороточного альбумина (БСА) на стабильность препарата зрелой пептидазы rSerP38. БСА в одной из концентраций (0.014, 0.069, 0.35, 1.7 мг/мл) смешивали с раствором rSerP38 (5 мкг/мл) и 0.1 М УБ, pH 7.9 в объемном соотношении 1 : 1 : 37. В контроле вместо раствора БСА добавляли такое же количество буферного раствора. Затем смесь инкубировали при 25°C в течение 0, 30, 60, 90, 120 мин, после чего вносили по 195 мкл смеси в 96-луночный планшет, добавляли 5 мкл субстрата и определяли активность.

Определение кинетических параметров реакции гидролиза хромогенных субстратов пептидазой rSerP38. Для исследования кинетики ферментативной реакции готовили набор растворов субстратов (Suc-AAPF-pNA, Glp-AAF-pNA, Ac-Y-pNA) в ДМФА в концентрациях 4–20 мМ с шагом 2 мМ. Измерение активности фермента проводили по хромогенным субстратам как описано выше. Для анализа полученных экспериментальных данных методом нелинейной регрессии использовали программу “Origin 2021b (9.85)”.

Влияние pH на активность и стабильность препарата rSerP38. Для определения pH-оптимума фермента измеряли его активность по субстратам Suc-AAPF-pNA или Glp-AAF-pNA в 0.1 М УБ в диапазоне pH от 3.0 до 11.0 с шагом 0.5.

Для изучения pH-стабильности препарат rSerP38 инкубировали в 0.01 М УБ с pH от 2.5 до

11.0 с интервалом 0.5 единиц pH в течение 30 мин при 25°C. Затем pH во всех пробах доводили до значения 7.9 путем добавления 0.1 М УБ и измеряли активность, как описано выше. В случае процессированного rSerP38 также исследовали pH-стабильность в присутствии 0.62 мкМ БСА, при этом время инкубации увеличивали до 2 ч. Условия инкубации: 0.01 М УБ с pH от 2.5 до 11.0. Условия измерения активности: 0.1 М УБ pH 7.9; Suc-AAPF-pNA (0.25 мМ); ДМФА (2.5 об. %).

Изучение влияния ингибиторов на активность rSerP38. Влияние ингибиторов изучали с использованием коммерчески доступных PMSF, TLCK в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ; TPCK, хлостатина, E-64, пепстатина в концентрациях от 1 мкМ до 0.1 мМ; белковых природных ингибиторов трипсина из сои Кунитца (0.8 нМ – 0.5 мкМ), ингибитора трипсина из фасоли (7 нМ – 20 мкМ), а также ингибитора трипсина из яичного белка (13 нМ – 1.3 мкМ). Реакционную смесь, содержащую фермент, ингибитор и 20 мМ Tris-HCl, pH 7.9, инкубировали 20 мин при 25°C. Затем определяли остаточную активность по субстрату Suc-AAPF-pNA и выражали в %. Для сравнения ингибирующего действия изучаемых белковых ингибиторов рассчитывали величину IC₅₀.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пептидаза SerP38 *T. molitor* (NCBI ID: QRE01764) была получена в виде двух рекомбинантных препаратов: зрелого фермента (rSerP38) и профермента (rProSerP38). Первичная структура профермента rProSerP38 приведена на рис. 1.

Разработка условий процессинга профермента rProSerP38. Для работы с препаратом профермента rProSerP38 были разработаны условия его процессинга. Так как пропептид в составе профермента rProSerP38 заканчивался остатком Arg (рис. 1), то для его процессинга использовали трипсин. Предварительно была подобрана концентрация ингибитора трипсина TLCK, необходимая для подавления активности трипсина по окончании процессинга – она составила 3.3 мМ

>SerP38

```

SPLDQVDPVLYSWR|VVGSTASAGQYPFIMSLRTIFNSHTCGGSLIANNW
VVTAAR|CVYNSSPSSYSVAVAGINQLNSNSGVQVGVAEIVHPNYQNLI
INDIALLRRLSSSIAESNLKIIIELESENVADPRDCVLIWGRTSYPGSI
PNDLQHLPLKSVPYEQCKNAWINQEGTILESEICTLTQRGQ|GACHGDSG
GPLISQEGGNAKLIGLVSW|GSPCAVGMP|VYTRVSAFRDWIAQNNIN

```

Рис. 1. Последовательность rProSerP38. R| – место процессинга трипсином (отщепление пропептида). Красным отмечены аминокислотные остатки активного центра (HDS), голубым – субстрат-связывающего субсайта S1 (GGD).

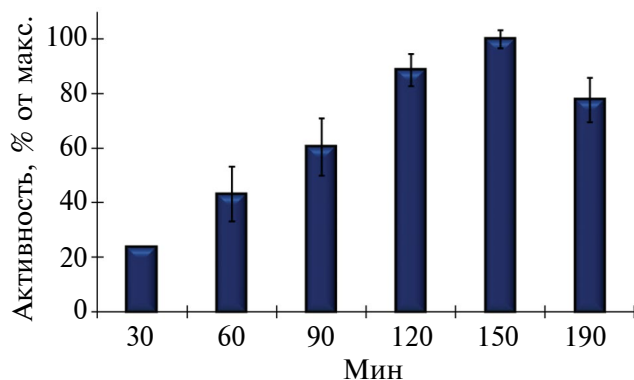


Рис. 2. Зависимость активности процессированного препарата рекомбинантной пропептидазы rProSerP38 *T. molitor* от времени процессинга. Планки погрешностей отражают доверительный интервал.

