

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. ЛОМОНОСОВА

Шамрайчук Ирина Леонидовна

**ВНЕКЛЕТОЧНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДАЗ САПРОТРОФНЫХ И
ФИТОПАТОГЕННЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ**

1.5.18 – Микология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук
Дунаевский Яков Ефимович

кандидат биологических наук
Белякова Галина Алексеевна

Москва – 2022

Содержание

Введение	4
1. Обзор литературы	9
1.1 Факторы и стратегии, используемые грибами для колонизации растительных тканей	9
1.2. Протеолитические ферменты	14
1.2.1. Общая характеристика протеолитических ферментов	14
1.2.2. Классификация пептидаз	15
1.2.2.1. Классификация пептидаз по катализируемой реакции	16
1.2.2.1.1. Экзопептидазы микроорганизмов	16
1.2.2.1.2. Эндопептидазы микроорганизмов	17
1.2.2.2. Классификация пептидаз по химической природе каталитического сайта	17
1.2.2.2.1. Сериновые пептидазы	18
1.2.2.2.2. Цистеиновые пептидазы	20
1.2.2.2.3. Аспаргатные пептидазы	21
1.2.2.2.4. Металлопептидазы	22
1.2.2.2.5. Глутаминовые пептидазы	23
1.2.2.2.6. Треониновые пептидазы	24
1.2.2.3. Классификация пептидаз по эволюционному родству	24
1.2.3. Микроорганизмы как продуценты протеолитических ферментов	25
1.2.4. Грибные пептидазы	25
1.2.5. Значение пептидаз	26
1.2.5.1. Физиологическая роль пептидаз	27
1.2.5.2. Функции пептидаз у микромицетов	27
1.2.6. Практическое применение пептидаз	29
1.2.7. Разнообразие и особенности внеклеточных пептидаз у микромицетов	30
1.2.8. Секреция пептидаз микромицетами	31
1.2.9. Секреция вторичных метаболитов и пептидазы микромицетов	32
1.2.10. Внеклеточные пептидазы различных родов мицелиальных микромицетов	35
1.2.10.1. Внеклеточные пептидазы видов рода <i>Alternaria</i>	35
1.2.10.2. Внеклеточные пептидазы <i>Botrytis cinerea</i>	36
1.2.10.3. Внеклеточные пептидазы видов рода <i>Fusarium</i>	37
1.2.10.4. Внеклеточные пептидазы видов рода <i>Trichoderma</i>	39
1.3. Ингибиторы пептидаз	40
1.3.1. Грибные ингибиторы пептидаз	42

2. Материалы и методы	45
2.1. Штаммы микромицетов и условия их хранения	45
2.2. Получение жидких культур микромицетов	49
2.3. Получение клеточных стенок растения <i>Vigna radiata</i>	50
2.4. Определение протеолитической активности	50
2.5. Ингибиторный анализ	51
2.6. Гель-фильтрация пептидаз	52
2.7. Ионообменная хроматография пептидаз	52
2.8. Влияние пониженных концентраций кислорода на протеолитическую активность	53
2.9. Определение внеклеточных меланинов	53
2.10. Определение ингибиторной активности	53
3. Результаты и их обсуждение	55
3.1. Сравнение общей внеклеточной протеолитической активности и вклада в нее различных групп секретируемых пептидаз у разных штаммов мицелиальных грибов	55
3.2. Спектр специфической протеолитической активности культур микромицетов	61
3.3. Влияние некоторых факторов внешней среды на секрецию грибных пептидаз	68
3.3.1. Развитие мицелиальных грибов и секреция ими пептидаз в анаэробных условиях и условиях пониженной концентрации кислорода воздуха	68
3.3.2. Изменения рН среды культивирования в процессе роста штаммов грибов в жидкой среде и их влияние на активность секретируемых пептидаз	71
3.3.3. Влияние различных источников азота на активность внеклеточных пептидаз некоторых штаммов мицелиальных грибов	74
3.4. Особенности внеклеточных пептидаз различных представителей микромицетов	77
3.4.1. Внеклеточные пептидазы видов рода <i>Alternaria</i>	77
3.4.2. Внеклеточные пептидазы <i>Botrytis cinerea</i>	80
3.4.3. Внеклеточные пептидазы видов рода <i>Fusarium</i>	88
3.4.4. Внеклеточные пептидазы представителей рода <i>Trichoderma</i>	98
4. Заключение	103
5. Выводы	106
6. Благодарности	107
7. Список литературы	108

Введение

Актуальность и степень разработанности темы

Открытие в начале XX в. активности ферментов в бесклеточных экстрактах положило начало изучению их свойств и структур, а также разработке методов применения ферментных препаратов в промышленности, аналитических процессах и медицине (Бут и др., 2005). Для получения ферментов используются и микроорганизмы, способные выделять их в окружающую среду для разложения сложных органических субстратов (белковой, липидной и углеводной природы), которые иначе не могут быть использованы как источник питательных веществ.

Среди гидролитических ферментов, секретируемых микроорганизмами, значительную роль играют пептидазы. Микроорганизмы вырабатывают широкий спектр протеолитических ферментов (эндо- и экзопептидаз), внутриклеточных и внеклеточных. Внутриклеточные пептидазы ответственны за такие метаболические процессы клеток микроорганизмов, как спорообразование и дифференциация, регуляция белкового синтеза, поддержание белкового пула в клетках и другие (Gupta et al., 2002). Одна из главных ролей внеклеточных пептидаз заключается в гидролизе белков во внешней среде, который позволяет микроорганизмам абсорбировать и использовать гидролизованные субстраты роста.

Таким образом, функции пептидаз многообразны; их действие проявляется на нескольких уровнях организации, от клеточного до органного и организменного уровней, включающих каскадные системы гемостаза и воспалительного процесса (Rao et al., 1998). Эти ферменты участвуют в сложных процессах, протекающих как при нормальном физиологическом состоянии клетки, так и при патофизиологическом. Установление роли протеолитических ферментов в жизнедеятельности патогенных микроорганизмов позволило рассматривать их в качестве потенциальной мишени при разработке терапевтических агентов для лечения некоторых инфекционных заболеваний, а также при борьбе с фитопатогенами.

Паразитизм – форма взаимоотношений, при которой один организм извлекает пользу при использовании другого (Divon, Fluhr, 2006). Патогены растений могут быть разделены на группу организмов, убивающих своего хозяина и питающихся его мертвыми тканями (некротрофы), и группу, для которой необходим живой организм растения для завершения жизненного цикла (биотрофы) (Dangl, Jones, 2001). Микробная некротрофия часто сопровождается образованием токсинов. Хемибиотрофные грибы сочетают две фазы при инфекционном процессе; первая фаза – биотрофная, затем следует некротрофная стадия (Lo Presti et al., 2015). Эти различные

патогенные стили жизни требуют различные молекулярные инструменты атаки.

В настоящее время во многих исследованиях сделан акцент на выявлении механизмов патогенеза, в частности, фитопатогенеза, и обнаружении факторов вирулентности. Показано, что токсины, ферменты деградации клеточных стенок и некоторые другие соединения связаны со способностью патогена поражать растение-хозяина. Менее изученным остается аспект взаимодействия, ассоциированный с адаптацией паразита к меняющимся нутритивным условиям, так как особенностью факультативных патогенов является их способность существовать в паразитической и сапрофитной фазах.

