УДК 577.152.34.083.042:591.434:595.773:591.3

Андрієвський О. М., канд. біол. наук, доц.
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ГІДРОКСИДНОЇ ПЕПТИДГІДРОЛАЗИ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ ДРОЗОФІЛИ

Досліджено основні фізико-хімічні властивості гідроксидного протеолітичного ферменту травного каналу дрозофіли. Біологічним джерелом пептидгідролази служили личинки інбредних ліній дрозофіли дикого типу. На рівні екстрактів тканин, ізольованих кишечників і високо очищеного ферментного препарату визначені температурний і pH оптимуми прояву активності пептидгідролази, її субстратна специфічність, стійкість до дії інгібіторів, а також показано вплив на гідролітичну активність іонів металів, хлорамфеніколу, етидійброміду та інших ефекторів. Виявлено здатність ферменту сорбуватися на твердому полімерному носії. Встановлено, що структурна модифікація імобілізованої протеази приводить до істотних змін її субстратної специфічності. Визначено кінетичні показники реакцій гідролізу окремих субстратів та інші параметри пептидгідролази.
Ключові слова: пептидгідролаза, каталіз, дрозофіла.

Проблема дослідження протеолітичних ферментів тварин і людини стає все більш актуальною, оскільки поступово з'ясовується їх роль у найважливіших процесах життєдіяльності організму, починаючи з реакцій необмеженого протеолізу і завершуючи участю протеаз в реакціях регулювання генної експресії [1, 2, 3, 4, 5].

Для вирішення окремих питань, пов'язаних з вивченням протеолізу в екстремальних для організму умовах, дрозофіла може бути використана як зручний модельний об'єкт. Це пояснюється тією обставиною, що розвиток дрозофіли на стадії лялечки передбачає два, здавалося б, несумісні біологічні явища: гістоліз і гістонеогенез. При цьому руйнується одна з головних систем — травна, а новий імагінальний тракт як основний орган цієї системи утворюється з проліферуючих клітин відповідного імагінального диска. У попередніх роботах [6, 7] підкреслювалась безсумнівна роль лужної пептидгідролази кишечнику дрозофіли у процесах травлення і висловлювалося припущення про можливу участь даного ферменту в метаморфозі комахи. Однак молекулярний механізм участі протеолітичної активності в онтогенезі дрозофіли залишається не розкритим. В значній мірі це пов'язано з недостатньою вивченістю самого ензиму, а також механізмів регуляції його активності у ході розвитку плодової мушки. У зв'язку з цим метою даного дослідження було детальне вивчення фізико-хімічних властивостей кишкової пептидгідролази, а також регуляції її активності *in vitro* і *in vivo* різними ефекторами.

© О. М. Андрієвський, 2002

Матеріали і методи

Основним джерелом досліджуваної пептидгідролази служили личинки третього дня розвитку, одержані внаслідок близькородинного схрещування мух лабораторних популяцій *Drosophila melanogaster* дикого типу (лінія Normal). Розвиток дрозофіли відбувався в умовах термостату при температурі +26 °С на стандартному середовищі, що містить агароїд, манну крупу, цукор і дріжджевий екстракт. У ході виконання роботи аналізували буферно-водяні (pH 9,0) екстракти сумарних тканин, а також ізольованих кишечників личинок; в окремих випадках використовували препарат очищеної нами [8] кишкової пептидгідролази цього об'єкта. Активність ферменту визначали спектрофотометричним методом з використанням різних субстратів: бензоїларгінін-п-нітроаніліду (БАПНА, "Serva", Німеччина), бензоїларгінін-етилового ефіру (БАЕЕ, "Reanal", Угорщина), протаміну (Pt, "Fluka", Швеція), казеїну (Cz, "Реахим", Олайна), гемоглобіну (tHb, "Reanal", Угорщина), альбуміну (hAb, "Reanal", Угорщина) і інших [9, 10]. За 1 міліодиницю (мО) активності приймали кількість ферменту, що забезпечує розщеплення 1 мкмоля субстрату за 1 хв інкубації при +37 °С. Розраховуючи кількість мО на 1 мл екстракту, знаходили відносну активність пептидгідролази; при розрахунку на 1 мг білка — питому. В окремих дослідах застосовували трипсин фірми "Спофа" (Чехія) у концентрації 0,129 мг/мл. Концентрація білка у ферментному препараті пептидгідролази личинок складала 0,050 мг/мл.