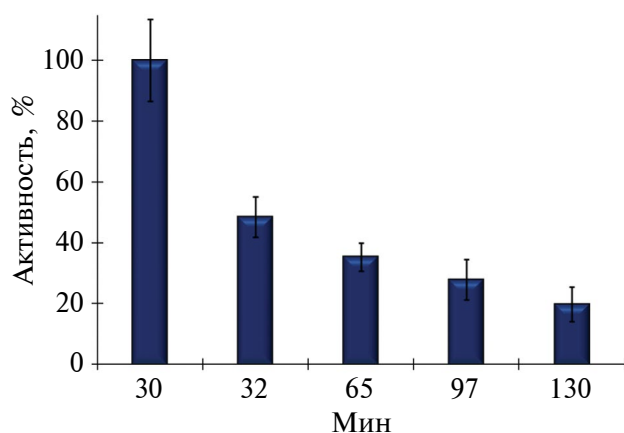


Рис. 3. Стабильность зрелой формы рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor*. Планки погрешностей отражают доверительный интервал.

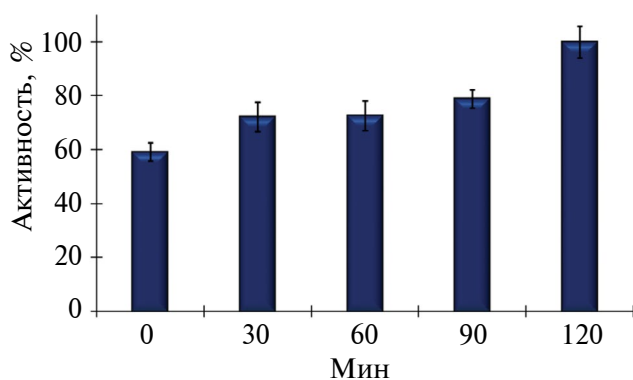


Рис. 4. Стабильность процессированной рекомбинантной пептидазы rProSerP38 *T. molitor*. Планки погрешностей отражают доверительный интервал.

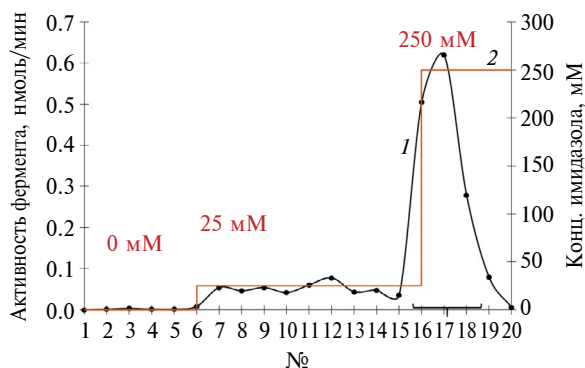


Рис. 5. Очистка процессированного препарата рекомбинантной пропептидазы rProSerP38 *T. molitor* методом металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA агарозе: 1 – активность фермента по субстрату Suc-AAPF-pNA, 2 – градиент концентрации имидазола (мМ).

TLCK в реакционной смеси. Анализ зависимости нарастания активности от времени процессинга трипсином показал, что максимум активности препарата rProSerP38 после процессинга наблюдается при 150 мин инкубации (рис. 2).

Характеристика стабильности препаратов пептидазы rSerP38 и процессированного профермента rProSerP38. Было проведено сравнение стабильности препаратов rSerP38 – зрелого рекомбинантного фермента, полученного без пропептида, и процессированного трипсином профермента rProSerP38.

В случае зрелой пептидазы rSerP38 наблюдалось снижение активности на протяжении 2 ч инкубации в буфере с pH 7.9 при температуре 25°C (рис. 3).

В случае процессированного препарата профермента rProSerP38 не наблюдалось падения активности, по крайней мере, в течение 2 ч инкубации при pH 7.9 и температуре 25°C (рис. 4). Различие в стабильности двух препаратов SerP38, зрелой пептидазы и активированной *in vitro* пропептидазы, предположительно связано с участием пропептида в стабилизации зрелого фермента, так как в случае профермента отщепившийся пропептид после процессинга остается в реакционной смеси и может способствовать поддержанию стабильности зрелой пептидазы.

Наблюдаемый в случае процессированного препарата профермента небольшой рост активности на протяжении 2 ч, предположительно, обусловлен тем, что оставшийся в препарате непроцессированный профермент подвергался автокаталитическому процессингу по связи, образованной остатком Tyr. На рис. 11 видно, что rSerP38 способна расщеплять Tyr-содержащий субстрат. Возможность автокаталитического процессинга была

показана ранее с использованием масс-спектрометрического анализа [26] и подтверждена на рис. 6, дорожка 1.

Возможность участия пропептида в стабилизации процессированного rProSerP38 была подтверждена удалением пропептида сразу после процессинга с использованием аффинной металл-хелатной хроматографии на Ni^{2+} -NTA-агарозе рекомбинантного профермента, содержащего на С-конце His₆-tag (рис. 5). В полученном элюате присутствовала активность только по специфическому субстрату химотрипсиноподобных пептидаз Suc-AAPF-pNA, и полностью отсутствовала активность по специфическому субстрату трипсина Z-FR-pNA. Фракции 16, 17 и 18, наиболее активные по субстрату пептидазы rSerP38 Suc-AAPF-pNA, объединяли, обессоливали и концентрировали.

