



ENZIM: APLIKASI DI BIDANG KESEHATAN SEBAGAI AGEN TERAPI

Enzyme: Medical Application as Therapy Agent

Ni Nyoman Purwani*

Departemen Kesehatan, Fakultas Vokasi, Universitas Airlangga
Jl. Srikana 65, Surabaya 60286, Jawa Timur, Indonesia

*email: nyoman.purwani@vokasi.unair.ac.id

Abstrak. Enzim merupakan biokatalis untuk berbagai macam reaksi dan mengontrol semua proses metabolisme yang berlangsung pada tubuh manusia mulai dari hal sederhana seperti mengatur pencernaan sampai ke tingkat yang lebih kompleks seperti pengaturan sistem kekebalan tubuh manusia. Ketidadaan enzim dapat menyebabkan keseimbangan proses metabolisme tubuh terganggu. Beberapa penelitian terbaru mengenai enzim telah mempelajari kemungkinan enzim untuk dapat mengatasi penyakit jantung, gangguan pencernaan dan juga kanker. Terapi enzim merupakan salah satu metode alternatif untuk mengatasi permasalahan tersebut. Optimasi kondisi yang bertujuan untuk menurunkan biaya produksi serta menghindari efek samping yang mungkin ditimbulkan oleh penggunaan enzim telah dilakukan oleh beberapa peneliti yang diikuti seiring dengan meningkatnya perkembangan bioteknologi. Teknologi terbaru dengan mengkombinasikan enzim dengan obat-obatan tertentu menjadi target penelitian-penelitian terbaru. Kombinasi ini diharapkan akan membuat kerja obat dan enzim menjadi lebih efektif karena kerja sinergis dari keduanya.

Kata kunci: enzim, agen terapi, kesehatan

Abstract. Enzymes are biocatalysts for various reactions and control all metabolic processes that take place in the human body starting from simple things such as regulating digestion to more complex levels such as regulating the human immune system. The absence of an enzyme can cause the balance of the metabolic processes to be disrupted. Several recent studies of enzymes have reported the possibility of enzymes to overcome heart disease, digestive disorders and cancer. Enzyme therapy is an alternative method to overcome this problem. Optimization of conditions aimed to reducing production costs and avoiding the possible side effects caused by enzyme use have been carried out by several researchers followed along with the increasing development of biotechnology. The latest technology by combining enzymes with certain drugs is the target of the latest research. This combination is expected to make the work of drugs and enzymes more effective because of the synergistic work of both.

Keywords: enzyme, therapy agent, health

PENDAHULUAN

Enzim merupakan molekul biologis yang berfungsi mempercepat reaksi biokimia tertentu dan menghasilkan produk yang spesifik. Enzim, seperti halnya protein lain, disintesis oleh jaringan tubuh untuk memenuhi kebutuhan metabolik. Enzim dengan spesifisitas, afinitas, dan katalitik efisiensi yang tinggi sangat diperlukan dalam berbagai proses kimia untuk menopang kehidupan dan mempercepat reaksi kimia. Semua karakteristik enzim ini merupakan fokus utama dari semua pengembangan obat-obatan untuk mengatasi penyakit. Lebih dari satu

jaringan/organ dapat mensintesis satu atau lebih banyak enzim. Konsumsi teratur dari enzim dan makanan kaya enzim membantu melindungi tubuh dari kemungkinan terjangkitnya penyakit.

Enzim mulai digunakan untuk terapi karena mampu mengkatalisis reaksi kimia komplek di bawah kondisi fisiologis yang sesuai. Pada tahun 1960an de Duve (Vellard *et al*, 2003) mengusulkan bahwa penyakit terkait fungsi lisosom dapat diatasi dengan terapi enzim. Namun ketiadaan sarana yang mendukung membuat penelitian lebih lanjut mengenai penelitian di bidang enzim sebagai agen terapi tidak memungkinkan. Perkembangan enzim di bidang kesehatan mulai menemukan titik terang pada akhir abad 19 dimana enzim proteolitik (pepsin) mulai digunakan untuk membantu mengobati gangguan gastrointestinal seperti dispepsia. Lebih lanjut peneliti menemukan bahwa nuklease ekstraselular dari *Bacillus pyocyaneus* mampu membunuh *Bacillus anthracis* (Gonzales *et al*, 1999).