Перспективным объектом для изучения и источником внеклеточных гидролаз являются грибы. Грибы способны менять свой образ жизни, чтобы адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды. Их экологическая стратегия связана с секретомом, так как грибы получают питательные вещества извне благодаря секреции гидролитических ферментов в окружающую среду, что приводит к поступлению в мицелий расщепленных молекул субстрата.

Для успешного фитопаразитизма микроскопических грибов ключевым этапом является их проникновение в растительные ткани. Специфическая секреция ферментов наряду с образованием инфекционных структур и токсинов обеспечивают нормальный процесс проникновения, дающий возможность микромицетам преодолевать различные барьеры, присущие тканям листьев, стеблей или корней.

Грибы-фитопатогены образуют широкий спектр ферментов, способных гидролизовать компоненты клеточных стенок растений. Среди таких гидролитических ферментов – глюкоказы, ксиланазы, маннаназы, рамногалактуронан-гидролазы, пектин-лиазы, арабинофуранозидазы, галактозидазы и другие (Chandrasekaran, Sathiyabama, 2014). Степень вирулентности фитопатогенов может зависеть от спектра и интенсивности образования таких ферментов, а также факторов, регулирующих развитие инфекции (Kikot et al., 2009). Однако роль ферментов деградации клеточных стенок в процессе инвазии многих фитопатогенов остается невыясненной, что определяет актуальность поиска детерминант патогенности у грибов.

Патогенные, так же как и сапротрофные грибы секретируют пептидазы, способные расщеплять многие (поли)пептиды в окружающей их среде. Такое расщепление важно для элиминации активности антифунгальных белков растений и для обеспечения грибов питательными соединениями (Amselem et al., 2011).

Внеклеточные пептидазы занимают особое место среди гидролитических ферментов микробного происхождения ввиду множества выполняемых ими функций, а также возможности их использования в различных отраслях промышленности (Gupta et al., 2002). Предполагается, что в некоторых взаимодействиях грибов-растения эти ферменты могут функционировать как факторы патогенности. Секреция высокоактивных трипсин-подобных пептидаз у микроскопических грибов может служить маркером их фитопатогенности (Dunaevskii et al., 2006; Dubovenko et al., 2010).

Цель и задачи исследования

Цель работы состояла в комплексном сравнительном изучении активности внеклеточных пептидаз различных видов и штаммов микроскопических грибов, принадлежащих к определенным трофическим группам, ее участия в патогенном процессе, а также влияния на нее факторов внешней среды. Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Сравнить общую внеклеточную протеолитическую активность и спектры секретируемых пептидаз у представителей различных эколого-трофических групп мицелиальных микромицетов.
2. Оценить влияние некоторых факторов (возраста культуры, pH среды культивирования, концентрации кислорода, типа источника азота) на протеолитическую активность у мицелиальных микромицетов.
3. Выявить пептидазы, специфичные для фитопатогенов.
4. Оценить связь особенностей секреции пептидаз с некоторыми биологическими свойствами исследованных микромицетов.

Объект и предмет исследования

Объект исследования – сапротрофные и фитопатогенные мицелиальные микромицеты. **Предмет исследования** – их внеклеточная протеолитическая активность.

Научная новизна

В работе проведено комплексное изучение внеклеточных протеолитических ферментов мицелиальных микромицетов с учетом биологических свойств исследованных штаммов. Определены спектр и внеклеточная активность пептидаз у 26 штаммов некоторых видов микромицетов, в том числе фитопатогенных, при их росте на среде с белковым индуктором. Среди них выявлены перспективные продуценты с наибольшей активностью.

Для 2-х фитопатогенных видов – *Botrytis cinerea* Pers. и *Fusarium roseum* Link – впервые исследована зависимость секретируемой

протеолитической активности от присутствия в среде растительных клеточных стенок.

Экспериментально доказана последовательная динамика появления в среде внеклеточной протеолитической активности, проявляемой различными группами пептидаз *B. cinerea*.

Впервые показана положительная корреляция между уровнями образования меланина и внеклеточной активностью пептидаз у агрессивных штаммов фитопатогенного вида *Alternaria linariae* (Neerg.) E.G.Simmons. Выявлено, что для данных штаммов также характерна и высокая активность трипсин-подобных ферментов, возможных маркеров фитопатогенного процесса.

Показано присутствие у мицелиальных грибов секретируемых ингибиторов пептидаз, не связанных с регуляцией активности собственных протеолитических ферментов, а выполняющих, по-видимому, защитную функцию.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены данные, позволяющие предполагать участие трипсин-подобных пептидаз в процессе фитопатогенеза у грибов, что важно учитывать при создании устойчивых к грибным заболеваниям сортов растений. Оценено значение величин рН, создаваемых микромицетами, фаз роста, кислород-дефицитных условий, а также источника азота в среде для синтеза и активности определенных групп пептидаз. Полученные данные свидетельствуют о том, что эти факторы играют немаловажную роль при протеолизе белковых субстратов, проводимом микромицетами в занимаемых ими экологических нишах. Установлена видоспецифичность элементов протеолитической системы грибов.

Результаты работы вносят вклад в изучение взаимодействия патоген-растение и могут быть полезны как для биотехнологического получения различных целевых пептидаз, а также ингибиторов пептидаз, так и при чтении курсов лекций, связанных с биохимией грибов.

Методология исследования

В работе использованы методы микологических исследований (культивирование, поддержание чистых культур грибов), биохимические методы (определение общей и класс-специфической протеолитической активности, ингибиторный анализ, гель-фильтрация и ионообменная хроматография пептидаз), физико-химические методы (определение принадлежности пигментов к группе меланинов), анализ литературных данных.

Положения, выносимые на защиту

- 1.** Фитопатогенным микромицетам свойственна значительная активность трипсин-подобных пептидаз.
- 2.** Индукторами образования пептидаз могут быть как отдельные белки, так и растительные клеточные стенки, содержащие белок в своем составе.
- 3.** Прослежена связь между агрессивностью некоторых фитопатогенных грибов и образованием пептидаз и меланинов у *A. linariae*.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется профессионализмом автора, точностью воспроизведения экспериментов и точностью использованных приборов. Результаты исследований представлены на XXI и XXIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014, 2016), Международной конференции по биохимии и молекулярной биологии (Вена, 2014), Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 55-летию Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах и 5 тезисов докладов. В 8 работах (включая 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus, RSCI) вклад автора является определяющим. Автор принимал активное участие в постановке научных задач и их решений, анализе полученных результатов и предоставлении их в печати.

1. Обзор литературы

1.1. Факторы и стратегии, используемые грибами для колонизации растительных тканей

Одна из наиболее интересных черт грибов – их разнообразие (Phalip et al., 2006). Грибы различаются по морфологии, жизненным циклам и метаболической активности.

Патогенные грибы характеризуются широким спектром хозяев, включающим растения. Более 10000 заболеваний растений вызваны грибами, что обуславливает повышенный интерес к этой группе микроорганизмов.

В процессе проникновения и последующей пролиферации в тканях растений фитопатогенным грибам необходимо разрушить различные слои защитных барьеров растений.

