

УДК 579.222.3:577.152.34

ОБРАЗОВАНИЕ И СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *Aspergillus flavus* O-1, АКТИВНОЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФИБРИЛЛЯРНЫМ БЕЛКАМ

© 2021 г. А. А. Галиакберова¹, Д. М. Бедненко¹, В. Г. Крейер¹,
А. А. Осмоловский^{1, *}, Н. С. Егоров²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

²Международный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 17.03.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

Показано, что микромицет *A. flavus* O-1 секретирует комплекс по меньшей мере из двух протеолитических ферментов. Методом препаративного изоэлектрофокусирования был выделен наиболее активный фермент и охарактеризован как сериновая протеиназа с молекулярной массой 17 кДа и pI 7.82. Протеиназа обладала широкой субстратной специфичностью и была способна расщеплять такие фибриллярные белки, как коллаген, эластин и фибрин.

Ключевые слова: *Aspergillus flavus*, протеиназы, сериновые протеиназы, протеолитическая активность

DOI: 10.31857/S0555109921050068

Протеиназы микроорганизмов составляют около 60% всех промышленных ферментов в мире [1]. Микроскопические грибы – микромицеты, способны продуцировать различные протеолитические ферменты, в большинстве случаев – внеклеточные, относящиеся к классам сериновых, аспартильных и металлопротеиназ [2]. Протеиназы микромицетов разнообразны как по условиям секретирования, условиями действия (температура, pH), так и по молекулярной массе, строению и субстратной специфичности.

В настоящее время протеолитические ферменты активно применяются в различных отраслях, таких как пищевая промышленность (обработка мяса, ускорение созревания сыров и пр.), сельское хозяйство, кожевенное и меховое производство (для удаления волос, размягчения и обезжиривания), бытовая химия (в качестве детергентов в моющих средствах). Целевое применение они приобрели также в фармакологии и медицине, так как входят в основу препаратов, направленных на улучшение пищеварения, уменьшение воспаления, ускорение ранозаживления, восстановление гемостаза [3, 4]. Наиболее широко применяются протеиназы, активные в щелочных условиях: при получении моющих средств, в пищевой промышленности, при выделке кож, в медицине [5]. В медицине и косметологии в основном используются

ферменты, расщепляющие коллаген (коллагенолитическая активность), эластин (эластолитическая активность), фибрин (фибринолитическая активность) и фибриноген (фибринолитическая активность) [5].

Большинство видов аспергиллов в процессе роста и развития секретируют протеиназы с разными свойствами, что определяет их прикладное значение. *Aspergillus flavus* – условно патогенный представитель рода *Aspergillus*, наиболее часто выделяемый из почвы, воздуха, обитающий на старых книгах и перьевых подушках, в кондиционерах и увлажнителях воздуха. Отдельные штаммы *A. flavus* выделены из зерен пшеницы и бобовых [6].

Известно, что микромицет *A. flavus* образует протеиназы, способные расщеплять эластин [7], гидролизовать фибрин, проявляя плазминоподобную активность, и активировать некоторые проферменты системы гемостаза [8]. В экзопротеоме *A. flavus* преобладают различные изоформы щелочной сериновой протеиназы, а также металлопротеиназы с эластолитической активностью [9]. Металлопротеиназы микромицета были охарактеризованы как эластазы, способные расщеплять не только эластин, но также коллаген, овалальбумин и др. [10, 11]. Для некоторых изоформ сериновых протеиназ была также показана эластолитическая активность [12, 13]. Предположительно, именно

сериновая протеиназа является основным IgE-связывающим аллергеном *A. flavus* [14]. В определенных условиях культивирования *A. flavus* способен выделять протеиназы, обладающие коллагенолитической активностью [15].

Цель работы – изучение особенности образования и протеолитические свойства внеклеточных протеиназ микромицета *A. flavus* O-1 по отношению к фибриллярным белкам.

МЕТОДИКА

Культивирование микромицета. Микромицет *A. flavus* O-1 был получен из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Культуру поддерживали на скошенном сусло-агаре, хранили при температуре 25°C.

Получение препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. flavus* O-1. Для выделения протеолитических ферментов микромицет культивировали в глубинных условиях в шейкере-инкубаторе ES – 20/60 (“Biosan”, Латвия) при 200 об./мин в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28°C в течение 2 сут на посевной среде (%): сусло – 6.7, глюкоза – 2.0, пептон – 0.1. После окончания сроков выращивания часть полученного посевного материала переносили в ферментационную среду следующего состава (в %): глюкоза – 3.0, глицерин – 7.0, гидролизат рыбной муки – 0.5, NaNO₃ – 0.2, K₂HPO₄ – 0.05, MgSO₄ – 0.05.

Для подбора оптимальных условий для секреции культурой *A. flavus* O-1 внеклеточных протеиназ, поддерживали различные значения pH среды (от 3 до 9), и температуры (24, 28, 30 и 32°C). Изучали динамику роста и образования протеиназ микромицетов в течение 7 сут, ежедневно определяя прирост биомассы и накопление протеолитических ферментов. Биомассу гриба отделяли фильтрованием, а затем высушивали при 86°C до постоянной массы, рассчитывая ее прирост в мг/мл среды.