Penggunaan enzim sebagai agen terapi mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan obat konvensional karena enzim mempunyai spesifitas dan afinitas tinggi terhadap targetnya sehingga mengurangi toksisitasnya. Disamping itu kemampuan katalitiknya memungkinkan enzim untuk mengubah senyawa target menjadi produk yang diinginkan dalam waktu singkat sehingga memungkinkan untuk penggunaan enzim dalam jumlah kecil. Perkembangan teknologi DNA dan produksi protein rekombinan menjadi tonggak awal pengembangan enzim sebagai agen terapi.

APLIKASI ENZIM SEBAGAI AGEN TERAPI

Penelitian di bidang farmasi dalam penemuan senyawa obat dari molekul protein pada mulanya hanya difokuskan pada pembuatan antibodi, sitokin (interferon) dan hormon. Penelitian tentang enzim mulai mendapat perhatian karena beberapa fungsi yang dimiliki seperti:

1. Menggantikan enzim tertentu yang tidak dapat diproduksi tubuh karena kelainan genetik.
2. Menggantikan enzim tertentu yang hanya dapat diproduksi dalam jumlah terbatas karena kerusakan pada organ tertentu yang memproduksi enzim tersebut.
3. Membantu proses biologi yang membutuhkan keberadaan enzim sebagai katalis.

Enzim yang berpotensi secara medis (digestif dan metabolik) dapat digunakan baik secara bersamaan dengan enzim lain maupun tanpa kehadiran enzim lain dalam mengatasi penyakit tertentu. Enzim ini mempunyai dua fitur utama yaitu biasanya terikat dan bekerja pada target dengan spesifisitas dan afinitas tinggi dan mempunyai aktivitas katalitik yang tinggi serta mampu mengubah berbagai macam substrat menjadi produk yang diinginkan. Kedua fitur ini menjadikan enzim sebagai target utama untuk pengobatan penyakit tertentu. Untuk dapat berfungsi secara efektif sebagai agen terapi, terdapat beberapa persyaratan utama, yaitu:

1. Enzim harus stabil untuk memastikan enzim dapat bekerja dalam waktu tertentu selama proses pengobatan.
2. Tersedia dalam bentuk terlarut sehingga memungkinkan untuk pengobatan melalui intravena, intramuskular, dan subkutaneus.
3. Dalam bentuk murni sehingga efek samping yang tidak diinginkan yang memungkinkan terjadinya kontaminasi seperti endotoksin mikroba, pirogen, atau material berbahaya lainnya.
4. Mampu bekerja pada bagian tertentu dari organ yang dituju.

Namun demikian penggunaan enzim sebagai agen terapi tentu harus melalui serangkaian uji dari badan yang berwenang sehingga dapat dipastikan bahwa enzim membawa kebermanfaatan dan dapat meminimalisir efek samping yang ditimbulkan terutama komplikasi imunologi.

SUMBER DAN PRODUKSI ENZIM

Selama bertahun-tahun enzim umumnya diisolasi dari berbagai sumber seperti bakteri, jamur, dan hewan untuk tujuan terapi. Oleh karena imunogenitasnya enzim-enzim ini hanya dapat digunakan untuk aplikasi eksternal. Berkaitan dalam hal ini dosis, kemurnian dan sumber dari enzim bukan menjadi pertimbangan utama. Pemurnian enzim dari sumber manusia dalam jumlah yang cukup untuk diaplikasikan ke pasien paling tidak untuk tujuan uji coba masih menjadi tantangan bagi para peneliti. Akan tetapi sejumlah enzim yang diisolasi dari darah, urin, plasenta dan kultur sel manusia telah diujicobakan untuk tujuan klinis seperti faktor koagulasi, urokinase dan imigluserase. Adanya kontaminasi virus masih menjadi masalah utama isolasi enzim dari manusia disamping terbatasnya sarana pendukung.