Значительная часть исследований, посвященных молекулярным механизмам вирулентности грибов, отведена щавелевой кислоте, которая выполняет различные роли в течение нескольких стадий инфекции (Seifbarghi et al., 2017). Так, секреция щавелевой кислоты как неспецифического токсина (Maxwell, Lumsden, 1970; Marciano et al., 1983; Godoy et al., 1990) наряду с многочисленными внеклеточными ферментами, особенно полигалактуроназой (Bateman, Beer, 1965; Lumsden, 1976; Marciano et al., 1982), считаются ключевыми факторами патогенеза у некротрофного фитопатогена *Sclerotinia sclerotiorum*.

Кислые условия, создаваемые в результате накопления щавелевой кислоты, – решающий этап в некротрофной фазе некоторых грибов-некротрофов. Считается, что щавелевая кислота – важный фактор патогенности у этих грибов, способствующий расщеплению растительной клеточной стенки путем разрушения кальций-пектатных комплексов (Heller, Witt-Geiges, 2013). Кристаллы оксалата кальция вокруг субкутикулярных гиф были обнаружены Heller и Witt-Geiges в прогрессирующей (после 36 – 48 ч) и поздней (после 72 ч) стадиях инфекции, но не на ранних ее этапах.

Выявлено, что при инфекции рапса *Brassica napus*, вызванной *S. sclerotiorum*, у гриба экспрессируются гены, кодирующие различные гидролитические ферменты, ферменты, вовлеченные в биосинтез вторичных метаболитов, белки, ассоциированные с детоксификационными системами, и эффекторные белки (Seifbarghi et al., 2017).

Так, продукты нескольких генов, кодирующих ферменты, вовлеченные в биосинтез вторичных метаболитов, были идентифицированы у *S. sclerotiorum* как факторы патогенности. Они включали ключевые ферменты, ассоциированные с путями образования токсических компонентов, такие как поликетид-синтаза, нерибосомальная пептид-синтаза, гибридная поликетид-

синтаза/нерибосомальная пептид-синтаза и халкон-синтаза. Грибные токсины воздействуют на клеточные функции организма-хозяина, подавляя защитную систему растения и/или усиливая развитие симптомов болезни. Среди различных типов фитотоксических метаболитов, образуемых грибом *B. cinerea*, наиболее интенсивно изучен ботридиаль (Colmenares et al., 2002). Однако его роль в инфекции пока только предполагается.

Показано, что в течение инфекции *B. napus*, вызванной *S. sclerotiorum*, у гриба экспрессируются гены биосинтеза меланина (*PKS13*), копрогена (*NRPS6*) и внутриклеточных сидерофоров (*NRPS2*, *NRPS3*) (Seifbarghi et al., 2017). Сидерофоры являются важными факторами вирулентности у многих патогенов, включая фитопатогенные грибы.

Помимо ключевых ферментов, вовлеченных в биосинтез вторичных метаболитов, важная роль в процессе патогенеза отведена транспортерам, необходимым для секреции вторичных метаболитов (Seifbarghi et al., 2017).

Многие факторы вирулентности определены у различных групп грибов-патогенов, однако продукты генов, участвующие в выборе организма-хозяина и адаптации к нему, до сих пор практически не установлены. По данным Shang с коллегами (Shang et al., 2016), геномы грибов-фитопатогенов кодируют больше белков и белковых семейств, чем геномы грибов-патогенов насекомых и человека. При этом больше групп общих ортологичных белков у энтомо- и фитопатогенов по сравнению с патогенами животных. Найдено, что патогенность грибов, адаптированных к определенному организму-хозяину, развивалась в ходе эволюции несколько раз.

Грибы, расщепляющие сложные растительные полимеры, секретируют различные ферменты, гидролизующие компоненты клеточных стенок. Сложность строения клеточной стенки и обуславливает разнообразие ферментов, действующих на нее, у микроскопических грибов.

Так как в настоящей работе значительное внимание будет уделено фитопатогенным грибам, представляется важным рассмотреть структуру клеточной стенки растений как мишени их гидролитической активности в природных условиях.

Клеточная стенка представляет собой один из главных барьеров, защищающих растения от патогенов, и содержит преимущественно целлюлозу, компоненты матрикса и воду (Kikot et al., 2009). Группы из 100 – 10000 молекул целлюлозы, связанных водородными связями, образуют микрофибриллы. Компоненты матрикса включают пектиновые вещества, гемицеллюлозу и структурные белки. Этот аморфный материал распределен между целлюлозными микрофибриллами. Главным структурным белком является экстенсин, способный ковалентно связываться с другими белками.

Вода заполняет около 50 % пространства в типичной первичной клеточной стенке.

Таким образом, растительная клеточная стенка представляет собой гетерогенную и динамичную структуру, состоящую из полисахаридов, белков и ароматических полимеров и меняющуюся в течение роста и старения растения (King et al., 2011). Во вторичной клеточной стенке как у однодольных, так и двудольных растений количество ксиланов, пектинов и структурных белков уменьшается, тогда как ксиланов и лигнина возрастает.

Растительная клеточная стенка содержит различные классы структурных белков, расщепление которых патогенами может быть решающим для развития инфекции (Di Pietro et al., 2003). Внеклеточные пептидазы идентифицированы у ряда фитопатогенов, но их роль и способность к гидролизу белков клеточной стенки еще не до конца выяснены.

Многие грибы являются факультативными фитопатогенами. Одним из ключевых этапов патогенеза является проникновение фитопатогенных грибов в ткани организма-хозяина. Чтобы преодолеть защиту, грибы развили в ходе эволюции удивительно разнообразные стратегии инвазии. С помощью образуемых инфекционных структур фитопатогенные грибы проникают в различные типы клеточных стенок в листьях, стеблях или корнях растений. Морфогенетические процессы, ведущие к образованию инфекционных структур, часто зависят от специфических сигналов, идущих от поверхности растения, и являются предпосылками определенного способа инвазии. Такие физиологические изменения, как целевая секреция ферментов или увеличенное давление в инфекционной структуре, поддерживают процесс проникновения. По мнению некоторых авторов (Mendgen et al., 1996), инфекционные структуры произошли от непатогенных гиф, проникающих в субстрат.

Для многих патогенов характерно образование меланина. Его синтез ассоциирован с вирулентностью у ряда патогенных микроорганизмов, особенно клинически значимых (Nosanchuk, Casadevall, 2006). Однако, как показал анализ литературных данных, связь образования меланина и фитопатогенеза у грибов остается не до конца понятой.

Дискуссия относительно того, требуются ли ферменты и другие соединения, образуемые при росте в культуральной среде, для проникновения в клеточные стенки растений или они нужны только для сапротрофного роста грибов, не закончена. Однако ясно показано, что синтез ряда веществ сопряжен с появлением фитопатогенных свойств у

микровицетов. Так, необходимая роль меланина для проникновения поддержана наблюдением, что меланин-дефицитные мутанты не могут образовывать меланизированные аппрессории и не патогенны (Mendgen et al., 1996). Добавление же предшественников меланинового биосинтеза восстанавливает как включение меланина в аппрессории, так и патогенность мутантов.

По-видимому, проникновение микровицетов в растительные ткани – сложный этап фитопатогенеза, требующий комплексного участия инфекционных структур и различных химических соединений.