Для получения препарата внеклеточных протеиназ продуцента биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через фильтровальную бумагу (“ФС”, Россия). Внеклеточные белки осаждали сульфатом аммония, доводя его концентрацию до 80% от насыщения. Осадок белков формировался при 4°C в течение 12 ч, после чего его отделяли центрифугированием при 15000 g 20 мин при 4°C, затем растворяли в минимальном объеме 0.01 М Трис-НСl-буфера, pH 8.2, с 0.002 М ацетатом кальция, а затем диализовали в диализных мешочках против этого же буфера 12 ч при 4°C на магнитной мешалке. Диализованный раствор белков центрифугировали в тех же усло-

виях для удаления нерастворимой части осадка и лиофильно высушивали.

Определение белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом по поглощению при 280 нм. Поглощение при 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см, равное 1.0 в 1 мл принимали за одну оптическую единицу (о.е., A₂₈₀) [16].

Разделение препарата внеклеточных протеиназ. Фракционирование протеиназ лиофильно высушенного препарата осуществляли в колонке объемом 110 мл (“ЛКВ”, Швеция) в градиенте плотности сахарозы 0–40% по методу Вестерберга [17], используя амфолины с pH 3.5–10 (“ЛКВ”, Швеция) при 4°C, напряжении 800 В в течение 36 ч. После проведения изоэлектрофокусировки содержимое колонки собирали фракциями объемом 1.5 мл с помощью коллектора фракций. В каждой фракции определяли потенциометрически изоэлектрическую точку (pI), поглощение при 280 нм и протеолитическую активность.

Электрофорез белков в ПААГ. Для определения молекулярной массы протеиназы использовали электрофорез в ПААГ с ДСН по Лэммли [18] на приборе для вертикального электрофореза VE-10 (“Helicon”, Россия). Концентрация акриламида в верхнем слое геля была 6.0%, нижнем – 7.5%. Электрофоретическое разделение белков проводили при силе тока 100 мА и напряжении 200 В. Для определения молекулярной массы протеиназ использовали набор метчиков Unstained Protein Molecular Weight Marker (“Thermoscientific”, США). Крашивание белков в геле проводили раствором Кумасси G-250 в 3.5%-ной хлорной кислоте. Отмывку гелей от красителя осуществляли 7%-ной уксусной кислотой.

Ингибиторный анализ. Для изучения действия ингибиторов на активность протеиназ, секретлируемых культурой *A. flavus* O-1, использовали следующие соединения: ЭДТА (1.1 мг/мл) – ингибитор металлопротеиназ, *n*-хлормеркурибензоат (*n*-ХМБ, 0.5 мг/мл) – ингибитор цистеиновых протеиназ, фенолметилсульфонил фторид (PMSF, 0.3 мг/мл) – ингибитор сериновых протеиназ, TLSK (0.4 мг/мл) – ингибитор трипсиновых протеиназ и TPSK (0.4 мг/мл) – ингибитор химотрипсиновых протеиназ; соевый ингибитор трипсина (1.1 мг/мл) – ингибитор трипсиновых протеиназ. Действие ингибиторов исследовали при соотношении фермент : ингибитор – 1 : 10 и 1 : 100 [19]. После инкубации фермента с ингибитором в течение 1 ч определяли остаточную активность фермента по описанному выше методу и выражали в процентах от контроля (без ингибитора).

Определение протеолитической активности с нативными белковыми субстратами. Общую протеолитическую активность проверяли с помощью реакции расщепления казеина модифицированным

методом Ансона-Хагихары [20, 21], определяя количество тирозина в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой (ТХУ) продуктах протеолиза после десятиминутного гидролиза 1%-ного раствора казеина в 0.1 М Трис-НСI буфере, рН 8.0–8.2 при 37°C. К 200 мкл пробы добавляли 400 мкл раствора казеина. Реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10%-ной ТХУ. Осадок центрифугировали 10 мин при 12400 g и определяли поглощение раствора при 275 нм. За единицу активности ($E_{\text{Тир}}$) принимали количество мкмоль тирозина, образовавшегося за 1 мин в заданных условиях.

Фибринолитическую активность определяли, добавляя к 200 мкл пробы 400 мкл 1%-ной суспензии фибрина в 0.1 М Трис-НСI буфере, рН 8.2. Время реакции при 37°C составляло 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10%-ной ТХУ, осадок отделяли центрифугированием и определяли поглощение при 275 нм. Активность выражали в $E_{\text{Тир}}$.

Определение протеолитической активности с окрашенными белковыми субстратами. Определение коллагенолитической активности проводили с использованием в качестве субстрата азоколла ("Sigma-Aldrich", США). К 200 мкл пробы добавляли 400 мкл суспензии 2%-ного азоколла в 0.05 М Трис-НСI буфере, рН 8.2. Полученную смесь инкубировали при 37°C на термощейкере (600 об./мин) в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10%-ной ТХУ, после чего осадок отделяли центрифугированием и спектрофотометрически определяли поглощение пробы при длине волны 519 нм. За единицу активности ($E_{\text{азк}}$) принимали количество фермента, приводящее к увеличению оптической плотности продуктов реакции на 0.1 ед.

Протеолитическую активность с High Powder Azur (НРА, "Calbiochem", США) определяли, добавляя к 250 мкл пробы 400 мкл суспензии 0.2%-ного НРА в 0.05 М Трис-НСI буфере, рН 8.2. Полученную смесь инкубировали при 37°C на термощейкере при 600 об./мин в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 750 мкл 10% ТХУ, после чего осадок центрифугировали и спектрофотометрически определяли поглощение пробы при длине волны 525 нм. За 1 ед. активности принимали количество фермента, приводящее к увеличению оптической плотности продуктов реакции на 0.1.