Для визначення специфічності інгібіторів щодо досліджуваної протеази, а також трипсину, використовували соєвий інгібітор трипсину ("Reanal", Угорщина), овомукоїд ("Биохимреактив", Росія), контрикал ("VEB", Німеччина) у концентраціях 0,5 мг/мл, а також виділений нами з лялечок дрозофіли гемолімфатичний інгібітор у концентрації 0,34 мг/мл.

В окремій серії експериментів вивчали вплив хлорамфеніколу і етидійброміду на пептидгідролазу в системах *in vitro* і *in vivo*. З цією метою зазначені препарати використовували в таких концентраціях: 0,02 та 0,4 мг у розрахунку на 1 мл живильного середовища (*in vivo*) і у кінцевих концентраціях 3,3, 17,0 і 33,0 мкг на 1 мл інкубаційного середовища (*in vitro*). В останньому випадку реагенти взаємодіяли з ферментним розчином (співвідношення 1:1) протягом 5 хв.

В експериментах *in vitro*, спрямованих на вивчення впливу іонів металів та інших ефекторів на пептидгідролазну активність дрозофіли, застосовували солі: $AgNO_3$ (кінцеві концентрації 0,5 і 5 мМ), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$ і $HgNO_3 \cdot 2H_2O$ (кінцева концентрація 5 мМ); цистеїн, глутатіон, п-хлормеркурибензоат (п-ХМБ), монойодацетат (кінцева концентрація 5 мМ), етилендиамінтетраацетат (ЕДТА) і 2-β-меркаптоетанол (кінцева концентрація 50 мМ); фенілметилсульфонілфлуорид – в кінцевих концентраціях 5, 10 і 50 мМ.

Перераховані вище органічні ефектори і солі являли собою реактиви марок "х. ч." і "ч. д. а." фірм "Reanal", "Chemapol", "Реахим".

З метою вивчення впливу іонів металів на систему протеолізу *in vivo* у живильне середовище перед початком циклу розвитку дрозофіли вносили солі деяких лужних і важких металів: NaCl, KCl (2 мг на 1 мл корму), $CuCl_2$, $ZnSO_4$, $CoCl_2$ (0,2 мг на 1 мл корму). У цій серії дослідів ферментативну активність визначали в екстрактах тканин личинок, лялечок і імаго.

Детальний опис методичних прийомів, використаних у роботі, наведено в інших публікаціях [6, 7, 10, 11].

Представлений у роботі цифровий матеріал оброблено статистично [12]; ілюстрації виконані з використанням комп'ютерної програми "Excel".

Результати досліджень та їх аналіз

Раніше було встановлено [6, 8], що пептидгідролаза, виділена із кишечника дрозофіли, виявляє гідролітичну дію в широкому діапазоні pH (3-11). Максимум активності цього ферменту стосовно всіх використаних субстратів виявляється у слаболужному (pH 7-8) та лужному (pH 9,0) середовищах. Однак різні білки і квазипептиди за однакових значень pH розщеплюються з різною швидкістю. Так, при pH 5,0 синтетичний субстрат БАПНА гідролізується дуже слабко, в той час як пептидгідролазна активність в присутності казеїну наближається до максимальної. Розщеплення природних білків — гемоглобіну і казеїну — відбувається також і в сильнокислому середовищі (pH 3,5), однак розщеплення синтетичних субстратів БАПНА і БАЕЕ за цих умов не спостерігається. Виходячи з отриманих даних, можна зазначити, що ступінь прояву активності пептидгідролази за тих чи інших значень pH значною мірою залежить від природи субстрату. Найбільш чутливою до змін pH є БАПНА-азна і протаміназна активність ферменту. Оптимуми pH для гідролізу протаміну і БАЕЕ відповідають значенням 7,0 і 9,0.