Pada tahun 1980, isolasi enzim dari manusia dilakukan dengan bantuan teknologi DNA rekombinan. Penelitian awal tentang produksi protein rekombinan yang identik dengan enzim yang diisolasi dari manusia telah dikembangkan. Aspek penting yang perlu diperhatikan dalam produksi protein rekombinan untuk terapi adalah pemilihan sistem ekspresi. Kebanyakan enzim yang berasal dari manusia dalam bentuk aslinya adalah subjek untuk modifikasi *post-translasional* seperti glikosilasi, fosforilasi, asetilasi, atau proteolitik. Jika sel inang yang digunakan untuk produksi protein rekombinan tidak identik dengan sel dimana protein diproduksi secara alami modifikasi *post-translasional* mungkin mengalami perubahan dari pola aslinya. Hal ini mungkin akan berpengaruh pada farmakokinetik, farmakodinamik, dan imunitas dari enzim yang digunakan. Ada beberapa sistem ekspresi yang umum digunakan untuk ekspresi protein rekombinan.

1. Produksi dari sel manusia lebih menjanjikan karena modifikasi menyerupai keadaan aslinya, tetapi kontaminasi dari virus bisa menjadi masalah serius.
2. Produksi dari sel mamalia (umunya dari hewan coba hamster). Glikosilasi yang terjadi pada sel inang mamalia memiliki kemiripan dengan pola glikosilasi pada manusia.
3. Produksi dari yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) menghasilkan modifikasi *post-translasional* yang berbeda dengan pola modifikasi pada manusia, tetapi protein yang dihasilkan dari yeast telah lama digunakan.
4. Produksi dari *Escherichia coli* menghasilkan produk nonglikosilasi. Pada prinsipnya sistem produksi bakteri memiliki beberapa keuntungan dibandingkan sistem ekspresi yang lain, dari segi biaya, kemudahan, dan ketiadaan kontaminasi virus. Bagaimanapun protein eukariotik biasanya tidak dapat mengalami *folding* dengan baik pada bakteri, sehingga berpotensi terjadinya badan inklusi dan membutuhkan adanya *refolding*. Ini dapat dilakukan pada skala besar namun membutuhkan proses optimasi yang panjang untuk mendapatkan hasil yang diinginkan.
5. Produksi dari tanaman transgenik: sistem produksi ini masih dalam tahap pengembangan untuk mempelajari kemungkinan-kemungkinan yang terjadi khususnya untuk protein yang dibutuhkan dalam jumlah besar dan kompleks.

Beberapa jenis enzim yang umum digunakan sebagai agen terapi di bidang kesehatan antara lain:

Kolagenase

Kolagenase merupakan matrik metaloprotein yang memutuskan ikatan peptida dalam kolagen dan pertama kali diidentifikasi pada tahun 1942 (Gross *et al.*, 1962). Mikroorganisme patogen, terutama *C. histolyticum* telah dilaporkan sebagai penghasil kolagenase (Bauer *et al.*, 2013). Ada beberapa tipe enzim kolagenase, kolagenase tipe pertama dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme seperti *C. histolyticum*, organisme ini mampu memproduksi kolagenase yang dapat mendegradasi rantai polipeptida pada kolagen pada banyak sisi dan menghidrolisis kolagen pada ujung C (Schalage *et al.*, 2015). Kolagen tipe dua adalah yang disintesis dari mamalia. Kolagenase tipe ini dapat memutus tripel helik pada kolagen dari titik tertentu dan menghasilkan molekul tropokolagen. Kolagenase tidak bersifat merusak membran sel sehingga digunakan untuk dispersi sel, pemisahan jaringan, dan kultur sel. Sebagai contoh, *Clostridium histolyticum* (*C. histolyticum*) telah mendapatkan persetujuan dari *Food and Drug Administration* untuk digunakan sebagai penyembuh luka. Kolagenase lebih sering digunakan untuk pemisahan sel jaringan untuk tujuan medis. Umumnya digunakan untuk memindahkan dan merelokasi kelenjar insulin untuk penderita diabetes (Maimets *et al.*, 2015). Kolagenase juga dapat digunakan untuk mengisolasi sel lemak, adrenal, dan parenkim liver (Tuohetahuntala *et al.*, 2015). Kolagenase juga digunakan untuk teknik *G-banding* untuk mempelajari kromosom manusia (Peak *et al.*, 2015). Dewasa ini kolagenase digunakan untuk pengobatan beberapa jenis penyakit mengingat berkurangnya kolagen dalam tubuh dapat mempengaruhi fungsi fisiologis dari tubuh.