Анализ результатов процессинга и очистки фермента проводили методом электрофореза в ПААГ в нативных условиях с последующим тестированием в геле активности по флуорогенным субстратам rSerP38 Suc-AAPF-AMC и трипсина Z-FR-AMC. Как и в случае с элюатом с колонки, по субстрату

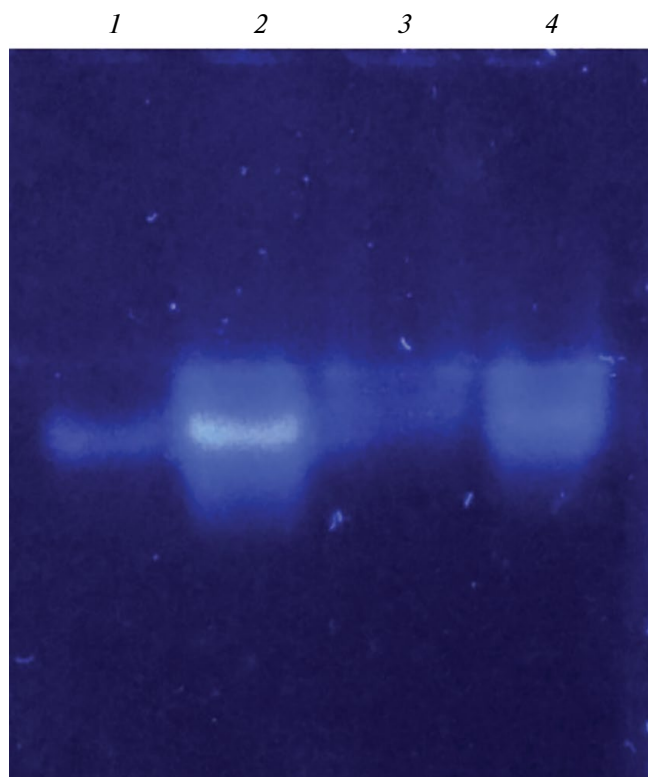


Рис. 6. Результат постэлектрофоретического тестирования активности по флуорогенному субстрату Suc-AAPF-AMC: 1 – препарат rProSerP38 до процессинга; 2 – препарат пептидазы rProSerP38, процессированной трипсином; 3 – объединенные фракции элюата 16–18 до обессоливания; 4 – объединенные фракции 16–18 после обессоливания и концентрирования.

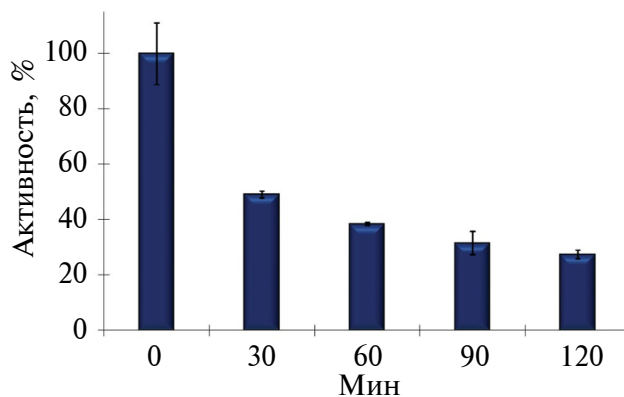


Рис. 7. Стабильность процессированного и очищенного препарата пептидазы rProSerP38 *T. molitor*. Планки погрешностей отражают доверительный интервал.

трипсина активность отсутствовала. На рис. 6 приведен результат детектирования ферментативной активности в геле по субстрату Suc-AAPF-AMC. Присутствие небольшой ферментативной активности на дорожке 1 в препарате профермента rProSerP38 до проведения процессинга трипсином подтвердило предположение об автопроцессинге профермента. Сравнение 1 и 2 дорожек свидетельствовало о явной активации в результате процессинга трипсином препарата профермента, который и был затем очищен аффинной хроматографией на Ni^{2+} -NTA-агарозе (дорожки 3, 4).

После очистки процессированного профермента наблюдаемое в течение 2 ч изменение его активности (рис. 7) отражало значительное ее падение и было аналогично изменениям, полученным для зрелой формы rSerP38 (рис. 3).

Стабильность зрелой пептидазы rSerP38 в присутствии БСА. Были разработаны условия стабилизации зрелой формы пептидазы rSerP38 в присутствии белкового субстрата. Для этого использовали растворы БСА в концентрациях, соответствующих молярным соотношениям rSerP38 и БСА 1 : 1, 1 : 5, 1 : 25, 1 : 125. Было обнаружено, что при соотношении rSerP38 : БСА, равном 1 : 125, активность фермента сохранялась в течение 2.5 ч. Предположительно, такой результат может объясняться отсутствием процесса автолиза зрелого фермента в этих условиях (рис. 8).

Кроме того, при этом же соотношении БСА и rSerP38 наблюдалось заметное увеличение активности пептидазы спустя 30 мин инкубации с БСА. Это может быть связано с тем, что БСА способствует правильному посттрансляционному фолдингу белка, в результате чего реакция протекает эффективнее.

Влияние pH на активность и стабильность рекомбинантной пептидазы rSerP38. pH-оптимум и pH-стабильность определяли в диапазоне от 3.0

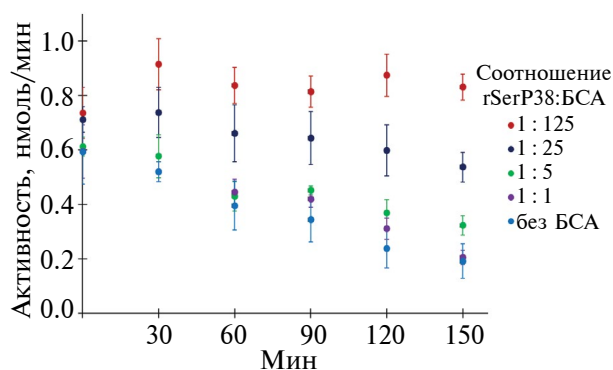


Рис. 8. Стабильность зрелой формы рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor* в присутствии БСА.