При визначенні оптимальної температури для прояву активності пептидгідролази встановлено, що деякі субстрати (гемоглобін, казеїн) гідролізуються з максимальною швидкістю при температурі +55 °С. Це свідчить про досить високу термостабільність ферменту. Разом з тим низькомолекулярний субстрат БАПНА найбільш активно розщеплюється за умов +45 °С, а при +55 °С зазначена активність зменшується майже на 60 %. Повна інактивація протеазної активності спостерігається при +100 °С, а БАПНА-азної активності — при +70 °С.

Очищена пептидгідролаза кишечнику [8] здатна розщеплювати досить численний ряд субстратів, що в принципі властиве більшості пептидгідролаз. Окремі білки (гемоглобін, альбумін) гідролізуються досліджуваним ензимом як у лужному (pH 9,0), так і в кислому (pH 3,5) середовищах. Крім того, денатуровані форми бичачого і людського альбуміну, лізоциму, трипсину й інших білків краще розщеплюються, ніж їх нативні форми, причому більшість із цих субстратів гідролізується в лужному середовищі. На відміну від інших використовуваних нами білків-субстратів, нечутливим до дії досліджуваного ферменту виявився як нативний, так і денатуро-

ваний овальбумін. Можливо, цей ефект пояснюється домішкою у використовуваному білку-субстраті овомукоїду — інгібітора трипсиноподібних ферментів, в тому числі й лужної пептидгідролази кишечнику дрозофіли.

Здатність пептидгідролази швидко розщеплювати синтетичний складний ефір бензоїларгініну вказує на притаманну ферментові естеразну активність. Варто підкреслити, що БАЕЕ в присутності досліджуваної пептидгідролази гідролізується більш інтенсивно, ніж БАПНА, протамін, денатурований трипсин чи інші субстрати.

Особливістю пептидгідролази личинок виявилася її властивість сорбуватися в процесі діалізу на целофановій мембрані. Можливо, що зв'язок із сорбентом викликає зміни в конформації ферменту, які у свою чергу впливають на субстратну специфічність досліджуваної пептидгідролази. З'ясувалося, що сорбований мембраною протеолітичний фермент повністю втрачає здатність гідролізувати високомолекулярні субстрати, гемоглобін і казеїн. Активність сорбованого ферменту виявляється лише стосовно БАПНА, БАЕЕ і протаміну. Зміну субстратної специфічності зв'язаного ферменту можна пояснити тим, що сорбція гідратцелюлозою впливає на конформацію молекули ферменту і викликає модифікацію його активного центру, внаслідок чого взаємодія можлива лише з низькомолекулярними субстратами БАПНА, БАЕЕ, протаміном.

Вільний і адсорбований на целофані фермент піддавали дії овомукоїду й інгібітора із гемолімфи лялечок дрозофіли. Обробка зв'язаного з мембраною ферменту розчинами зазначених інгібіторів викликає різке падіння БАПНА-азної, протамінолітичної і БАЕЕ-естеразної активностей пептидгідролази (рис. 1).

Неоднозначна реакція досліджуваного ферменту на різні субстрати, особливо за дії на фермент інгібіторів, наводить на думку про наявність у даної протеази двох активних центрів — пептидгідролазного і естеразного. Однак, результати досліджень (рис. 2, А і Б) свідчать, що це припущення малоймовірне, оскільки в присутності еквімолярних концентрацій двох синтетичних субстратів (БАПНА і БАЕЕ) з близькими молекулярними масами у 1,6 рази зменшується ефективність розщеплення БАПНА, що свідчить про можливу конкурентну взаємодію цих субстратів. Найбільш яскраво "конкуренція" між субстратами за місце в активному центрі ферменту виявляється в перші 15-20 хв інкубації. Припущення про наявність лише одного активного центру у досліджуваної протеази підтверджується ще й тим, що в однакових умовах панкреатичний трипсин великої рогатої худоби і фермент плодової мушки виявляють схожу кінетику анілідазної активності в системі з додатковим субстратом (рис. 2, Б).