Азоказеиназную активность определяли с использованием субстрата азоказеина ("Sigma-Aldrich", США). В реакционной смеси к 100 мкл пробы добавляли 250 мкл суспензии 0.2%-ного азоказеина в 0.1 М Трис-НСI буфере, рН 8.2. Полученную смесь инкубировали при 25°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 10%-ного ТХУ, после чего осадок центрифугировали и спектрофотометрически определяли

поглощение пробы при длине волны 340 нм. За 1 ед. активности принимали количество фермента, приводящее к увеличению оптической плотности продуктов реакции на 0.1.

Определение амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами. Активность определяли по реакции с субстратами эластазы (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA), субтилизина (Z-Ala-Ala-Leu-pNA), плазмина (H-DVal-Leu-Lys-pNA), тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), тканевого активатора плазминогена (dIle-Pro-Arg-pNA), урокиназы (pGlu-Gly-Arg-pNA), фактора Ха (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), активированного протеина С (pGlu-Pro-Arg-pNA) и химотрипсина (Ac-Phe-pNA). Для проведения реакций к 200 мкл пробы добавляли по 100 мкл субстрата 0.5 мг/мл в Трис-НСI буфере, рН 8.2 и 50 мкл 0.05 М Трис-НСI буфера, рН 8.2. Время реакции при 37°C – 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты, после чего определяли поглощение спектрофотометрически при 405 нм. За 1 ед. активности (E_{pNA}) принимали количество отщепившегося pNA за 1 мин.

Определение протеолитической активности методом фибриновых пластин. Фибринолитическую и активаторную по отношению к плазминогену активность определяли на фибриновых пластинках по методу Аструпа–Мюллерца–Лассена [22, 23]. Для приготовления фибриновой пластинки в чашке Петри смешивали 9 мл раствора 0.5%-ного фибриногена ("Sigma-Aldrich", США) и 250 мкл 0.4%-ного тромбина. На поверхность пластинок наносили по 30 мкл пробы, после чего чашки инкубировали в термостате при 37°C. Измерения зон лизиса проводили через 3 и 24 ч инкубации. Активность выражали в условных единицах на 1 мл пробы. За 1 усл. ед. принимали количество фермента вызывающего зону гидролиза фибриновой пластины в 1 мм².

Для приготовления фибриновой пластины со смесью фибриллярных белков в чашке Петри смешивали 9 мл раствора, содержащего 0.5% фибриногена, 0.5% коллагена ("Sigma-Aldrich", США), 0.5% эластина ("Sigma-Aldrich", США) и 250 мкл 0.4%-ного тромбина ("Sigma-Aldrich", США). Для растворения фибриллярных белков и тромбина использовали смесь физиологического раствора и 0.05 М Трис-НСI буфера, рН 8.2. На поверхность пластинок наносили по 30 мкл пробы, после чего чашки инкубировали в термостате при 37°C. Измерения зон лизиса проводили через 3 и 24 ч инкубации. Активность выражали в условных единицах на 1 мл пробы.

Определение наличия углеводных фрагментов в составе протеиназы *A. flavus* O-1. Реакцию на гликопротеины, присутствующие в белковом образце, проводили методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах, как описано ранее [24].

В качестве положительного контроля на реакцию использовали раствор внеклеточной дрожжевой инвертазы, в качестве отрицательного – БСА, в концентрациях 0.5 мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Микромицет *Aspergillus flavus* Link принадлежит к анаморфам грибов аскомицетного аффинитета: роду *Aspergillus*, семейству Aspergillaceae, порядка Eurotiales, класса Eurotiomycetes, отдела Ascomycota. Обычно представителей этого вида выделяют из почвы, растительных и животных остатков; встречаются условно-патогенные и патогенные виды.

Подбор оптимального pH среды для роста и образования протеаз *A. flavus* O-1 показал, что наибольшая общая протеолитическая (казеинолитическая) активность наблюдалась при pH 6–6.5, в то время как продуктивность мицелия по образованию фермента была выше при культивировании в среде с pH 8.0–9.0 (рис. 1а). Максимальное значение фибринолитической активности и продуктивность образования фермента наблюдали при трех значениях pH – 9.0, а также 6.0 и 7.0, при pH 4.0 фермент не секретировался в среду совсем (рис. 1в). Наибольшая эластолитическая активность *A. flavus* O-1 и ее образование на единицу биомассы наблюдались на среде с pH 3.0 и 4.0, при выращивании на среде с pH 5.0 и 5.5 активность не детектировалась (рис. 1г). Результаты определения активности коллагеназы в культуральной жидкости (КЖ) *A. flavus* O-1 показали, что оптимальный pH среды для синтеза фермента – 6.5. При этом pH наблюдались высокие как активность фермента, так и продуктивность мицелия гриба. Также высокая продуктивность наблюдалась при pH 3.0 и 8.0. При выращивании на среде с pH 4.0 и 5.0 активность не обнаруживали (рис. 1б).

В результате эксперимента по подбору оптимальной температуры, для образования протеиназ у *A. flavus* O-1 установлен диапазон температур от 24 до 30°C (рис. 2а). Фибринолитическая и эластолитическая активности, а также продуктивность микромицета, были наибольшими при температуре культивирования 24° (рис. 2б, 2г), а коллагенолитическая – 30°C (рис. 2в).