Enzim pankreas

Berkurangnya asupan enzim pankreas dapat mengakibatkan berkurangnya absorpsi lemak, protein dan karbohidrat, sehingga mengakibatkan defisiensi nutrisi serta berkurangnya berat badan dan gangguan pada pencernaan. Kondisi ini dikenal dengan istilah defisiensi pankreas eksokrin yang disebabkan oleh pankreatitis akut, *cystic fibrosis* dan kanker pankreas. Terapi enzim pankreas mulai mendapat perhatian mengingat perannya dalam meningkatkan penyerapan lemak dan nitrogen (Sikkens *et al.*, 2010). Uji efikasi dan keamanan untuk terapi enzim pankreas dalam mengatasi *cystic fibrosis* telah dilaporkan oleh Somaraju & Solis-Moya (2014). Meskipun dibutuhkan uji lebih lanjut untuk mengetahui dosis yang tepat untuk tingkat keparahan yang berbeda. Kombinasi enzim lipase, protease dan amilase merupakan komposisi enzim pankreas yang umum digunakan dan dikenal dengan istilah pankreatin. Enzim pankreas juga dapat digunakan sebagai suplemen untuk mengatasi masalah pencernaan dan konstipasi (Kaur & Sekhon, 2010).

Lipase

Lipases mengkatalisis hidrolisis triasilgliserol dan fosfolipid dan merupakan enzim pencernaan yang dapat diisolasi dari bakteri, jamur dan dari sumber hewani (Hasan *et al.*, 2005). Lipase diketahui dapat digunakan untuk pengobatan tumor karena kemampuannya untuk mengaktivasi faktor nekrosis tumor. *Acinetobacter haemolyticus* TA106 yang diisolasi dari kulit pada manusia menunjukkan kemampuan untuk memproduksi enzim lipase pada kondisi media yang sudah dioptimasi (Jagtap *et al.*, 2010). Sementara itu lipase dari *Candida rugosa* memproduksi lovastatin yang mempunyai kemampuan untuk menurunkan kadar

kolesteol serum. Lipase yang diperoleh dari mikroba menunjukkan aktivitas lipolitik yang signifikan dan stabil pada terhadap aktivitas proteolitik. Lipase juga digunakan untuk dispepsia, gangguan gastrointestinal, alergi, dan berbagai jenis infeksi (Matsumae *et al.*, 1993).

Kitinase

Kitin merupakan komponen dinding sel yang dapat ditemukan pada banyak organisme patogen, meliputi jamur, protozoa dan cacing serta merupakan target untuk antimikroba. Dinding sel dari *Streptococcus pneumonia*, *Clostridium perfringens*, dan *Bacillus anthracis*, menjadi target enzim litik yang diturunkan dari bakteriofage (Zimmer *et al.*, 2002). Kitinase dapat digunakan untuk zat aditif pada krim antijamur dan juga digunakan sebagai penguat tulang pada osteoporosis (Ratanapavon *et al.*, 2009), dan sebagai agen antibakteri (Rhoades *et al.*, 2006). Kitinase dapat mendegradasi kitin menghasilkan kitoooligosakarida seperti kitoheksaosa dan kitoheptaosa, keduanya dilaporkan memiliki aktivitas antitumor. Kitinase juga diketahui menurunkan kadar glukosa serum pada penderita diabetes (Lee *et al.*, 2003).