Припущення про наявність декількох конфігурацій у активного центру пептидгідролази узгоджується з даними, отриманими за вивчення активностей цього ферменту in vitro у присутності деяких іонів. Так, наприклад, Zn^{++} не впливає на розщеплення казеїну, пригнічує гідроліз БАПНА і помітно стимулює БАЕЕ-естеразну активність пептидгідролази; іон кобальту на 9 % зменшує казеїнолітичну активність, в той час як гідроліз

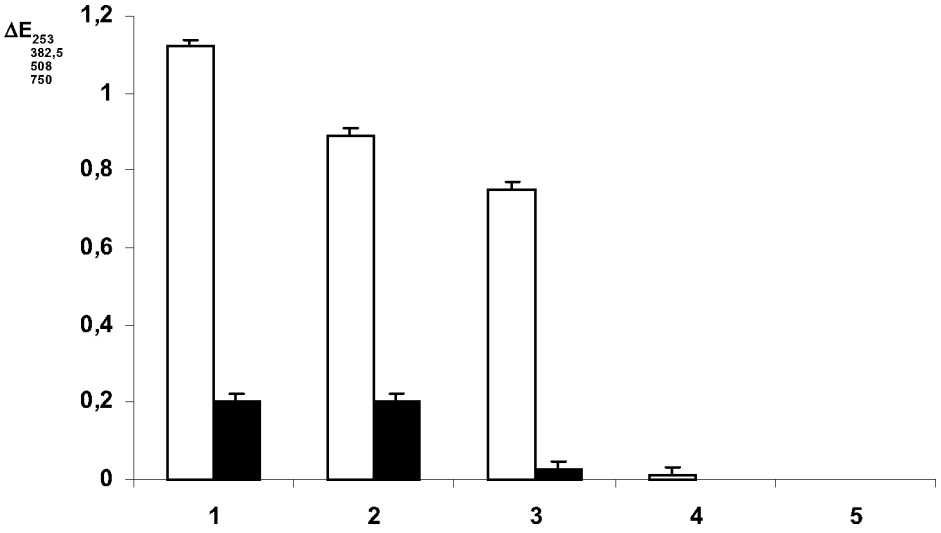

Рис. 1. Ефективність розщеплення різних субстратів пептидгідролазою, сорбованою на гідратцелюлозі:
1 — БАЕЕ, 2 — БАПНА, 3 — протамін, 4 — казеїн, 5 — гемоглобін;
□ — нативний фермент, без інгібітора, ■ — фермент, заздалегідь оброблений розчином гемолімфатичного інгібітора лялечок дрозофіли

синтетичних субстратів зростає на 27 і 46 %. Звертає на себе увагу висока чутливість ферменту до дії неорганічних іонів, що зв'язують — SH-групи (Ag^+, Hg^+). Іони срібла повністю припиняють гідроліз казеїну, помітно зменшують швидкість гідролізу БАПНА (на 42 %) і дещо стимулюють розщеплення БАЕЕ (на 8 %). Високі концентрації Ag^+, а також Hg^+, негативно впливають на активність пептидгідролази стосовно всіх субстратів, аж до повного її інгібування. Разом з тим в дослідах *in vivo* іони лужних і важких металів неоднозначно впливають на пептидгідролазну активність екстрактів личинок третього дня розвитку. Як видно із рис. 3, іони Na^+, Cu^{++} і Zn^{++} є сильними активаторами протеолізу, тоді як іони K^+ і Co^{++} істотно пригнічують цей процес. Варто зазначити, що характерні для стадії личинки модифікації протеолітичної активності зовсім не спостерігаються на стадії лялечки та у статевонезрілих імаго. На жаль, механізм дії іонів металів на лужну пептидгідролазу дрозофіли мало вивчений і вимагає подальших досліджень.

Нами виявлено виразний інгібуючий вплив на пептидгідролазу дрозофіли високих доз хлорамфеніколу і етидійброміду після безпосередньої взаємодії цих хімічних сполук з ферментом у передінкубаційному середовищі.