до 11.0. Фермент проявлял наибольшую активность при щелочных рН с максимумом активности при рН 9.0 (рис. 9).

Из-за сравнительно низкой стабильности очищенного фермента для изучения зависимости его стабильности от рН использовали время инкубации при различных значениях рН 30 мин (рис. 10а). Чтобы оценить влияние рН на более длительном временном интервале в смесь для инкубации добавляли БСА и инкубировали в течение 2 ч (рис. 10б). На основании полученных результатов можно сделать вывод, что пептидаза сохраняла 85–100% активности при рН от 5.0 до 8.5 в отсутствие БСА, тогда как в присутствии БСА наблюдалась заметная стабилизация фермента в более кислой среде.

Определение субстратной специфичности рекомбинантной пептидазы rSerP38. Данные о субстратной специфичности rSerP38 указывают на то, что она является химотрипсиноподобной пептидазой (рис. 11). Предпочтительными оказались субстраты, содержащие остатки Tug и Phe в положении P1, в то время как активность по отношению к субстратам, содержащим Leu в P1, была значительно ниже. Совсем не гидролизировались субстраты эластаз (Suc-AAPV-pNA,

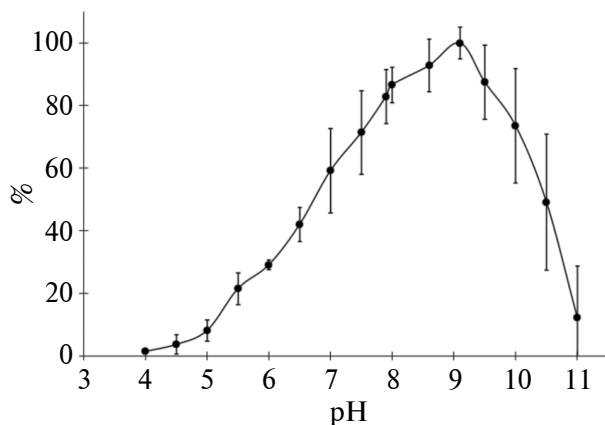


Рис. 9. Влияние рН на активность рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor*.

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза субстратов рекомбинантной пептидазой rSerP38 *T. molitor*

Субстрат	K_M , мМ	k_{cat} , мин ⁻¹	k_{cat}/K_M , (мкМ·мин) ⁻¹
Glp-AAF-pNA	0.21 ± 0.02	1510 ± 50	7.0 ± 1.0
Suc-AAPF-pNA	0.15 ± 0.02	620 ± 30	4.2 ± 0.8
Ac-Y-pNA	1.6 ± 0.3	1400 ± 200	0.9 ± 0.3

Suc-AAA-pNA), трипсиноподобных пептидаз (Z-FR-pNA, Z-RR-pNA, Vz-R-pNA) и цистеиновых пептидаз (Glp-FA-pNA, Glp-FQ-pNA).

Более эффективно реакция протекала для более длинных субстратов, но и короткие субстраты тоже гидролизировались, хотя с несколько меньшей эффективностью. Важность N-концевой защитной группы субстрата при определении ферментативной активности подтверждается тем, что при сравнении ряда коротких субстратов с одним и тем же аминокислотным остатком в положении P1 эффективность их гидролиза была различной и усиливалась в ряду Suc-F-pNA – Ac-F-pNA – Glp-F-pNA, что в данном случае отражало предпочтительность Glp в качестве защитной группы.

Кинетика реакций гидролиза субстратов Glp-AAF-pNA, Suc-AAPF-pNA и Ac-Y-pNA. Наибольшая активность для rSerP38 наблюдалась по отношению к субстратам Glp-AAF-pNA, Suc-AAPF-pNA и Ac-Y-pNA. Для них была исследована кинетика зависимости скорости реакций от концентрации субстрата (рис. 12а–в).

Полученные зависимости обрабатывали при помощи нелинейной регрессии и определяли кинетические параметры гидролиза – константу Михаэлиса K_M , каталитическую константу k_{cat} (табл. 1).

Наиболее высокой каталитической эффективностью k_{cat}/K_M характеризовался субстрат Glp-AAF-pNA, после него по убыванию эффективности – Suc-AAPF-pNA и Ac-Y-pNA.

Влияние ингибиторов на активность рекомбинантной пептидазы rSerP38. Изучение действия синтетических и белковых ингибиторов на пептидазу rSerP38 показало, что среди синтетических ингибиторов наиболее эффективными оказались ингибитор сериновых пептидаз PMSF и ингибиторы химотрипсиноподобных пептидаз – TPCK и химостатин (табл. 2). Это согласовывалось с результатами, полученными в ходе исследования субстратной специфичности, и подтверждало то, что rSerP38 являлась химотрипсиноподобной пептидазой. Ингибиторы цистеиновых пептидаз (E-64)