Таким образом, для *A. flavus* O-1 характерно образование нескольких протеолитических ферментов с различной специфичностью при различных условиях культивирования при различных температурах и pH среды.

Дальнейшее культивирование гриба проводили при pH среды 6.5 и температуре 28°C. Изучение динамики образования протеолитических ферментов культурой *A. flavus* O-1 показало, что фибринолитическая активность имела один максимум, соответствующий экспоненциальной фазе

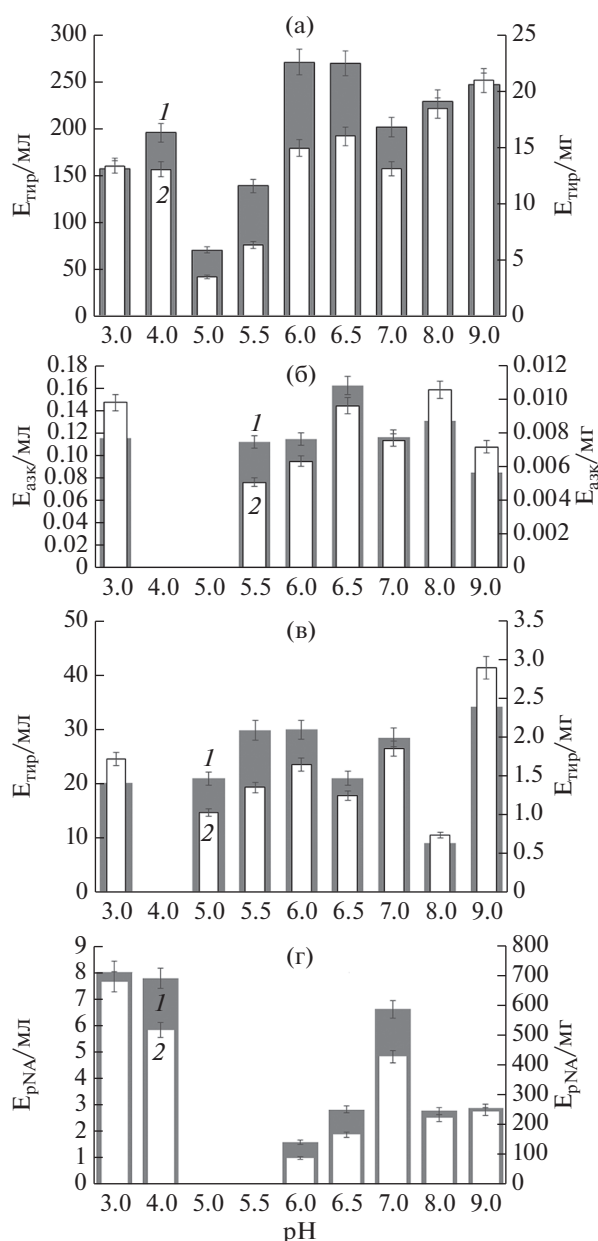


Рис. 1. Влияние pH среды культивирования на активность протеолитических ферментов *A. flavus* O-1: а – общая протеолитическая активность (1) и продуктивность (2), б – коллагенолитическая активность (1), продуктивность (2), в – фибринолитическая активность (1), продуктивность (2), г – эластолитическая активность (1), продуктивность (2).

роста, приходящейся на 1 сут роста, а казеинолитическая – несколько. Первый пик протеолитической (казеинолитической) активности приходился на 2 сут и соответствовал фазе замедления роста. Второй пик приходился на 4 сут и соответствовал фазе отмирания (рис. 3а).

Для коллагенолитической и эластолитической активности выявлено несколько максимумов об-