В протилежність цьому, введення хлорамфеніколу в живильне середовище у зазначених концентраціях призводить до значного підвищення рівня пептидгідролазної активності личинок. Спостерігалося як збільшення загальної активності ферменту, так і питомої (за мінімальних концентрацій антибіотика — у 2-3,5 рази, за максимальних — у ~3 рази). Стимулююча

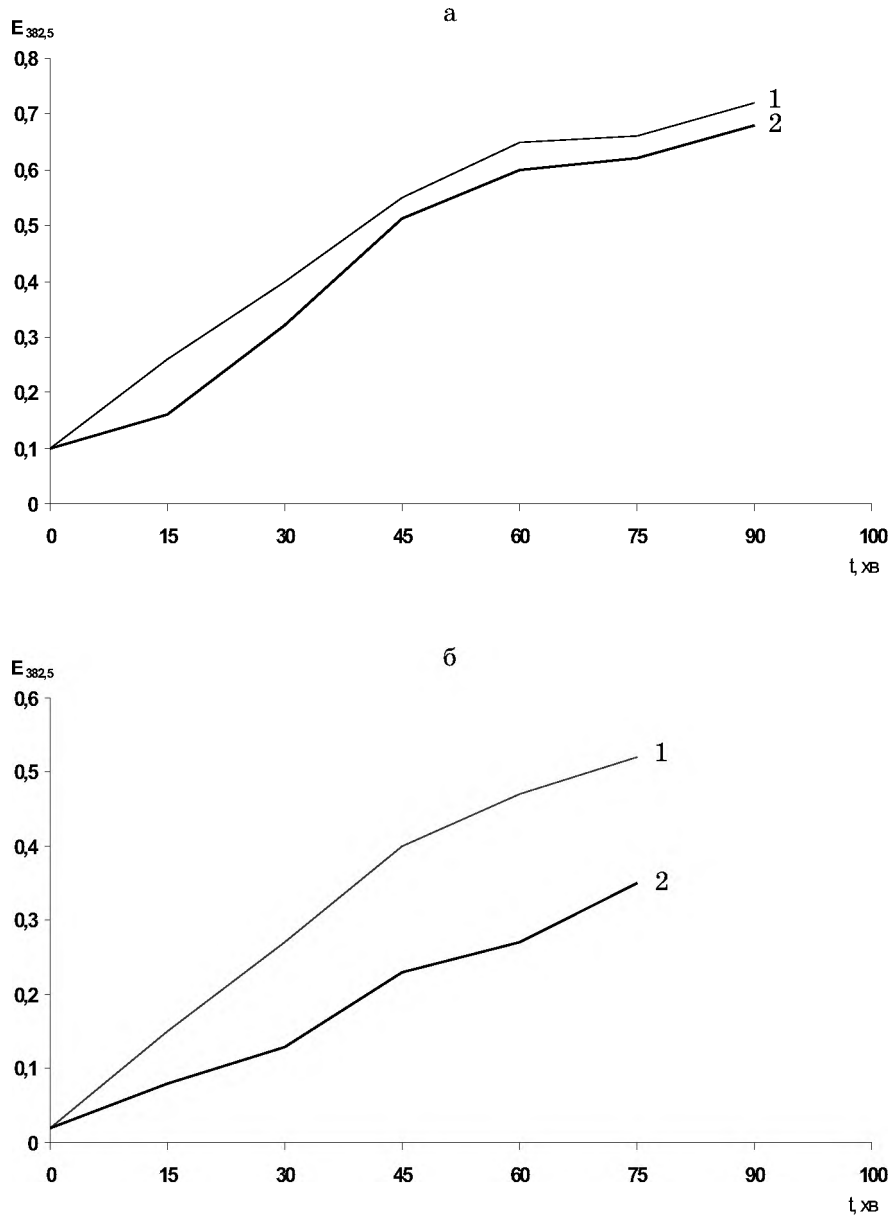

Рис. 2. Кінетика прояву активності гідроксидною пептидгідролазою кишечнику дрозофіли (а) та панкреатичним трипсином великої рогатої худоби (б) в системі з одним (БАПНА) та двома (БАПНА + БАЕЕ) специфічними субстратами:
1 — Ⓔ + $S_{БАПНА}$; 2 — Ⓔ + [$S_{БАПНА}$+$S_{БАЕЕ}$]