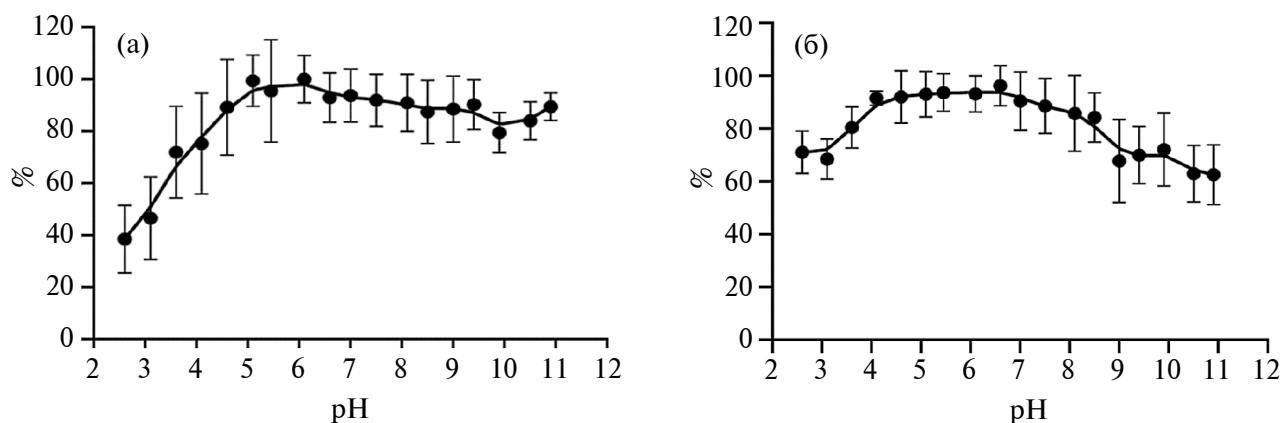


Рис. 10. Влияние рН на стабильность рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor* (7 нМ): а) без БСА, инкубация 30 мин; б) в присутствии БСА (0.62 мкМ).

и трипсиноподобных пептидаз (TLCK) не подавляли активность rSerP38. Интересно, что некоторое ингибирующее действие было выявлено при использовании высокой концентрации ингибитора аспартильных пептидаз пепстатина.

Среди белковых ингибиторов пептидаз рассматривали действие на rSerP38 соевого ингибитора Кунитца, ингибитора трипсина из фасоли и ингибитора трипсина из яичного белка, способные ингибировать не только трипсин, но и химотрипсин [29, 30]. Эффективными оказались соевый ингибитор Кунитца и ингибитор трипсина из фасоли (табл. 3), тогда как ингибитор трипсина из яичного белка не только не подавлял активность пептидазы, а даже стабилизировал, оказывая эффект, аналогичный тому, что наблюдали в присутствии БСА. Для соевого ингибитора Кунитца и ингибитора трипсина из фасоли были определены также параметры IC_{50} .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Активность исследуемой пептидазы регулируют три основных процесса: синтез и секреция, активация предшественника (зимогена) и распознавание сайта связывания субстрата. Результаты работы показали, что пропептид не только поддерживает пептидазу в неактивном состоянии, но и стабилизирует фермент после его процессинга. Удаление пропептида из среды после процессинга приводило к ускорению инактивации зрелого фермента. Наличие оптимума рН в щелочной области коррелирует с тем, что фермент активен в РМ, где рН содержимого в среднем 7.9 [31]. Следует отметить, что и другие химотрипсиноподобные пептидазы насекомых имели рН оптимум от 8 до 9.5 [19, 24, 32–36]. Поскольку ферменты средней кишки *T. molitor* обладали рН-оптимумом при щелочном рН, эти насекомые могли быть использованы

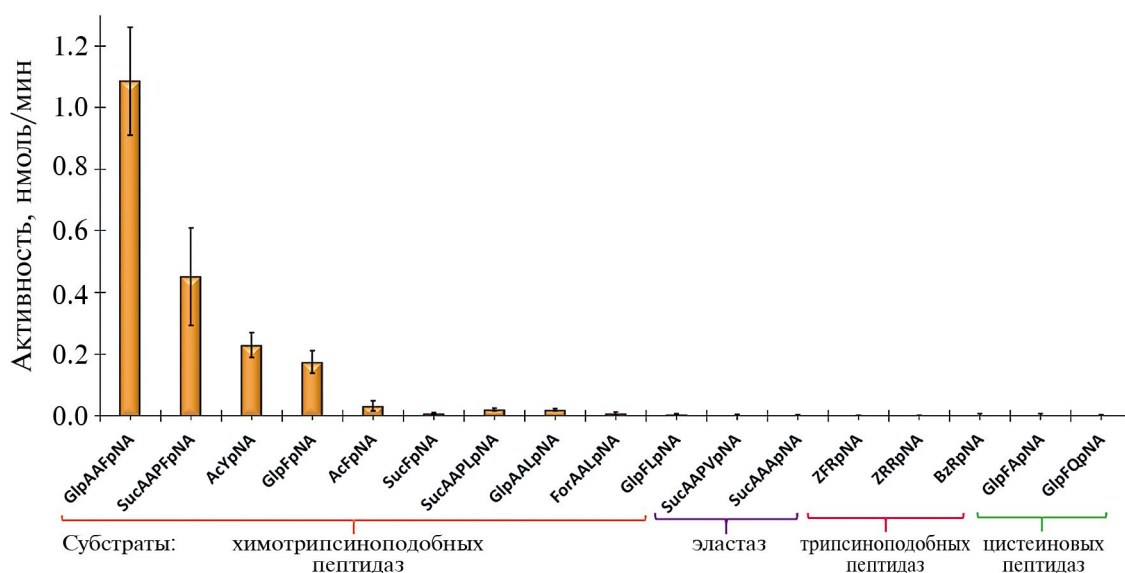


Рис. 11. Активность рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor* по отношению к различным субстратам.