Большинство микроорганизмов (как патогенных, так и сапротрофных), ассоциированных с растениями и расщепляющих их клеточную стенку, обладают генетически закрепленной способностью к деградации главных структурных полисахаридов, составляющих растительную клеточную стенку, а именно целлюлозы, ксилана и пектина (King et al., 2011). В частности, патогены растений находятся в таких взаимодействиях со своим растением-хозяином, которые требуют проникновения в живую ткань растения через клеточную стенку с последующей колонизацией ткани. Многие патогенные грибы активно секретируют разнообразные гидролитические ферменты (таблица 1) и способны с их помощью расщеплять растительную ткань, используя высвободившиеся соединения для своего роста и репродукции. В свою очередь, растения образуют белки, которые ингибируют ферменты, действующие на клеточную стенку, как один из механизмов устойчивости к заболеванию, и это взаимодействие может способствовать эволюции по направлению к появлению уникальных ферментов у фитопатогенов (King et al., 2011).

Таблица 1. Гидролитические ферменты микромицетов

Род/вид	Спектр гидролитических ферментов	Ссылка
<i>Alternaria sp.</i>	Целлюлаза, щелочная фосфатаза, α - и β -глюкозидазы, α - и β -галактозидазы, β -глюкуронидаза, α -маннозидаза, эндо-1,4- β -глюканаза, эндополигалактуроназа, пектинметилэстераза, пептидазы, липаза	Martínez et al., 1988 Portnoy et al., 1993 Berto et al., 1997 Isshiki et al. 1997 Eshel et al., 2002 Anand et al., 2008 Ijaz et al., 2011 Chandrasekaran, Sathiyabama, 2014
<i>Alternaria alternata</i>	Целлюлаза, щелочная фосфатаза, α - и β -глюкозидазы, α - и β -галактозидазы, β -глюкуронидаза, α -маннозидаза, лейцинаминопептидаза, эндо-1,4- β -глюканаза, эндополигалактуроназа, пектинметилэстераза	Martínez et al., 1988 Portnoy et al., 1993 Isshiki et al. 1997 Eshel et al., 2002 Anand et al., 2008 Ijaz et al., 2011
<i>Alternaria kulundii</i>	Нет данных	Нет данных
<i>Alternaria tomatophila</i>	Нет данных	Нет данных
<i>Botrytis cinerea</i>	Эндополигалактуроназы, пектинметилэстеразы, целлюлазы, гемицеллюлазы, кутиназы ¹ , липазы, пептидазы ¹	van der Vlugt-Bergmans et al., 1997 van Kan, 2006
<i>Fusarium sp.</i>	Эндо- и экзополигалактуроназы, целлюлазы, эндо-1,4- β -глюканаза, β -глюкозидаза, амилаза, эндоксилаза, пектаглиаза, лактоногидролазы, фосфатазы, пептидазы, хитиназы, липаза, N-ацетил- β -глюкозаминидаза, карбоксиметилцеллюлаза, целлобиогидролаза, хитиназа	Takahashi et al., 1975 Wasfy et al., 1987 Mathivanan et al., 1998 Roncero et al., 2000 Honda et al., 2002 Jenczmionka, Schäfer, 2005 Kwon et al., 2007 Qin et al., 2010 Ismail et al., 2013
<i>Fusarium anguioides</i>	Ацилагматин-амидогидролаза, карбоксипептидаза, лактоногидролазы	Takahashi et al., 1975 Honda et al., 2002
<i>Fusarium fusarioides</i>	Фосфатаза, карбоксиметилцеллюлаза, целлобиогидролаза, β -глюкозидаза, ксиланаза, хитиназа	Mathivanan et al., 1998 Qin et al., 2010 Ismail et al., 2013
<i>Fusarium sambucinum</i>	β -Глюкозидаза, фосфатазы (щелочная и кислая), эстераза, липаза, лейцин ариламидаза, валин ариламидаза, N-ацетил- β -глюкозаминидаза	Wasfy et al., 1987 Kwon et al., 2007

<i>Trichoderma sp.</i>	Хитиназы, ксиланазы, β -ксилозидазы, целлюлазы, карбоксиметилцеллюлаза, α^2 - и β -1,3-глюканазы, ламинариназа, пептидазы, липазы, N-ацетил- β -глюкозаминидаза	Elad et al., 1982 Royer, Nakas, 1989 Kredics et al., 2004 Sandhya et al., 2004 Tondje et al., 2007
<i>Trichoderma asperellum</i>	Эндохитиназа ² , ламинариназа, карбоксиметилцеллюлаза, α^2 - и β^2 -1,3-глюканазы, аспартатные пептидазы ¹	Bara et al., 2003 Viterbo et al., 2004 Sanz et al., 2005 Tondje et al., 2007 Marcello et al., 2010

¹Предполагается роль в патогенезе

²Показано участие в патогенезе

Как видно из таблицы 1, найденные гидролазы грибов способны расщеплять главным образом углеводные компоненты клеточных стенок. Представленный список ферментов включает и некоторые пептидазы, среди которых имеются как специфические для инфекции ферменты, присущие практически только фитопатогенам, так и неспецифические, характерные и для патогенов, и для сапротрофов (Leger et al., 1997). Однако их роль изучена слабо, недостаточно сведений о влиянии условий окружающей среды на секрецию этих гидролитических ферментов в природе.

1.2. Протеолитические ферменты

1.2.1. Общая характеристика протеолитических ферментов

Протеолитические ферменты катализируют гидролитическое расщепление белковых молекул, приводящее к образованию пептидов и аминокислот (Sumantha et al., 2006). Пептидазы составляют крупную группу ферментов, различающихся по таким свойствам, как субстратная специфичность, строение каталитического центра и механизм катализа, оптимальные значения pH и температуры, стабильность.

В настоящее время интерес исследователей к протеолитическим ферментам во многом обусловлен отмеченной в значительном объеме литературных данных способностью протеаз контролировать множество биологических процессов. Среди них – регуляция локализации и активности белков; изменения белок-белковых взаимодействий; генерация, передача и усиление молекулярных сигналов и другие (Rao et al., 1998; López-Otin, Bond, 2008). Результатом активности пептидаз является их влияние на репликацию ДНК и транскрипцию, клеточную пролиферацию и дифференциацию, морфогенез тканей, ответные реакции на тепловой шок и нарушение сворачивания белков (UPR, unfolded protein responses), ангиогенез, нейрогенез, гемостаз, воспалительный процесс, некроз, апоптоз. Изменения

спектра протеолитических ферментов в организме лежат в основе множества патологических состояний, таких как рак, нейродегенеративные процессы, воспалительные и сердечно-сосудистые заболевания. Поэтому многие пептидазы рассматриваются как перспективные мишени для фармацевтических препаратов, а также как диагностические и прогностические биомаркеры. Для многих патогенных микроорганизмов пептидазы необходимы для репликации или служат факторами вирулентности (López-Otin, Bond, 2008).

Пептидазы существенно различаются по физико-химическим и каталитическим свойствам; среди них известны как ферменты, представленные небольшими простыми каталитическими единицами (около 20 кДа), так и крупные структуры, осуществляющие процессинг и расщепление белков (например, протеасома или изоформы металлопротеиназы меприна с молекулярной массой 0,7 – 6 МДа). Степень субстратной специфичности также значительно варьирует у различных пептидаз. Так, некоторые пептидазы (например, ангиотензин-превращающий фермент) высокоспецифичны по отношению к уникальной пептидной связи, однако большинство протеолитических ферментов обладают относительно широкой специфичностью (Bertenshaw et al., 2003).