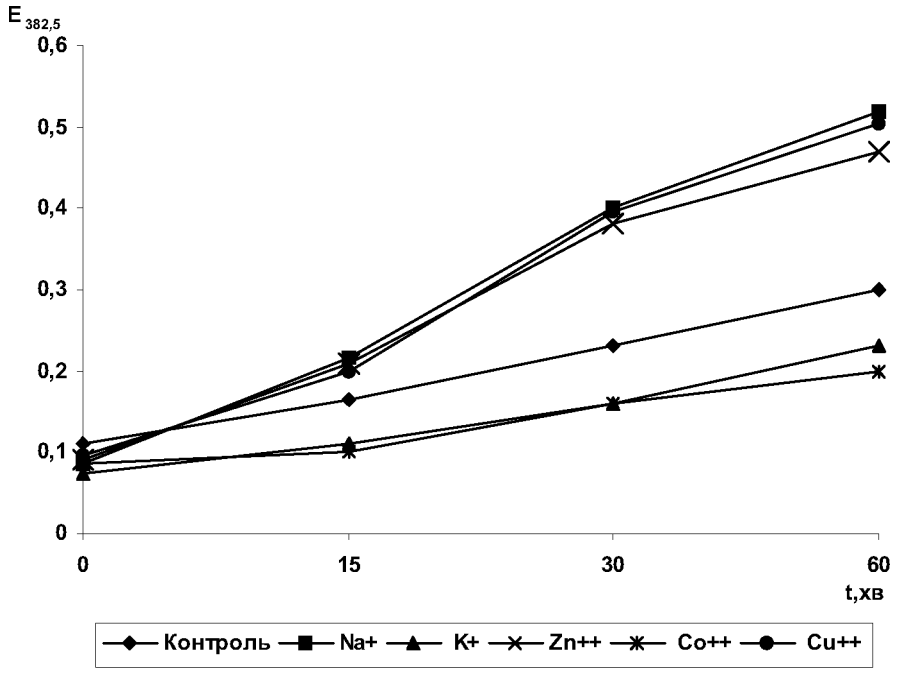

Рис.3. Кінетика гідролізу БАПНА пептидгідролазою личинок, які розвивалися на живильному середовищі з добавками іонів лужних та важких металів

дія хлорамфеніколу на кишкову протеазу личинок може пояснюватися тим, що антибіотик пригнічує синтез білків мікробіоти травного тракту комахи і тим самим зменшує концентрацію інгібіторів мікробного походження.

Наявність малих концентрацій (0,02 мг/мл) етидійброміду в живильному середовищі в 1,5 - 2 рази зменшує питому і відносну активність пептидгідролази щодо БАЕЕ. Висока концентрація (0,4 мг/мл) препарату в 2 - 2,5 рази підвищує активність досліджуваного ферменту.

Що стосується інших органічних реагентів (2, β-меркаптоетанолу, п-ХМБ та ін.), то вони менш ефективні при впливі на фермент *in vitro*. Очевидно, що SH-групи досліджуваної пептидгідролази мало доступні для цих органічних реагентів.

Серед неефективних у наших дослідах сполук можна назвати також визнаний інгібітор серинових протеаз – фенілметилсульфонілфлуорид. Досліджувана пептидгідролаза, яка за рядом властивостей може бути віднесена до трипсиноподібних ферментів, в протилежність останнім є нечутливою до зазначеного інгібітора. Однак деякі інші білкові інгібітори серинових протеаз (соєвий інгібітор трипсину, овомукоїд і контрикал) інактивують лужну пептидгідролазу кишечнику личинок дрозофіли так само, як і трипсин (табл.).