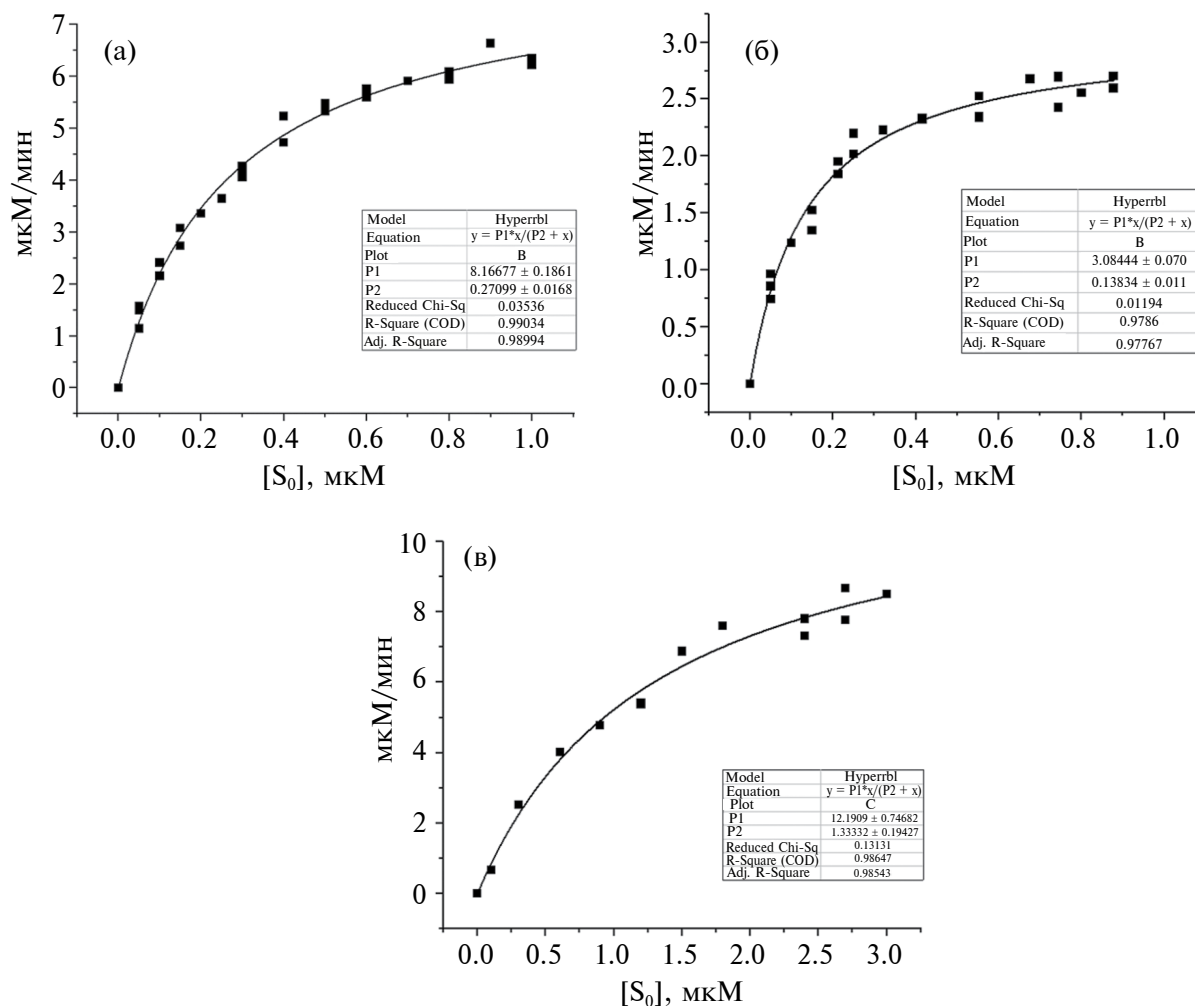


Рис. 12. Зависимость скорости ферментативной реакции гидролиза пептидазой rSerP38 субстратов: а) Glp-AAF-pNA (0.1–1.0 мкМ); б) Suc-AAPF-pNA (0.1–1.0 мМ); в) Ac-Y-pNA (0.1–3.0 мМ).

в качестве многообещающего источника пептидаз, имеющих промышленное применение. В настоящем исследовании была охарактеризована сериновая пептидаза химотрипсин из средней кишки *T. molitor* на предмет ее стабильности в экстремальных условиях щелочности, которые обычно встречаются при промышленной переработке. Пептидазы насекомых с высокой каталитической активностью и стабильностью в экстремальных условиях окружающей среды могут быть подходящими биокатализаторами для различного промышленного применения, а белковая инженерия может расширить возможности применения этих пептидаз для различных целей. rSerP38, как и другие химотрипсиноподобные пептидазы насекомых, хорошо гидролизует длинные синтетические субстраты. Наблюдалась незначительная разница в связывании пептидазой rSerP38 субстратов Glp-AAF-pNA и Suc-AAPF-pNA, на что указывали соответствующие значения K_m . В то же время субстрат Ac-Y-pNA характеризовался намного более высоким

параметром K_m , то есть значительно более низким сродством к исследуемому ферменту. Тем не менее, способность гидролизовать короткие субстраты могла свидетельствовать о том, что, в отличие от главного пищеварительного химотрипсина насекомого SerP69, который гидролизует только длинные субстраты [18], SerP38, активируясь на более поздних стадиях пищеварительного процесса, может расщеплять образовавшиеся короткие пептиды. Таким образом, полученные биохимические характеристики SerP38 коррелировали с выявленными ранее бионформатическими данными об отличиях исследованной нами пептидазы от других химотрипсиноподобных пептидаз пищеварительного комплекса *T. molitor*, возможно, свидетельствуя об особой роли, которую может играть SerP38 на разных этапах протеолиза. Следует отметить, что несмотря на неканоническую структуру субстрат-связывающего субсайта S1 GGD, выявленную только у представителей членистоногих, физико-химические и энзиматические свойства пептидазы rSerP38

Таблица 2. Влияние синтетических ингибиторов на активность рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor*