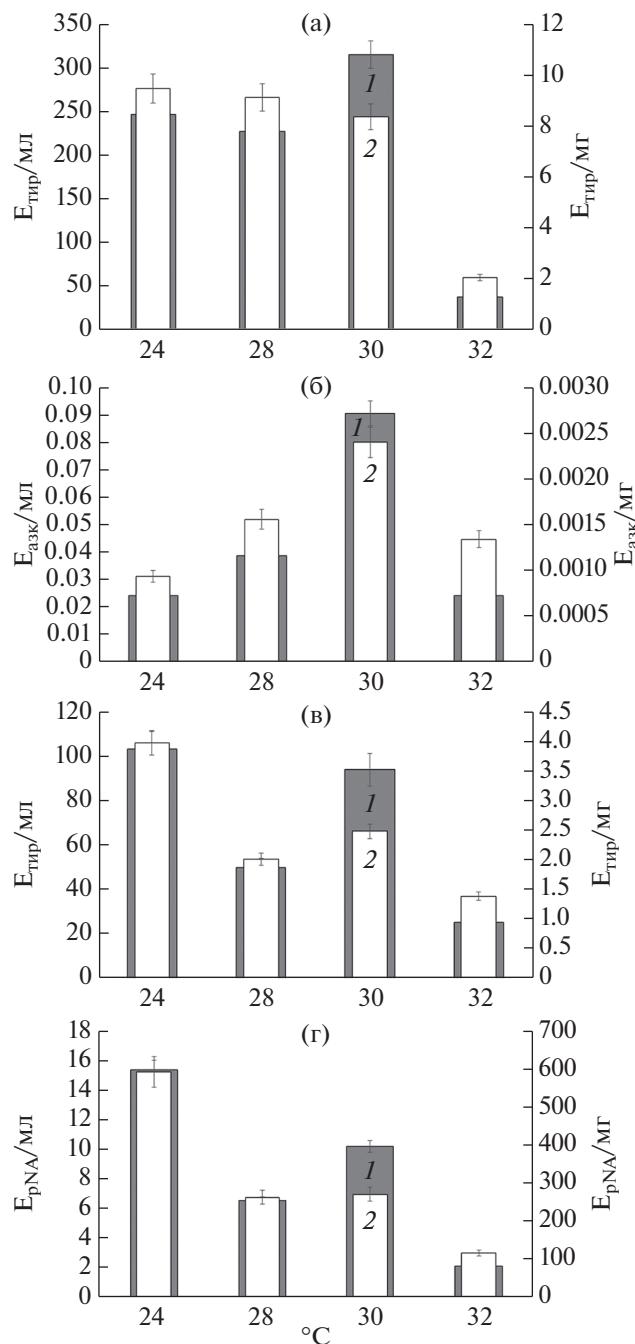


Рис. 2. Влияние температуры на активность протеолитических ферментов *A. flavus* O-1: а – общая протеолитическая активность, б – коллагенолитическая активность, в – фибринолитическая активность, г – эластолитическая активность. 1 – общая активность; 2 – продуктивность.

разования – на 1 и 4 сут для первой и на 1 и 3 для второй соответственно. Первые максимумы активности соответствовали экспоненциальной фазе роста культуры, тогда как вторые – фазе отмирания (рис. 3б). Так как максимумы изученных активностей приходились на одни и те же сутки культиви-

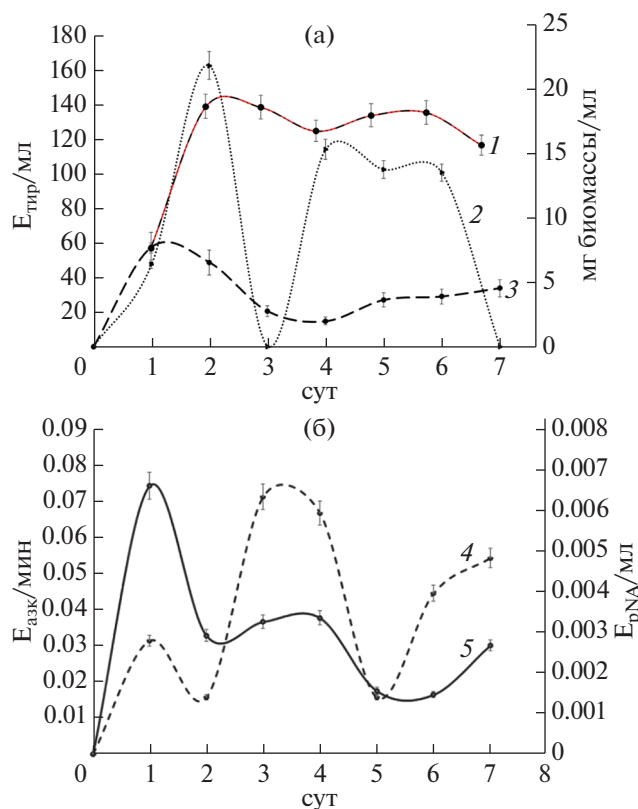


Рис. 3. Динамика роста культуры *A. flavus* O-1 (б) и образования внеклеточных протеиназ (а): 1 – биомасса, 2 – общая протеолитическая активность, 3 – фибринолитическая активность, 4 – эластазная активность, 5 – коллагенолитическая активность.

рования, то, можно предположить, что микромицет секретировал фермент, обладающий обоими типами активности.

Для всех изученных видов активности наблюдался волнообразный характер образования ферментов, что часто встречается у микромицетов, и вероятнее всего связано с особенностями транспорта внеклеточных ферментов из клеток.

Таким образом, по результатам изучения динамики накопления протеиназ, можно предположить, что *A. flavus* O-1 секретировал два фермента. Один фермент обладал фибринолитической, коллагенолитической и эластолитической активностью с максимумом активности на 1 сут, второй – с общей протеолитической активностью и максимумом на 2 сут.

На следующем этапе был получен лиофилизированный комплексный препарат протеиназ *A. flavus* O-1, который исследовали на протеолитическую активность по отношению к фибриллярным белкам. Анализ проводили с использованием азоколлагена, НРА (High Power Azur), азоказеина, фибриновых пластин и пластин со смесью белков (коллаген, фибрин, эластин) (табл. 1 и 2).