Таблиця

Вплив білкових інгібіторів на БАПНА-азну активність трипсину та лужної пептидгідролази кишечнику личинок дрозофіли

Інгібітори	Концентрація інгібітора, (мг/мл)	Ступінь інгібування чи активації пептидгідролаз	
		трипсину	гідроксидної пептидгідролази личинок
Соєвий інгібітор трипсину	0,50	–100	–80
Овомукоїд	0,50	–100	–100
Контрикал	0,50	–100	–100
Інгібітор гемолімфи лялечок	0,34	+46	–100

Примітка: "—" — відсоток інгібування; "+" — відсоток активації

Цікаво, що інгібітор гемолімфи лялечок повністю пригнічує БАПНА-азну активність пептидгідролази личинок, але не виявляє інгібуючої дії на зазначену активність трипсину, яка за цих умов навіть стимулюється.

При вивченні окремих кінетичних параметрів пептидгідролазної реакції з'ясовано, що швидкість розщеплення різних за будовою субстратів суттєво відрізняється. Очевидно, це обумовлюється ступенем спорідненості досліджуваного ферменту і відповідних субстратів. Так, значення константи Міхаеліса ($K_m = 1,5 \times 10^{-5}$ М) за гідролізу гемоглобіну свідчить про високу спорідненість ферменту і субстрату. На відміну від цього, для насичення пептидгідролази низькомолекулярним субстратом БАПНА необхідні дуже високі (1 і більше мМ) його концентрації. У присутності інгібітора лялечок активність пептидгідролази практично не залежить від концентрації БАПНА, що вказує на неконкурентне інгібування БАПНА-азної активності ферменту гемолімфатичним фактором.

При постійній кількості ферменту і надлишку субстрату гідроліз БАЕЕ здійснюється з високою швидкістю і рівномірно до повного розщеплення субстрату. За тих самих умов гідроліз БАПНА йде повільніше і помітно гальмується з плином часу. Причиною такого гальмування, ймовірно, є утворення продуктів гідролізу БАПНА, здатних пригнічувати активність пептидгідролази. В умовах реакції, що не лімітується кількістю субстрату, це припущення можна підтвердити внесенням у середовище інкубації нової, додаткової порції ферменту. Як з'ясувалося, при цьому відновлюється близька до попередньої швидкість БАПНА-азної реакції.

Про лужні властивості досліджуваної пептидгідролази свідчать особливості пересування ферментативно активної фракції за хроматографічного

та електрофоретичного розподілу білків екстракту личинок. Ізоелектричну точку пептидгідролази (pH 9,75) вдалося визначити методом ізоелектричного фокусування. За електрофоретичного поділу білків екстракту личинок відокремлюється незначна кількість лужних протеїнів, серед яких переважає білкова фракція, що втрачає рухливість у постійному електричному полі при pH 9,75. Білок цієї фракції виявляє протеолітичну активність стосовно синтетичних і природних субстратів.

Методом електрофорезу і гельової фільтрації визначена молекулярна маса лужної пептидгідролази, величина якої складає приблизно 26 кДа. За цим показником досліджуваний фермент близький до трипсину ссавців і з урахуванням всіх вивчених нами біохімічних властивостей може бути віднесений до групи трипсиноподібних ферментів.