Lakase

Lakase dikenal juga sebagai enzim oksigen oksidoreduktase dan umumnya berwarna biru. Enzim ini mengkatalisis senyawa organik umumnya senyawa fenolik dan beberapa senyawa non fenolik dengan bantuan mediator (Giardina *et al.*, 2010). Lakase pertama kali diisolasi dari jamur *Rhus vernicifera* oleh peneliti dan termasuk ke dalam famili *Ananardiaceae*. Hanya ada sedikit enzim yang mampu mengkatalisis reaksi redoks yang sama seperti yang dikatalisis oleh lakase, seperti sitokrom-c oksidase, bilirubin oksidase, phenoxazinon sintase, L-askorbat oksidase (Baldrian *et al.*, 2006). Lakase mempunyai spesifitas substrat yang luas dan setiap jenis lakase mempunyai aktivitas terhadap substrat yang berbeda-beda (Giardina *et al.*, 2010). Lakase mempunyai aplikasi yang luas di bidang bioteknologi dan pengolahan limbah. Pada tahun 2006 lakase yang diekstrak dari jamur *Funalia trogii* (atau dikenal juga sebagai *Trametes trogii*) dan *Coriolus versicolor* (juga dikenal sebagai *Trametes versicolor*), dilaporkan memiliki aktivitas terhadap sel kanker (Zhao *et al.*, 2014). Studi lanjutan menunjukkan bahwa lakase dengan berat molekul berbeda dari jamur *Basidiomycetes* memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker MCF-7 and liver (Rashid *et al.*, 2011). Lakase telah diisolasi dari bakteri seperti *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lavendulae*, *S. cyaneus* dan *Marinomonas mediterranea*. Lakase yang diisolasi dari bakteri ini berperan dalam produksi pigmen, melindungi dari pengaruh radiasi UV, dan efek buruk dari hidrogen peroksida (Robert *et al.*, 2002).

Natokinase

Makanan tradisional Jepang (*Nato*) diperoleh dengan memanaskan kacang kedelai dengan suhu tinggi dan difermentasi dengan *Bacillus subtilis* natto. Pada tahun 1987, Sumi *et al.* menemukan adanya senyawa aktif pada *Nato* berupa enzim fibrinolitik yang selanjutnya dinamakan natokinase. Natokinase merupakan enzim dengan berat molekul $20,000 \pm 5000$ dan tersusun atas rantai polipeptida dengan 275 residu alanin pada ujung N. Natokinase berperan dalam pemutusan ikatan fibrin dan trombin yang terikat dengan fibrin yang menjadi target pengobatan penyakit *atherosclerotic* meliputi miocardial infarksi, serebral vaskular, pulmonary emboli, hemorrhoids, serta penyakit lain yang terkait. Natokinase juga membantu mengurangi faktor-faktor penyebab terjadinya penggumpalan darah dan lemak

dikaitkan dengan meningkatnya resiko terkena penyakit jantung. Enzim ini mengurangi kadar fibrinogen, faktor VII, dan faktor VIII pada plasma (Hsia *et al.*, 2009). Natokinase juga mempunyai potensi sebagai agen antitrombolitik untuk pencegahan penyakit kardiovaskular (Weng *et al.*, 2017).

Asparaginase

Asparaginase adalah aminohidrolase yang mengkonversi asparagin, asam aspartat dan ammonia, yang menyebabkan kematian sel. Sel leukimia membutuhkan asparagin dalam jumlah besar untuk perkembangbiakan selnya. Pemberian asparagin akan menurunkan asupan kadar asparagin dalam serum dan lebih lanjut membunuh sel kanker. Sel normal tidak dipengaruhi karena mereka dapat mensintesis asparagin secara intraselular melalui bantuan enzim L-asparagin sintetase (Narta *et al.*, 2007). Enzim ini telah digunakan dalam pengobatan leukimia limfoblastik akut selama kurang lebih 30 tahun. Kombinasi L-asparagin dengan obat dan radioterapi terbukti efektif mengatasi leukimia limfoblastik akut, meskipun beberapa sel tumor menunjukkan resistensi terhadap L-Asparagin. Tiga jenis asparaginase yang umum dijumpai adalah asparaginase dalam bentuk aslinya; asparaginase terpegilasi, yang diturunkan dari *Escherichia coli*; yang diisolasi dari *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspase) dengan aktivitas antitumor. Enzim ini juga telah digunakan sebagai model pembelajaran untuk pengembangan obat terbaru (Rizaari *et al.*, 2013). *Bacillus aryabhatai* ITBH02 dilaporkan memiliki potensi untuk memproduksi enzim L-asparaginase (Singh & Srivastava, 2013). Selain itu Actinomycetes, seperti *Streptomyces canus*, *S. cyaneus*, *S. exfoliates* dan *S. phaeochromogenes* juga dilaporkan memiliki potensi untuk memproduksi L-asparaginase bebas glutaminase dengan aktivitas sebagai agen terapi yang lebih baik (Kumar *et al.*, 2011).