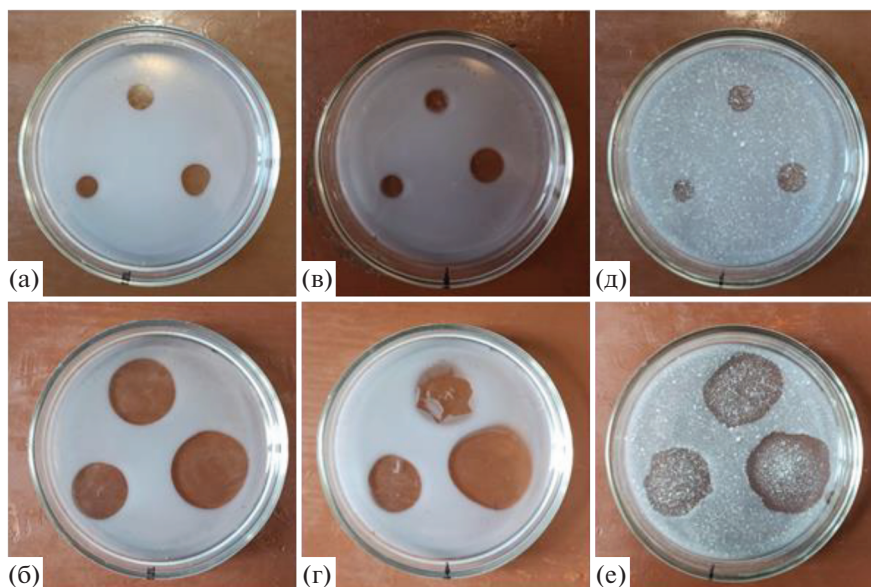


Рис. 4. Протеолитическая активность комплексного препарата протеиназ *A. flavus* O-1 по отношению к фибриллярным белкам: а, б – фибриновая пластина с примесью плазминогена (фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность); в, г – фибриновая пластина (фибринолитическая активность); д, е – модифицированная фибриновая пластина примесью коллагена и эластина, а, в, д – 3 ч, б, г, е – 24 ч инкубации.

Протеазы комплексного препарата микромицета *A. flavus* O-1 в концентрации 5 мг/мл показали невысокую протеолитическую активность с НРА и высокую казеинолитическую активность (табл. 1).

Выраженная фибринолитическая, а также сопутствующие ей коллагенолитическая и эластолитическая активности исследуемых протеиназ

показаны на рис. 4, видны четкие зоны лизиса фибриновых пластин и модифицированных пластин со смесью фибриллярных белков. Активаторная к плазминогену активность протеиназ наблюдалась на непрогретых фибриновых пластинах. Кроме того, наблюдали четкую зависимость активности протеиназы от ее концентрации. Как

Таблица 1. Протеолитическая активность комплексного препарата протеиназ *A. flavus* O-1

Субстрат	Единицы измерения	Активность комплексного препарата	Активность выделенной после ИЭФ протеиназы
Азоколлаген	$E_{азк}/мг$	0.199	2.48
Азоказеин	Усл. ед./ мг	7.68	69.05
НРА	Усл.ед./мг	0.1	1.61
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	$E_{pNA}/мг$	2.099	9.48

Таблица 2. Действие комплексного препарата протеиназ *A. flavus* O-1 на фибриновые пластины разного состава

Вариант фибриновой пластины	Время инкубации, ч	Активность препарата, усл. ед./мл		
		2 мг/мл	1 мг/мл	0.5 мг/мл
Фибрин с добавлением плазминогена	3	519.48	417.9	284.7
Фибрин		748.41	417.9	367.13
Фибрин с добавлением коллагена и эластина		479.5	384.6	333
Фибрин с добавлением плазминогена	24	3625.5	2800.5	1998
Фибрин		4375.6	2251.08	1995.5
Фибрин с добавлением коллагена и эластина		4495.5	3476.5	2562.4

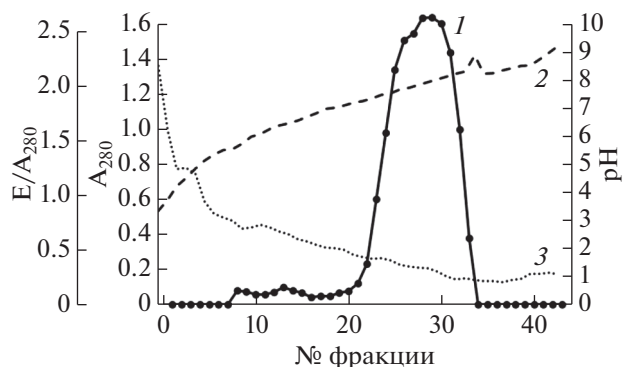


Рис. 5. Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. flavus* O-1. 1 – протеолитическая активность, 2 – pH, 3 – белок.

видно из рис. 4, площадь зоны лизиса через 3 ч инкубации возрастала с увеличением концентрации раствора фермента, нанесенного на фибриновые пластины (рис. 4а, 4в, 4д). Эта зависимость сохранялась и через 24 ч инкубации (рис. 4б, 4г, 4е). В табл. 2 представлены значения протеиназы препарата, рассчитанные из величины площадей зон лизиса фибриновых пластин. Наличие на модифицированных пластинах со смесью фибриллярных белков вкраплений в зоне лизиса указывало на неполное расщепление протеазами коллагена и эластина в условиях эксперимента.

Для дальнейшего исследования состава комплексного препарата белков микромицета *A. flavus* O-1 и их разделения использовали метод изоэлектрофокусирования, который показал присутствие основного активного белка с протеолитической активностью с pI 7.82 (рис. 5).

В результате проведения электрофореза в ПААГ с ДСН была установлена молекулярная масса фермента около 17 кДа (рис. 6).