Ингибитор	Концентрация, М	Активность, %
TPCK	10^{-4}	1
	10^{-5}	2
	10^{-6}	6
PMSF	10^{-3}	1
	10^{-4}	3
	10^{-5}	47
Химостатин	10^{-4}	0
	10^{-5}	2
	10^{-6}	10
E-64	10^{-4}	92
	10^{-5}	101
	10^{-6}	102
TLCK	10^{-3}	103
	10^{-4}	100
	10^{-5}	108
Пепстатин	10^{-4}	69
	10^{-5}	108
	10^{-6}	116

в целом близки к таковым химотрипсинов [37]. Сходные свойства были описаны и у единственного ранее охарактеризованного гомологичного фермента насекомых [24, 38]. В то же время, пептидаза с GGD структурой субстрат-связывающего субсайта S1 из краба *Uca pugilator* эффективно гидролизовала субстраты трипсина и демонстрировала коллагенолитическую активность [22, 23], которой rSerP38 не обладает (данные не приведены). Такие

различия в свойствах ферментов насекомых и ракообразных указывали на различия их структур, не отраженные общепринятым критерием специфичности в виде триады аминокислотных остатков субстрат-связывающего субсайта S1 [39].

Полученные результаты закладывают основу для дальнейших исследований функций этого семейства пептидаз у *T. molitor* и лучшего понимания его способности быстро адаптироваться к широкому спектру перемен окружающей среды, включая ингибиторы, встречающиеся естественным образом в растениях-хозяевах или в потребляемой пище. Этот вид демонстрирует высокую экологическую пластичность, которая и позволяет быстро адаптироваться к разнообразным средам обитания. Адаптация организма к критическим условиям существования требует оптимизации его ферментативного аппарата. Определение характеристик протеолитических пищеварительных ферментов насекомого открывает возможности для разработки эффективных стратегий борьбы с вредителями с помощью ингибиторов сериновых пептидаз в трансгенных продуктах. Такая работа имеет перспективу создания дополнительных генетических и метаболических мишеней для борьбы с вредителями в будущем.

Авторы чтут память безвременно ушедшей коллеги профессора Ирины Юрьевны Филипповой, направлявшей и руководившей данным исследованием.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22–24–00553, <https://rscf.ru/project/22–24–00553/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Таблица 3. Влияние белковых ингибиторов на активность рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor*

Ингибитор	Концентрация, М	Активность, %	IC ₅₀ , нМ
SBTI Кунитца	$5 \cdot 10^{-7}$	1	25 ± 3
	$2 \cdot 10^{-8}$	68	
	$4 \cdot 10^{-9}$	98	
Ингибитор трипсина из фасоли	$4 \cdot 10^{-7}$	0	250 ± 40
	$2 \cdot 10^{-7}$	40	
	$7 \cdot 10^{-9}$	93	
Ингибитор трипсина из яичного белка	$1.3 \cdot 10^{-6}$	133	—
	$1.3 \cdot 10^{-7}$	126	
	$1.3 \cdot 10^{-8}$	119	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *de Souza A.N., Martins M.L.* // Braz. J. Microbiol. 2001. V. 32. № 4. P. 271–275.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>
2. *Zambare V.P., Nilegaonkar S.S., Kanekar P.P.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 23. P. 1569–1574.
<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9402-y>
3. *Abidi F., Limam F., Nejib M.M.* // Process Biochem. 2008. V. 43. № 11. P. 1202–1208.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.018>
4. *Kumar C.G., Takagi H.* // Biotechnol. Adv. 1999. V. 17. № 7. P. 561–594.
[https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(99\)00027-0](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(99)00027-0)
5. *Singh J., Vohra R., Sahoo D.* // Biotechnol. Lett. 1999. V. 21. P. 921–924.
<https://doi.org/10.1023/A:1005502824637>
6. *Anwar A., Saleemuddin M.* // Arch. Insect. Biochem. Physiol. 2002. V. 51. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1002/arch.10046>
7. *Vinokurov K.S., Elpidina E.N., Oppert B., Prabhakar S., Zhuzhikov D.P., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A.* // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2006 b. V. 145. № 2. P. 138–146.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.004>
8. *Sanatan P.T., Lomate P.R., Giri A.P., Hivrale V.K.* // BMC Biochem. 2013. V. 14.
<https://doi.org/10.1186/1471-2091-14-32>
9. *Sharifi M., Chitgar M.G., Ghadamyari M., Ajamhasani M.* // Romanian Journal of Biochemistry. 2012. V. 49. № 1. P. 33–47.
10. *Mahdavi A., Ghadamyari M., Sajedi R.H., Sharifi M., Kouchaki B.* // J. Insect Sci. 2013. V. 13.
<https://doi.org/10.1673/031.013.8101>
11. *Zou Z., Lopez D.L., Kanost M.R., Evans J.D., Jiang H.* // Insect Mol. Biol. 2006. V. 15. № 5. P. 603–614.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00684.x>
12. *Choo Y.M., Lee K.S., Yoon H.J., Lee S.B., Kim J.H., Sohn H.D., Jin B.R.* // Eur. J. Entomol. 2007. V. 104. № 1. P. 1–7.
<https://doi.org/10.14411/eje.2007.001>
13. *Jiang H., Vilcinskas A., Kanost M.R.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. V. 708. P. 181–204.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_10
14. *Kanost M.R., Jiang H.* // Curr. Opin. Insect Sci. 2015. V. 11. P. 47–55.
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.09.003>
15. *Cao X., Jiang H.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2018. V. 103. P. 53–69.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.006>
16. *Cao X., Gulati M., Jiang H.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2017. V. 88. P. 48–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.07.008>
17. *Lin H., Xia X., Yu L., Vasseur L., Gurr G.M., Yao F., Yang G., You M.* // BMC Genomics. 2015. V. 16. Article 1054.
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-2243-4>
18. *Elpidina E.N., Tsybina T.A., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Zhuzhikov D.P., Oppert B.* // Biochimie. 2005. V. 87. № 8. P. 771–779.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.02.013>
19. *Sato P.M., Lopes A.R., Juliano L., Juliano M.A., Terra W.R.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2008. V. 38. № 6. P. 628–633.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.03.006>
20. *Perona J.J., Tsu C.A., Craik C.S., Fletterick R.J.* // Biochemistry. 1997. V. 36. № 18. P. 5381–5392.
<https://doi.org/10.1021/bi9617522>
21. *Bown D.P., Wilkinson H.S., Gatehouse J.A.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 1997. V. 27. № 7. P. 625–638.
[https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(97\)00043-x](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(97)00043-x)
22. *Tsu C.A., Perona J.J., Schellenberger V., Turck C.W., Craik C.S.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 30. P. 19565–19572.
23. *Tsu C.A., Craik C.S.* // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 19. P. 11563–11570.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.19.11563>
24. *Whitworth S.T., Blum M.S., Travis J.* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 23. P. 14430–14434.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14430>
25. Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, 4th Ed. V. E22a. In: / Eds. Goodman M., Toniolo C., Moroder L., Felix A. Stuttgart, NY: Thieme, 2004. 785 p.
26. *Горбунов А.А., Акентьев Ф.И., Губайдуллин И.И., Жиганов Н.И., Терещенкова В.Ф., Элпидина Е.Н., Козлов Д.Г.* // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 6. С. 136–145.
27. *Frugoni J.A.C.* // Gazz. Chem. Ital. 1957. V. 87. P. 403–407.
28. *Elpidina E.N., Semashko T.A., Smirnova Y.A., Dvoryakova E.A., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., et al.* // Anal. Biochem. 2019. V. 567. P. 45–50.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.12.001>
29. *Krahn J., Stevens F.C.* // Biochemistry. 1970. V. 9. № 13. P. 2646–2652.
<https://doi.org/10.1021/bi00815a013>
30. *De Vonis Bidlingmeyer U., Leary T.R., Laskowski M.Jr.* // Biochemistry. 1972. V. 11. № 17. P. 3303–3310.
<https://doi.org/10.1021/bi00767a028>
31. *Vinokurov K.S., Elpidina E.N., Oppert B., Prabhakar S., Zhuzhikov D.P., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A.* // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2006 a. V. 145. № 2. P. 126–137.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.005>
32. *Zhu Y.C., Baker J.E.* // Arch. Insect. Biochem. Physiol. 2000. V. 43. № 4. P. 173–184.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(200004\)43:4<173::AID-ARCH3>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(200004)43:4<173::AID-ARCH3>3.0.CO;2-8)
33. *Mazumdar-Leighton S., Broadway R.M.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2001. V. 31. № 6–7. P. 633–644.
[https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(00\)00168-5](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(00)00168-5)