Tabel 1. Enzim yang digunakan sebagai agen terapi

Enzim	Sumber	Kegunaan
Arginase (Kaur and Sekhon, 2012)	<i>Bacillus subtilis</i> & <i>Escherichia coli</i>	Antitumor
Alkaline protease (Vishalakshi <i>et al.</i> , 2009)	<i>Streptomyces gulbargensis</i>	Pengolahan limbah-limbah medis
Glukosa oksidase (Bankar <i>et al.</i> , 2009)	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> & <i>Saccharomyces sp.</i>	Antimikroba
Bacstraci sinthetase (Pfaender <i>et al.</i> , 1973; Konz <i>et al.</i> , 1987)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Antibiotik
Glutaminase (Spiers and Wade, 1976)	<i>Escherichia coli SFL-1</i>	Leukimia
Maltase (Kaur & Sekhon, 2012)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Terapi untuk Pompe's disease
Rhodanase (Kaur & Sekhon, 2012)	<i>Sulfobacillus sibiricus</i>	Mengatasi Keracunan sianida
Serratiopeptidase (Kaur & Sekhon, 2012)	<i>Serratiamarcescens</i>	Anti inflamatori
Superoxide dismutase (Kaur & Sekhon, 2012)	<i>Mycobacterium sp.</i> & <i>Nocardia sp.</i>	Anti oksidan
Tirosinase (Kaur & Sekhon, 2012)	<i>Streptomyces glaucescens</i> , & <i>Erwinia herbicola</i>	Antitumor, pengobatan parkinson

KESIMPULAN

Terapi enzim merupakan salah satu metode alternatif untuk penanganan masalah kesehatan terutama terkait penyakit jantung, kanker, gangguan pencernaan, infeksi virus dan bakteri serta penyakit keturunan. Optimasi kondisi yang bertujuan untuk menurunkan biaya produksi serta menghindari efek samping yang mungkin ditimbulkan oleh penggunaan enzim telah dilakukan oleh beberapa peneliti yang diikuti seiring dengan meningkatnya perkembangan bioteknologi. Teknologi terbaru dengan mengkombinasikan enzim dengan obat-obatan tertentu menjadi target penelitian-penelitian terbaru. Kombinasi ini diharapkan akan membuat kerja obat dan enzim menjadi lebih efektif karena kerja sinergis dari keduanya.

DAFTAR PUSTAKA

- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215-242.
- Bauer, R., Wilson, J. J., Philominathan, S. T. L., Davis, D., Matsushita, O., Sakon, J. (2013). Structural comparison of ColH and ColG collagen binding domains from *Clostridium histolyticum*. *Journal of Bacteriology*, 195(2), 318-327.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., Ananthanarayan, L. (2009). Optimization of *Aspergillus niger* fermentation for the production of glucose oxidase. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 344 – 352.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 369-385.
- Gonzales, N. J., Isaacs, L. L. (1999). Evaluation of pancreatic proteolytic enzyme treatment of adenocarcinoma of the pancreas with nutrition and detoxification support. *Nutrition and Cancer*, 33, 117-124.
- Gross, J., Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(6), 1014-1022.
- Hasan, F., Shah, A. A. & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235-251.
- Hsia, C. H., Shen, M. C., Lin, J. S., Wen, Y. K., Hwang, K. L., Cham, T. M., Yang, N. C. (2009). Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects. *Nutrition Research*, 29, 190–196.
- Jagtap, S., Gore, S., Yavankar, S., Pardesi, K., Chopade, B. (2010). Optimization of medium for lipase production by *Acinetobacter haemolyticus* from healthy human skin. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 936-941.
- Kaur, R., Sekhon, B. S. (2012). Enzymes as drugs: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 3, 29-41.
- Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K., Marahiel, A. M. (1997). The batcitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chemistry & Biology*, 4, 927-937.
- Kumar, S., Venkata, D. V., Pakshirajan, K. (2011) Studies on pH and thermal stability of novel purified L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *Microbiology*, 81, 349-355.
- Lee, H. W., Park, Y. S., Choi, J. Y., Yi, S. Y., Shin, W. S. (2003). Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(8), 1100—1103.