Изучение активности выделенной протеиназы по отношению к различным белковым субстратам – азоказеину, азоколлагену и НРА показало,

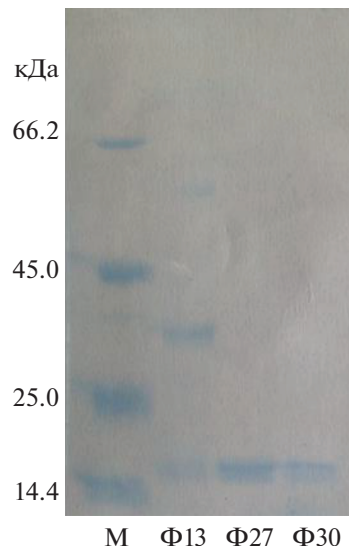


Рис. 6. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН активных фракций после изоэлектрофокусирования. М – метчики, фракции: Ф13 (№ 13), Ф 27 (№ 27) и Ф 30 (№ 30). (В скобках номера фракций, полученных при изоэлектрофокусировании).

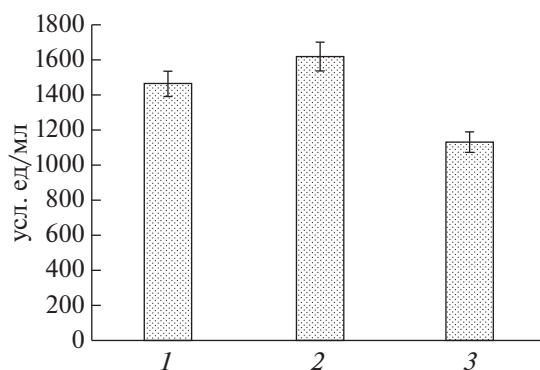


Рис. 7. Протеолитическая активность протеиназы *A. flavus* O-1 по отношению к фибриллярным белкам. 1 – фибрин с примесью плазминогена; 2 – фибрин; 3 – фибрин с примесями коллагена и эластина.

Таблица 3. Амидолитическая активность протеиназы *A. flavus* O-1

Хромогенный пептидный субстрат	Расщепляющий фермент	$E_{pNA}/мл$
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	Эластаза	10.44
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	Субтилизин	0
H-DVal-Leu-Lys-pNA	Плазмин	37.18
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	Тромбин	48.14
dIle-Pro-Arg-pNA	Тканевой активатор плазминогена	0
pGlu-Gly-Arg-pNA	Урокиназа	0
z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	Фактор Ха	0
Pyr-Glu-Arg-pNA	Протеин С	0
Ac-Phe-pNA	Химотрипсин	0

что протеиназа обладала выраженной казеинолитической активностью, а также гидролизовала субстраты азоколлаген и НРА (табл. 1). Изучение субстратной специфичности фермента с различными хромогенными пептидными субстратами позволило выявить активность эластазы, а также высокие плазминоподобную и тромбиноподобную активности (табл. 3). Наличие плазминоподобной активности могло свидетельствовать о способности фермента к лизису фибрина. Активность по отношению к остальным протестированным субстратам не была выявлена.

Методом фибриновых пластин было показано, что протеиназа обладала способностью к расщеплению фибрина и комплексного субстрата из фибриллярных белков, состоящего из фибрина, коллагена и эластина (рис. 7).

Для определения типа катализа протеиназы был проведен ингибиторный анализ, с использованием ингибиторов на различные классы протеиназ (табл. 4). В реакции с PMSF, ингибитором сериновых протеиназ, при соотношении фермент : ингибитор, равном 1 : 100, наблюдалось почти полное ингибирование активности фермента. Принадлежность изучаемой протеиназы к классу сериновых протеиназ подтверждалось также реакцией с TPSK – ингибитором химотрипсина протеиназ, при которой происходило ингибирование активности почти в два раза (табл. 4). Кроме того, наблюдалось слабое ингибирование фермента ЭДТА – ингибитором металлопротеиназ.

Поскольку после синтеза в клетке фермент может подвергаться посттрансляционной модификации, например, в том числе присоединяя углеводные фрагменты, было проведено определение их присутствия в составе выделенной протеиназы *A. flavus* O-1. Результаты показали отсутствие углеводных фрагментов в составе протеиназы, то есть фермент не гликозилирован (рис. 8).

Ранее из различных штаммов *A. flavus* были выделены различные протеиназы, обладающие эластинолитической активностью. Так, была выделена протеиназа с молекулярной массой 23 кДа и изоэлектрической точкой 7.6 с оптимумом активности при pH 8.0 и 50°C [10]. Штамм *A. flavus* NRRL 18543 секретировал эластазу с молекулярной массой 35 кДа, которая впоследствии подвергалась автолизу в культуре до более стабильной формы с молекулярной массой 23 кДа. Очищенная протеиназа с массой 23 кДа, по-видимому, была членом семейства металлопротеаз из-за сильного ингибирования хелатирующими агентами ЭДТА и 1,10-фенантролином. Показано, что эта эластаза термостабильна, устойчива к протеолизу и способна гидролизовать широкий спектр белковых субстратов, включая как гидрофобные белки (эластин, запасной белок семян хлопка, коллаген), так и растворимые белки (овальбумин,



Рис. 8. Дот-блоттинг гликопротеинов в молекулах протеиназы *A. flavus* O-1 (Ф30) с ШИК-реактивом, инвертаза (K+, положительный контроль) и БСА (K-, отрицательный контроль).

альбумин бычьей сыворотки) [11]. Поиск основного белка-аллергена *A. flavus* показал, что таковым является сериновая протеиназа с массой 34 кДа, которая имела значительное сходство с эластинолитической протеиназой *A. fumigatus* [13, 14].

Таким образом, по-видимому *A. flavus* способен образовывать несколько протеиназ с различными молекулярными массами.