Клетки располагают различными механизмами регуляции активности протеолитических ферментов (Scott, Taggart, 2010). Как и для многих других белков, регуляция активности пептидаз может происходить на транскрипционном уровне, однако известны и другие механизмы. Так, конститутивно вырабатываемые пептидазы часто образуются в виде неактивных предшественников, или зимогенов, которые активируются при расщеплении, приводящем к формированию действующих ферментов. К другим механизмам регуляции относятся и такие посттрансляционные модификации, как фосфорилирование, присоединение кофакторов, изоляция пептидаз и субстратов в везикулах или гранулах. Кроме того, регуляцию осуществляют и эндогенные ингибиторы пептидаз. Однако такой способ регуляции протеолиза более распространен у многоклеточных организмов; для прокариот же и одноклеточных эукариот он, как правило, менее характерен (Kantyka et al., 2010). Существование такого множества регуляторных механизмов указывает на ключевую роль протеаз в клетках, а также на абсолютную необходимость поддержания и контролирования их активности.

1.2.2. Классификация пептидаз

Пептидазы – ферменты, катализирующие распространенную химическую реакцию гидролиза пептидных связей (CO–NH) белков и

расщепляющие белки на пептиды или свободные аминокислоты (Monod et al., 2002; López-Otin, Bond, 2008). Термины протеаза, пептидаза, протеолитический фермент и пептид-гидролаза синонимичны.

Классификация протеолитических ферментов сложна вследствие многообразия их структур и механизмов действия. Пептидазы классифицируют по 3 главным критериям: (1) катализируемой реакции, (2) химической природе каталитического сайта, а также (3) эволюционному родству, определяемому по структуре белка (Barrett, 1994). Помимо данной системы классификации, пептидазы могут быть разделены на группы согласно значениям pH, при которых они наиболее активны: кислые (pH 2,0 – 6,0), нейтральные (pH 6,0 – 8,0) и щелочные (pH 8,0 – 13,0) (Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002; Sabotic, Kos, 2012).

1.2.2.1. Классификация пептидаз по катализируемой реакции

При классификации по катализируемой реакции пептидазы (пептид-гидролазы) относят к 3 классу (гидролазы) и 3.4 подклассу (Barrett, 1994). По этому критерию пептидазы подразделяют на 2 группы – экзопептидазы и эндопептидазы.

1.2.2.1.1. Экзопептидазы микроорганизмов

Часть экзопептидаз активна только по отношению к концам полипептидных цепей (Barrett, 1994). Экзопептидазы, расщепляющие пептидную связь со стороны свободного N-конца, приводят к высвобождению одного аминокислотного остатка, дипептида или трипептида (аминопептидазы, дипептидил-пептидазы и трипептидил-пептидазы, соответственно). Экзопептидазы, расщепляющие пептидную связь со стороны свободного C-конца, приводят к образованию свободного аминокислотного остатка или дипептида (карбоксипептидазы и пептидил-дипептидазы, соответственно). Другие экзопептидазы специфичны по отношению к дипептидам (дипептидазы) или отщепляют концевые остатки, которые замещены, циклизованы или связаны изопептидными связями (пептидные связи, отличные от тех, которые образованы α -карбоксильными или α -аминогруппами) (омега-пептидазы).

Образование аминопептидаз характерно для многих микроорганизмов, в том числе бактерий и грибов (Watson, 1976; Jankiewicz, Bielawski, 2003; Sriram et al., 2012). Аминопептидазы являются главным образом внутриклеточными ферментами, однако некоторые данные указывают на обнаружение и внеклеточных аминопептидаз (Labbe et al., 1974; Kessler, Yaron, 1976; Lin et al., 2010).

В соответствие с природой аминокислотных остатков в активном центре карбоксипептидазы можно подразделить на три основные группы:

сериновые, металло- и цистеиновые. Сериновые карбоксипептидазы, выделенные из разных грибов (*Penicillium* spp., *Saccharomyces* spp. и *Aspergillus* spp.), обладают сходной субстратной специфичностью, однако отличаются по таким свойствам, как оптимальное значение pH, стабильность, молекулярная масса, чувствительность к ингибиторам (Rao et al., 1998; Mortensen et al., 2013; Remington, 2013).

1.2.2.1.2. Эндопептидазы микроорганизмов

Эндопептидазы расщепляют предпочтительно пептидную связь во внутренних областях пептидных цепей, на значительном расстоянии от концов, а присутствие свободных α -амино- или α -карбоксильных групп негативно действует на активность ферментов (Barrett, 1994). Олигопептидазы – группа эндопептидаз, активных по отношению к олигопептидам или полипептидам, меньшим по размеру, чем белки.

1.2.2.2. Классификация пептидаз по химической природе каталитического сайта

По механизму катализа пептидазы делят на следующие группы (Barrett, 1994): пептидазы серинового типа (сериновые пептидазы), содержащие в активном центре серин, вовлеченный в каталитический процесс; пептидазы цистеинового типа (цистеиновые пептидазы), имеющие остаток цистеина в активном центре; эндопептидазы аспартатного типа (аспартатные пептидазы), для каталитической активности которых необходимы 2 остатка аспарагиновой кислоты; металлопептидазы, у которых ион металла (обычно цинк) участвует в каталитическом процессе. Выделяют также группу пептидаз с неизвестным каталитическим механизмом. По новым классификационным схемам различают еще глутаминовые и треониновые пептидазы (López-Otin, Bond, 2008).

Пептидазы различных классов могут быть сгруппированы в семейства на основе сравнения аминокислотных последовательностей, а семейства могут быть объединены в кланы на основе сходства белковых трехмерных структур (López-Otin, Bond, 2008). Металлопротеазы и сериновые пептидазы составляют наиболее обширные классы пептидаз, в состав которых входят 194 и 176 членов, соответственно; среди цистеиновых пептидаз известны 150 членов, тогда как треониновые и аспартатные пептидазы содержат 28 и 21 член, соответственно. Некоторые данные о пептидазах грибов, принадлежащих к различным классам, собраны и проанализированы в обзорах Rao et al. (1998), de Souza et al. (2015), Mandujano-González et al. (2016).

1.2.2.2.1. Сериновые пептидазы

Наиболее многочисленно среди всех пептидаз семейство химотрипсина S1 (Немова, Бондарева, 2008). Представители семейства обнаружены во всех царствах живого, от вирусов до животных, тогда как прочие сериновые пептидазы наиболее характерны для вирусов, реже – бактерий и грибов. Каталитическая триада белков семейства S1 включает остатки His, Asp, Ser. Тот же порядок остатков характерен, по-видимому, и для белков семейства тогавирусной эндопептидазы S3, при этом члены этого семейства обладают третичной структурой, подобной химотрипсину. Ферменты семейства субтилизина S8 отличаются порядком остатков в триаде – Asp, His, Ser, а также им присуща особая третичная структура, поэтому очевидно, что это семейство эволюционно отлично от линии сериновых пептидаз типа химотрипсина. Семейство пролил-олигопептидазы S9, значительно отличающееся от S1 и S8, представляет собой отдельную эволюционную линию с характерным порядком остатков в каталитической триаде – Ser554, Asp641 и His680. Аналогичен порядок остатков в каталитической триаде пептидаз семейства карбоксипептидазы Y S10 – Ser257, Asp449, His508, но при этом им свойственна особая третичная структура, а рН оптимум (5,0) значительно отличается от присущего другим сериновым пептидазам. Имеется определенное сходство в структуре активных центров этих ферментов с липазой и ацетилхолинэстеразой.