Література

1. *Svechnicova I. G., Korolenko T. A., Stashko Ju. F. et al.* The influence of Ukrain on the grouth of Hd-l tumor in mice: the role of cysteine proteinases as marcers of tumor malignancy // Drugs under experimental and clinical research. — 1998. — V. XXIV, № 5/6. — P. 261-269.
2. *Korolenko T. A., Kaledin V. I., Svechnicova I. G. et al.* Study of the antitumor effect of Ukrain: the role of macrophage secretion of a_1-proteinase inhibitor // Drugs under experimental and clinical research. — 1998. — V. XXIV, № 5/6. — P. 271-276.
3. *Андриевский А. М.* Онтогенетические особенности протеиназно-ингибиторной активности дрозофилы при тепловом шоке // Биологические механизмы старения. Тез. докл. симпоз. — Харьков, 1984. — С. 7.
4. *Андриевский А. М.* Возрастные изменения активности гидроксидной пептидгидролазы в отделах кишечника дрозофилы // Біологічні механізми старіння. Тез. допов. міжн. симп. — Харків, 1996. — С. 11.
5. *Андриевский А. М., Радионов Д. Б., Федоренко Л. В., Скиба Я. Е.* Онтогенетические изменения в системе протеолиза у отдельных линий дрозофилы в норме и при тепловом воздействии // Биологические механизмы старения. Тез. докл. симп. — Харьков, 1998. — С. 27.
6. *Андриевский А. М., Катаненко С. В., Тоцкий В. Н.* Онтогенетические особенности пептидгидролазной активности экстрактов тканей *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. — 1982. — Т. 54, № 5. — С. 519-524.
7. *Тоцкий В. Н., Андриевский А. М.* Пептидгидролаза стенки кишечника дрозофилы // Молекулярная биофизика и генетика. — Киев: Наукова думка, 1985. — Вып. 10. — С. 47-52.
8. *Андриевский А. М.* Метод получения частично очищенной щелочной пептидгидролазы из личинок *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 4. — С. 54-59.
9. *Андриевский А. М.* Субстратная специфичность щелочной пептидгидролазы кишечника личинок дрозофилы // Мат. Научн. конф. молод. ученых Одес. ун-та. Одесса, 29-30 марта 1984. — Одесса, 1984. – С. 30-34. — Рукопись депон. в УкрНИИНТИ, № 91 Ук-85. Деп.
10. *Андриевский А. М.* Щелочная пептидгидролаза кишечника и ее ингибиторы в онтогенезе дрозофилы. — Дисс. ... канд. биол. наук. — Одесса, 1987. — 175 с.
11. *Тоцкий В. Н., Хаустова Н. Д., Андриевский А. М., Гандирук Н. Г., Белова Г. И., Есеркепова Е. В.* Экспрессивность ген-энзимных систем и показатели жизнеспособности в онтогенезе инбредных линий и гибридов дрозофилы // Генетика. — 1990. — Т. 26, № 10. — С. 1791-1799.
12. *Плохинский Н. А.* Алгоритмы биометрии. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 150 с.

Андриевский А. М.
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГИДРОКСИДНОЙ ПЕПТИДГИДРОЛАЗЫ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДРОЗОФИЛЫ

Резюме

Исследованы основные физико-химические свойства гидроксидного протеолитического фермента пищеварительного канала дрозофилы. Источником пептидгидролазы служили личинки инбредных линий дрозофилы дикого типа. На уровне экстрактов тканей, изолированных кишечников и высоко очищенного ферментного препарата определены температурный и pH оптимумы проявления активности пептидгидролазы, ее субстратная специфичность, устойчивость к действию ингибиторов, а также показано влияние на гидролитическую активность ионов металлов, хлорамфеникола, этидийбромида и других эффекторов. Обнаружена способность фермента сорбироваться на жестком полимерном носителе. Установлено, что структурная модификация иммобилизированной протеазы приводит к существенным изменениям ее субстратной специфичности. Определены кинетические показатели реакций гидролиза отдельных субстратов и другие параметры пептидгидролазы.

Ключевые слова: пептидгидролаза, катализ, дрозофила.

Andrievsky A. M.
Odessa National University after I. I. Mechnikov, Department of Genetics and Molecular Biology,
Dvoryanscaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF THE DROSOPHILA HYDROXIDE PEPTIDE HYDROLASE DIGESTIVE SYSTEM

Summary

The main physico-chemical properties of the alimentary drosophila hydroxide proteolitic enzyme canal were studied. The larvas of the wild drosophila lines were used as the peptide hydrolase biological source. The temperature and pH optimum as well as the substrate specificity were investigated on the drosophila bowel extracts and highly purified enzyme preparation. Also the tolerance to the inhibitors and the effects of metal ions as well as other effectors on its activity was showed. The enzyme ability to be sorbed on the tough polymer sorbent was established. The structure modification of the immobilised protease causes the substantive changes in its substrate specifity. Some kinetical and other parameters were measured.

Key words: peptide hydrolase, catalysis, drosophila.