Дальнейшие исследования показали, что щелочная протеиназа – один из широко распространенных белков экзопротеома *A. flavus*. Этот фермент принадлежит к семейству сериновых протеиназ с эластинолитической активностью [24]. Оказалось, что данная протеиназа существует в виде 24 различных протеоформ с разной pI и молекулярной массой. На основе спектральных подсчетов было показано, что среди идентифицированных экзоферментов наиболее распространенным бел-

Таблица 4. Ингибиторный анализ протеиназы *A. flavus* O-1

Ингибитор	Соотношение фермент : ингибитор	Остаточная активность, %
Контроль (без ингибитора)	–	100.0
ЭДТА	1 : 10	69.8
	1 : 100	86.6
n-ХМБ	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
TLSK	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
TPSK	1 : 10	55.7
	1 : 100	60.7
Соевый ингибитор трипсина	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
PMSF	1 : 10	48.7
	1 : 100	2.6

ком является внеклеточная металлопротеиназа, а на втором месте – щелочная протеиназа [9].

В работе было показано, что штамм *A. flavus* O-1 секретирует комплекс по меньшей мере из двух протеолитических ферментов. Препаративным изоэлектрофокусированием был выделен наиболее активный фермент. Им оказалась негликозилированная сериновая протеиназа с молекулярной массой 17 кДа и pI 7.82. Протеиназа обладала широкой субстратной специфичностью и была способна расщеплять такие фибриллярные белки, как коллаген, эластин и фибрин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. № 1. P. 15–32.
2. Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 8. С. 1059–1089.
3. Rosenberg L., Krieger Y., Silberstein E., Arnon O., Sinenikov I.A., Bogdanov-Berezovsky A., Singer A. // J. Burns. 2012. V. 38. № 7. P. 1035–1040.
4. Montoya C.A., Rutherford S.M., Olson T.D., Purba A.S., Drummond L.N., Boland M.J., Moughan P.J. // Br. J. Nutr. 2014. V. 111. № 6. P. 957–967
5. Kumar C.G., Takagi H. // Biotechnol. Adv. 1999. V. 17. № 7. P. 561–594.
6. Hedayati M.T., Pasqualotto A.C., Warn P.A., Bowyer P., Denning D.W. // Microbiology. 2007. V. 153. № 6. P. 1677–1692.
7. Okumura Y., Ogawa K., Nikai T. // J. Med. Microbiol. 2004. V. 53. № 5. P. 351–354.
8. Клечковская В.В., Егоров Н.С. // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 396–403.
9. Selvam R.M., Nithya R., Devi P.N., Shree R.S., Nila M.V., Demonte N.L., Thangavel C., Maheshwari J.J., Lalitha P., Prajna N.V., Dharmalingam K. // J. Proteomics. 2015. V. 115. P. 23–35.
10. Rhodes J.C., Amlung T.W., Miller M.S. // Infect. Immun. 1990. V. 58. № 8. P. 2529–2534.
11. Mellon J.E., Cotty P.J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 46. P. 138–142.
12. Ramesh M.V., Sirakova T., Kolattukudy P.E. // Infect Immun. 1994. V. 62. № 1. P. 79–85.
13. Yu C.J., Chiou S.H., Lai W.Y., Chiang B.L., Chow L.P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 261. № 3. P. 669–675.
14. Chou H., Lin W.L., Tam M.F., Wang S.R., Han S.H., Shen H.D. Int. Arch. Allerg. Immunol. 1999. V. 119. № 4. P. 282–290.
15. Сухосырова Е.А., Никитина З.К., Яковлева М.Б., Вещицкова Е.В., Быков В.А. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2003. Т. 35. № 5. С. 526–530.
16. Gertler A., Trop M. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 19. № 1. P. 90–96.
17. Vesterberg O. // Biochem. Biophys. Acta. 1972. V. 1. P. 11–19.
18. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
19. Крейер В.Г., Руденская Г.Н., Ландау Н.С., Покровская С.С., Степанов В.М., Егоров Н.С. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 8. С. 1365–1373.
20. Anson M.L. // Science. 1935. V. 81. P. 467–470.
21. Осмоловский А.А., Попова Е.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2016. № 1. С. 71–75.
22. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
23. Шаркова Т.С., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 316–322.
24. Chen Z.-Y., Brown R.L., Cary J.W., Damann K.E., Cleveland T.E. // Toxin Rev. 2009. V. 28. P. 187–197.

Formation And Properties of Extracellular Proteinase of Micromycete *Aspergillus flavus* O-1, Active Toward Fibrillary Proteins

A. A. Galiakberova^a, D. M. Bednenko^a, V. G. Kreyer^a, A. A. Osmolovskiy^{a,*}, and N. S. Egorov^b

^aBiological Faculty, Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, 119234 Russia

^bInternational Biotechnology Center, Moscow State University. M.V. Lomonosov, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

It has been shown that *Aspergillus flavus* O-1 micromycete secretes a complex of at least two proteolytic enzymes. By preparative isoelectric focusing, the most active enzyme was isolated, which turned out to be a non-glycosylated serine proteinase with a molecular weight of 17 kDa and a pI of 7.82. Proteinase had a broad substrate specificity and was able to degrade fibrillar proteins such as collagen, elastin, and fibrin.

Keywords: *Aspergillus flavus*, proteinases, serine proteinases, proteolytic activity