Сериновые протеиназы многочисленны и широко распространены среди вирусов, бактерий и эукариот, что указывает на их жизненно необходимую роль для организмов. Молекулярная масса различных сериновых протеиназ варьирует в пределах от 18 до 35 кДа. Многие из этих ферментов обладают широкой субстратной специфичностью, активны в основном при нейтральных и щелочных значениях рН; оптимальное значение рН находится в интервале рН 7 – 11. Изоэлектрическая точка сериновых протеиназ обычно лежит в пределах рI 4 – 6. Наиболее представленной подгруппой данных ферментов являются щелочные сериновые протеиназы. Хорошими продуцентами щелочных сериновых протеиназ являются виды родов *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Flavobacterium* (Boguslawski et al., 1983), а также *S. cerevisiae* (Mizuno, Matsuo, 1984) и представители родов *Conidiobolus* (Phadatarе et al., 1993), *Aspergillus* и *Neurospora* (Lindberg et al., 1981).

Сериновые протеиназы – классические образцы конвергентной эволюции ферментов двух семейств: химотрипсинов и субтилизинов, имеющих одинаковый каталитический механизм, но совершенно различную пространственную структуру (Тепляков и др., 1990). В настоящее время

известны кристаллические структуры трех субтилизинов: субтилизина BPN', Carlsberg и протеиназы K.

Продуцентом субтилизина BPN' является *Bacillus amyloliquefacience*, субтилизина Carlsberg – *B. licheniformis* (Rao et al., 1998). Субтилизин Carlsberg широко используют при производстве моющих средств; BPN' в коммерческих целях применяется реже. Эти субтилизины характеризуются молекулярной массой 27,5 кДа, но имеют отличия в составе 58 аминокислотных остатков. Субтилизины Carlsberg и BPN' обладают некоторыми сходными свойствами, такими как оптимальная температура (60° С) и оптимальное значение рН (рН 10). Оба фермента проявляют широкую субстратную специфичность; их активный центр образован триадой аминокислотных остатков: Ser221, His64 и Asp32. Однако субтилизин Carlsberg обладает более широкой субстратной специфичностью и не нуждается в ионах Ca²⁺. Щелочная сериновая пептидаза, образуемая *Conidiobolus coronatus*, структурно отличается от субтилизина Carlsberg, несмотря на их функциональное сходство (Phadatara et al., 1997).

Практически все известные фибринолитические сериновые протеиназы принадлежат к семейству субтилизинов бациллярного происхождения (Peng et al., 2005). В большинстве случаев они активны при нейтральных и щелочных значениях рН; оптимальное значение рН таких ферментов соответствует рН 8,0 – 10,0. Молекулярная масса составляет 27,7 – 44 кДа; изоэлектрическая точка находится в области 8,0. Оптимальная температура действия значительно колеблется для различных ферментов, соответствуя 30 – 70° С, для большинства фибринолитических сериновых протеиназ – более 50° С.

Хорошо известная термитаза является бактериальной внеклеточной сериновой протеиназой, выделенной из *Thermoactinomyces vulgaris* (Тепляков и др., 1990). Молекула термитазы представляет собой мономер с молекулярной массой 28,4 кДа. Первичная структура термитазы гомологична бактериальным субтилизином: 42 % остатков совпадают с субтилизином BPN', 44 % остатков – с субтилизином Carlsberg. И в термитазе, и в субтилизине BPN' ионы Ca²⁺ стабилизируют участки поверхности молекулы, повышая термостабильность ферментов и препятствуя частичному разворачиванию цепи, необходимому для автолиза. Термитаза принадлежит к группе субтилизинов со свободным остатком цистеина в активном центре. В нее также входят протеиназа K из гриба *Tritirachium album*, термомиколин из *Malbranchea pulchella* и щелочные протеиназы из *B. thuringiensis* и *B. cereus*.

Среди 54 семейств сериновых пептидаз, описанных в MEROPS Peptidase Database, 21 семейство присуще грибам (Muszewska et al., 2017).

Наиболее распространенными у грибов являются S8 пептидазы. Количество сериновых пептидаз из каждого семейства варьирует у различных таксонов. Согласно данным исследователей, все семейства грибных сериновых пептидаз, кроме одного (S64), сформировались перед разделением организмов на грибы и растения.

В 83 геномах различных видов грибов, проанализированных Li с сотрудниками (Li et al., 2017), обнаружены значительные колебания в числе генов субтилазы. Энтомопатогенный гриб *Metarhizium robertsii* характеризовался наибольшим количеством генов субтилазы (48), тогда как дрожжи *Saccharomyces kluyveri* содержали всего 1 ген этого фермента. У грибных видов среди семейства S8, количество генов подсемейства К-подобных протеиназ было наиболее вариабельным, варьируя от 1 до 19. Это подсемейство генов было распространено у всех исследованных видов, что предполагает его функциональную значимость.

Li с сотрудниками (Li et al., 2017) был сделан вывод, что в процессе эволюции видов грибов имели место как дупликация генов субтилаз, так и их потеря, что привело к разнообразию генов этих ферментов у грибов. Наличие нескольких субтилаз у патогенного гриба может отражать их расширенную экологическую роль при патогенезе. Дупликации, а также многообразие генов субтилаз, вероятно, вносят вклад в увеличение способности к адаптации, круга хозяев и выживаемости грибов-патогенов в различных экологических нишах вне организма-хозяина.

1.2.2.2.2. Цистеиновые пептидазы

Цистеиновые пептидазы встречаются как у прокариот, так и эукариот. Активность всех цистеиновых пептидаз зависит от каталитической диады, состоящей из цистеина и гистидина. Порядок цистеиновых и гистидиновых остатков (Cys-His или His-Cys) различен в семействах (Barrett, 1994). Обычно цистеиновые пептидазы активны только в присутствии восстанавливающих агентов, таких как HCN, дитиотреитол, β -меркаптоэтанол или цистеин. На основании специфичности их разделяют на 4 группы: папаин-подобные, трипсин-подобные с предпочтительным гидролизом по аргининовому остатку, специфичные к глутаминовой кислоте и другие. Папаин является самой известной цистеиновой пептидазой. Цистеиновые пептидазы имеют нейтральный pH оптимум, хотя некоторые из них, например, лизосомальные пептидазы, максимально активны при низких значениях pH (Rao et al., 1998). Они чувствительны к сульфгидрильным агентам, таким как PCMB, но не чувствительны к DFP и металл-хелатирующим агентам.

В семейства цистеиновых пептидаз входят кальпаин, клострипаин, стрептопаин, каспаза-1, пироглутамил-пептидаза I, стафопаин A, сепараза и многие другие пептидазы (MEROPS). Эти ферменты различаются по физико-химическим параметрам и субстратной специфичности.

Так, клострипаин, выделенный из *C. histolyticum*, – фермент, характеризующийся изоэлектрической точкой 4,9 и молекулярным весом 50 кДа (Labrou, 2013), тогда как стрептопаин, цистеиновая протеиназа с молекулярным весом 32 кДа, продуцируемая *Streptococcus* spp., обладает более широкой специфичностью по сравнению с клострипаином; изоэлектрическая точка стрептопаина соответствует 8,4 (Chuang et al., 2013).