34. Herrero S., Combes E., Van Oers M.M., Vlak J.M., de Maagd R.A., Beekwilder J. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 35. № 10. P. 1073–1082. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.05.006>
35. Tamaki F.K., Padilha M.H., Pimentel A.C., Ribeiro A.F., Terra W.R. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2012. V. 42. № 7. P. 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.03.005>
36. Matsuoka T., Kawashima T., Nakamura T., Yabe T. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2017. V. 81. № 7. P. 1401–1404. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1318698>
37. Gráf L., Szilágyi L., Venekei I. Chapter 582 – Chymotrypsin. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3 Ed. In: / Eds. Rawlings N. D., Salvesen G. Academic Press, 2013. P. 2626–2633. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00582-2>
38. Botos I., Meyer E., Nguyen M., Swanson S.M., Koomen J.M., Russell D.H., Meyer E.F. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 298. № 5. P. 895–901. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3699>
39. Perona J.J., Craik C.S. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 3. P. 337–360. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040301>

Recombinant Chymotrypsin-Like Peptidase from *Tenebrio molitor* with a Non-Canonical Substrate-Binding Site

V. F. Tereshchenkova^a, N. I. Zhiganov^b, A. S. Gubaeva^a, F. I. Akentyev^{c, d},
Ya. E. Dunaevsky^e, D. G. Kozlov^c, M. A. Belozersky^e, and E. N. Elpidina^{e, *}

^aLomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, 119991 Russia

^bLomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia

^cNational Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^d“Kurchatov Genome Center”, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^eLomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: elp@belozersky.msu.ru

We characterized an alkaline chymotrypsin-like serine peptidase from the yellow mealworm *Tenebrio molitor* with a non-canonical substrate-binding subsite for its possible application as a component (an additive) in various biological products. The enzyme was obtained as a recombinant preparation. Purification was carried out using affinity chromatography on Ni²⁺-NTA agarose. The specificity constants (k_{cat}/K_M) for the chymotrypsin substrates, Glp-AAF-pNA, Suc-AAPF-pNA, and Ac-Y-pNA were 7, 4.2 and 0.9 ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)⁻¹, respectively. Optimum of the proteolytic activity was observed at pH 9.0. The enzyme was stable at the alkaline pH range, and in the presence of BSA also in the acidic region. Peptidase was inhibited by synthetic inhibitors such as PMSE, TPCK, chymostatin, while EDTA, E-64, and pepstatin had no effect on the enzyme activity. The purified enzyme showed high stability over time in the presence of BSA. The short life cycle of the insect and the production of a large number of peptidases in the midgut with high catalytic activity and stability can make *T. molitor* an excellent alternative source of industrially important enzymes for application as components (additives) in various biological products (e.g., stain removers, detergents, etc.).

Keywords: serine peptidases, chymotrypsin-like peptidases, proteolytic enzymes, insect peptidases, SerP38, *Tenebrio molitor*