- Maimets, M., Bron, R., deHaan, G., van Os, R., Coppes, R. P. (2015). Similar ex vivo expansion and post-irradiation regenerative potential of juvenile and aged salivary gland stem cells. *Radiotherapy & Oncology*, 116(3), 443-448.
- Matsumae, H., Furui, M., Shibatani, T. (1993). Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester: the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75, 93-98.
- Narta, U. K., Kanwar, S. S., Azmi, W. (2007). Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 61, 208-221.
- Peak, T. C., Mitchell, G. C., Yafi, F. A., Hellstrom, W. J. (2015). Role of collagenase *Clostridium histolyticum* in Peyronie's disease. *Biologics*, 9, 107-116.
- Pfander, P., Specht, D., Heinrich, G., Schwarz, E., Kuhnle, E., Simlot, M. M. (1973). Enzyme of *Bacillus licheniformis* in the biosynthesis of bacitracin A. *FEBS Letters*, 32, 100-104.
- Rashid, S., Unyayar, A., Mazmanci, M. A., McKeown, S. R., Banat, I. M. (2011). A study of anti-cancer effects of *Funalia trogii* in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1477-1483.
- Ratanavaraporn, J., Kanokpanont, S., Tabata, Y., Damrongsakkul, S. (2009). Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitoooligosaccharide films. *Carbohydrate Polymers*, 78, 873-878.
- Rhoades, J., Gibson, G., Formentin, K., Beer, M., Rastall, R. (2006). Inhibition of the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* strains to HT-29 cells in culture by chito-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 64, 57-59.
- Rizzari, C., Conter, V., Starý, J., Colombini, A., Moericke, A., Schrappe, M. (2013). Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Current Opinion in Oncology*, 25, S1-S9.
- Roberts, S. A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J. T. (2002). Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 2766-2771.
- Schlage, P., Kockmann, T., Kizhakkedathu, J. N. (2015) Monitoring matrix metalloproteinase activity at the epidermal-dermal interface by SILAC-iTRAQ-TAILS. *Proteomics*, 15(14), 2491-2502.
- Sikkens, E. C. M., Cahen, D. L., Kuipers, E. J. & Bruno, M. J. (2010). Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24, 337-347.
- Singh, Y., Srivastava, S. K. (2013). Statistical and evolutionary optimization for enhanced production of an anti-leukemic enzyme, L-asparaginase, in a protease-deficient *Bacillus aryabhattai* ITBHU02 isolated from the soil contaminated with hospital waste. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51, 322-335.
- Somaraju, U. R., Solis-Moya, A. (2014). Pancreatic enzyme replacement therapy for people with cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1-62.
- Spiers, A. S., Wade, H. E. (1976). Bacterial glutaminase in treatment of acute leukimia. *British Medical Journal*, 1(6021), 1317-1319.
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., Muraki, H. (1987). A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a typical and popular food of the Japanese diet. *Experientia*, 43, 1110-1111.

- Tuohetahuntala, M., Spee, B., Kruitwagen, H. S., Wubbolts, R., Brouwers, J. F., van de Lest, C. H. (2015). Role of long-chain acyl-CoA synthetase 4 in formation of polyunsaturated lipid species in hepatic stellate cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851(2), 220-230.
- Vellard, M. (2003). The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 444-450.
- Vishalakshi, N., Lingappa, K., Amena, S., Prabhakar, M., Dayanand, A. (2009). Production of alkaline protease from *Streptomyces gulbargensis* and its application in removal of blood stains. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 280-285.
- Weng, Y., Yao, J., Sparks, S., Wang, K. Y. (2017). Nattokinase: an oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-13.
- Zhao, J., Kwan, H. S. (2009). Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4908-4913.
- Zimmer, M., Vukov, N., Scherer, S., Loessner, M. J. (2002). The murein hydrolase of the bacteriophage 3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5311-5317.