1.2.2.2.3. Аспартатные пептидазы

В настоящее время, согласно MEROPS, аспартатные пептидазы включают 16 различных семейств, среди которых наиболее многочисленно семейство пепсина A1. Можно отметить, что грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Neurospora* продуцируют обычно пепсиноподобные ферменты, а родов *Endothia* и *Mucor* – рениноподобные ферменты. Активность большей части аспартатных протеиназ максимальна при низких значениях pH (pH 3 – 4); изоэлектрическая точка многих из них находится в интервале 3 – 4,5. Молекулярная масса аспартатных протеиназ обычно составляет 30 – 45 кДа. Интересная аспартатная эндопептидаза-аллерген Rhi o 1 с молекулярной массой 44 кДа, которая запускает IgE-опосредованную сенсибилизацию организма человека, приводящую к различным аллергическим болезням, идентифицирована у мицелиального гриба *Rhizopus oryzae* (Sircar et al., 2015).

В настоящее время очевидно, что всем аспартатным пептидазам свойственна эндопептидазная активность, они широко распространены среди низших грибов, млекопитающих, рыб и других животных, а также встречаются у некоторых цветковых (насекомоядных) растений (Немова, Бондарева, 2008). Среди аспартатных пептидаз глубоко изучены ферменты желудка (пепсин, гастрицин, химозин), почек (ренин), лизосом (катепсины D и E), секретируемые пептидазы дрожжей и мицелиальных грибов (ризопуспепсин, пенициллопепсин и эндотиапепсин). Все аспартатные пептидазы животных синтезируются в виде зимогенов и впоследствии активируются. Несмотря на то, что зимогены аспартатных пептидаз еще не выделены из грибов, их ДНК последовательности, например, последовательность ризопуспепсина, свидетельствуют о присутствии профермента. Вероятно, и другие аспартатные пептидазы грибов также синтезируются в виде зимогенов.

Можно полагать, что аспаратные пептидазы возникли на более поздних этапах эволюции, чем другие типы, например, сериновые, но не потому, что этот тип катализа более совершенен, а потому, что он приспособлен к определенным условиям, с которыми не сталкивались примитивные организмы (Немова, Бондарева, 2008). Сравнение структур аспаратных пептидаз из различных источников и их активных центров, включающих аминокислотные остатки Asp215, Asp32 и Ser35, свидетельствует о высокой степени сходства их первичной и третичной структур. Одной из причин высокой гомологии может являться довольно протяженный субстрат-связывающий участок, который обеспечивает широкую вариабельность субстратной специфичности. Таким образом, широкая субстратная специфичность достигается незначительными изменениями стерического соответствия и не требует приобретения дополнительных доменов, как это наблюдается в эволюции сериновых пептидаз. Несмотря на широкое разнообразие выполняемых функций, очевидная высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей аспаратных пептидаз указывает на их происхождение от общего предшественника путем эволюционной дивергенции.

1.2.2.2.4. Металлопептидазы

Металлопротеиназы являются наиболее разнородной группой пептидаз, различающихся типами каталитически существенных функциональных групп. Активность этих ферментов зависит от наличия ионов двухвалентных металлов. К металлопротеиназам относят протеазы различного происхождения: коллагеназы и геморрагические токсины эукариотических организмов, ангиотензин-превращающий фермент, миколизин, фрагилизин, термолизин бактериального происхождения (Weaver et al., 1977; Hibbs et al., 1985; Okada et al., 1986; Wilhelm et al., 1987; Shannon et al., 1989; van den Burg, Eijsink, 2013; Clarke et al., 2013; Goulas, Gomis-Rüth, 2013; Ishii, Kumazaki, 2013; van Wart, 2013; MEROPS).

В соответствие со специфичностью действия металлопротеиназы были разделены на четыре группы: нейтральные, щелочные, *Mухobacter* I и *Mухobacter* II (Rao et al., 1998). Так, нейтральные протеиназы специфичны к остаткам гидрофобных аминокислот, тогда как щелочные проявляли гораздо более широкую специфичность действия. Протеиназа *Mухobacter* I была специфична к остаткам небольших аминокислот, тогда как *Mухobacter* II – к остаткам лизина полипептидной цепи.

Хорошо известным представителем нейтральных металлопротеиназ является термолизин, образуемый *B. caldolyticus*, *B. stearothermophilus* и *B. thermoproteolyticus* (van den Burg, Eijsink, 2013). Эта протеиназа представляет

собой пептид с молекулярной массой 34 кДа, содержащий атом Zn^{2+} в бороздке, образованной двумя свернутыми частями белка, а также четыре атома Ca^{2+} , обуславливающих термостабильность фермента.

К нейтральным металлопротеиназам относится и коллагеназа, продуцируемая *C. histolyticum*, *Achromobacter iophagus* и другими микроорганизмами, включая грибы (van Wart, 2013). Коллагеназа высокоспецифична; она гидролизует только коллаген и желатин. Эластаза, образуемая *Pseudomonas aeruginosa*, является другим важным представителем данного семейства протеиназ.

Щелочные металлопротеиназы, секретируемые *P. aeruginosa* и *Serratia* spp., обладают молекулярной массой 48 – 60 кДа и проявляют активность при более высоких значениях pH 7 – 9 (Rao et al., 1998). Оптимальное значение pH для протеиназы *Mycobacter* I (молекулярная масса 14 кДа) составляет pH 9,0. Протеиназа *Mycobacter* I способна лизировать клеточную стенку *Arthrobacter crystallopoites*, тогда как протеиназа *Mycobacter* II не обладает таким свойством.

Очень часто физиологическое значение металлопептидаз не установлено (Немова, Бондарева, 2008). Из общих соображений заманчиво отнести именно этот тип пептидаз к эволюционно древнейшему. Сходство структуры активных центров металл-зависимых и сериновых пептидаз, с одной стороны, и металл-зависимых и аспартатных – с другой, наводит на мысль о том, что металлопептидазы могут быть общим эволюционным предшественником этих двух типов ферментов.

1.2.2.2.5. Глутаминовые пептидазы

Недавно обнаруженное семейство глутаминовых пептидаз – новая группа кислых пептидаз, имеющих структурные и механизменные особенности, отличные от таковых канонических пептидазных семейств (Kondo et al., 2010). Такие пептидазы до недавнего времени обнаруживались только у мицелиальных грибов, где они играли важную роль при росте грибов. Глутаминовые пептидазы отличаются от аспартатных пептидаз тем, что не чувствительны к пепстатину. Отсутствует сходство аминокислотных последовательностей глутаминовых пептидаз и охарактеризованных пепсин-подобных и ретровирусных аспартатных пептидаз.

Глутаминовая пептидаза, выделенная из дереворазрушающего гриба *Scytalidium lignicolum* (scytalidoglutamic peptidase, SGP), является прототипом глутаминовых пептидаз (Kondo et al., 2010). Gln⁵³ and Glu¹³⁶ (в нумерации SGP) предположительно участвуют в каталитическом процессе. По результатам сайт-направленного мутагенеза, глутаминовая пептидаза *Aspergillus niger* содержит каталитическую диаду. Кристаллическая

структура глутаминовой пептидазы из *A. niger* имеет высокую степень сходства с молекулярной структурой SGP.

Первая характеристика бактериальной глутаминовой пептидазы (perG1) из термоацидофильной бактерии *Alicyclobacillus* sp. DSM 15716 была дана Jensen с коллегами (Jensen et al., 2010). Идентичность аминокислотной последовательности perG1 и сходных грибных пептидаз составляет всего 24 – 30 %, однако присутствие глутамат/глутаминовой каталитической диады и число высококонсервативных мотивов подтверждают принадлежность perG1 к семейству глутаминовых пептидаз. Филогенетический анализ помещает perG1 и другие бактериальные и архейные глутаминовые пептидазы в кластер, отделенный от грибных глутаминовых пептидаз, что указывает на их дивергентную и независимую эволюцию.

1.2.2.2.6. Треониновые пептидазы

Треониновые пептидазы семейств T1-3 широко распространены среди живых организмов (Немова, Бондарева, 2008; MEROPS). Вместе с сериновыми (семейство S45) и цистеиновыми (семейства S44, 45, 59, 69) пептидазами они объединены в общий клан PB, отличительной особенностью которого является N-концевое положение каталитического нуклеофила и сходная третичная организация, независимо от свойственного ферменту механизма катализа. Семейство T1 включает один из пептидазных компонентов относительно хорошо охарактеризованного протеолитического комплекса – протеасомы, в каталитическом коре b-субъединицы которой обнаруживается активный остаток Thr9.

1.2.2.3. Классификация пептидаз по эволюционному родству

Этот метод позволяет определить структурное подобие в пределах семейства пептидаз и таким образом отражает важные сходства в каталитическом механизме, а также других свойствах, вплоть до биологических функций (Barrett, 1994).

Термин «класс» обозначает набор пептидаз, различаемых по химическим группам, ответственным за катализ (Rawlings, Barrett, 1993). Термин «семейство» употребляют для описания групп ферментов, в которых каждый член показывает эволюционное родство, по крайней мере, с одним другим членом по целой аминокислотной последовательности или ее части, ответственной за каталитическую активность. Термин «клан» соответствует группе семейств, для которой существуют указания на эволюционное родство. Такие указания далекого родства исходят прежде всего из линейного порядка остатков каталитического сайта и третичной структуры.

Различают 60 эволюционных линий пептидаз различного происхождения (Rawlings, Barrett, 1993). Некоторые из них содержат члены с

различной протеолитической активностью, и среди них имеются примеры конвергенции.

Эволюционная система не совместима с классификацией пептидаз по катализируемой реакции, так как многие семейства содержат пептидазы с различными типами протеолитической активности, а некоторые специфичности встречаются в нескольких семействах (Rawlings, Barrett, 1993). Однако классификация пептидаз по эволюционному родству вполне совместима с классификацией этих ферментов по каталитическому типу; таким образом, эволюционная система склонна к объединению ферментов, которые сходны друг с другом по структуре и каталитическому механизму.

1.2.3. Микроорганизмы как продуценты протеолитических ферментов

Будучи физиологически необходимыми для функционирования живых организмов, протеолитические ферменты обнаружены у представителей всех царств живой природы.

Микроорганизмы представляют значительный интерес как продуценты протеаз ввиду широкого разнообразия присутствующих у них ферментов и возможности успешного проведения генетических манипуляций. Протеолитические ферменты микробного происхождения часто предпочтительнее пептидаз растений или животных, так как они обладают практически всеми характеристиками, необходимыми для биотехнологического применения. Известно, что микроорганизмы быстрее растут, занимают меньше места; для них можно использовать разнообразные дешевые субстраты. Легче проводить генетические манипуляции на микроорганизмах, направленные на увеличение выхода целевого фермента. Они могут использоваться как модельные системы при изучении структур и механизмов действия пептидаз различного происхождения.

Пептидазы микроорганизмов синтезируются конститутивно или индуцибельно при большинстве известных условий культивирования (Gupta et al., 2002). На образование внеклеточных протеаз микроорганизмами влияют такие факторы, как отношение C/N в питательной среде, наличие в ней некоторых легко метаболизируемых сахаров и ионов металлов, тип источника азота, количество вносимого посевного материала, а также ряд физических факторов (степень аэрирования, значение pH среды, температура инкубирования).

1.2.4. Грибные пептидазы

Грибы способны продуцировать более широкий спектр ферментов по сравнению с бактериями (Rao et al., 1998). Так, *Aspergillus oryzae* синтезирует кислые, нейтральные и щелочные пептидазы. Грибные пептидазы активны в более широком диапазоне значений pH (pH 4 – 11) и проявляют более

широкую субстратную специфичность, чем бактериальные пептидазы, однако скорость реакций, в которых они участвуют, обычно ниже, чем в случае реакций с участием ферментов бактерий. Для производства грибных пептидаз широко используют метод твердофазной ферментации. Он позволяет культивировать грибы на недорогой и оптимизированной среде в крупных масштабах. Секретируемые ферменты мицелиальных грибов легче выделять, так как представители этой группы грибов волокнистые, и поэтому можно не проводить стадию центрифугирования. Оптимальные значения рН для активности грибных кислых протеаз лежат в интервале значений рН 4,0 – 4,5; при рН 2,5 – 6,0 ферменты остаются стабильными. Кислые протеолитические ферменты грибного происхождения широко используют в производстве сыров благодаря активности этих ферментов при узком диапазоне величин рН и относительно невысокой термостабильности. Нейтральные пептидазы грибного происхождения относятся к металлопротеазам; эти ферменты активны при рН 7,0 и инактивируются хелатирующими соединениями. Грибные нейтральные пептидазы часто применяют в качестве дополнительного фермента к пептидазам растительного, животного и бактериального происхождения. Грибные щелочные пептидазы также используют для модификации белков в пищевой промышленности и получения белковых гидролизатов как добавки к диете скота (Kechaou et al., 2009).

В целом, пептидазы грибов обладают рядом особенностей и преимуществ перед протеолитическими ферментами других микроорганизмов, что делает эту группу организмов перспективными их продуцентами и интересным объектом изучения ферментов взаимодействия патоген – растение (Laxman et al., 2005).

1.2.5. Значение пептидаз

В процессе эволюции пептидазы развили адаптации к широкому кругу меняющихся природных условий, таких как рН, температура, степень аэрации и другие, а также стали использовать различные каталитические механизмы для гидролиза субстрата. Долгое время считалось, что первичная роль протеолитических ферментов заключается в расщеплении белков для питания и внутриклеточных белковых превращений. Однако позднее выяснилось, что этим функции пептидаз не ограничены, и еще одна важная роль пептидаз – активация белков посредством ограниченного протеолиза. Было открыто, что точное расщепление белков пептидазами означает очень тонкие способы их регуляции.

1.2.5.1. Физиологическая роль пептидаз

Пептидазы, являясь необходимыми ферментами для поддержания гомеостаза как прокариотических, так и эукариотических клеток, вовлечены во множество физиологически значимых процессов, начиная от расщепления белков как источников питательных веществ и кончая тонко регулируемые метаболическими каскадами, такими как клеточная пролиферация, сигналинг и клеточная гибель (dos Santos, 2011). Протеолитические ферменты микроорганизмов участвуют в белковом обмене, спорообразовании, прорастании спор, активации зимогенных форм ферментов, протеолитической инактивации ферментов, ферментных модификациях (Rao et al., 1998). В отличие от других посттрансляционных модификаций белков (например, фосфорилирования), в норме протеолиз представляет собой необратимый процесс, поэтому и регуляция активности протеолитических ферментов играет первостепенную роль при поддержании гомеостаза клеток (Scott, Taggart, 2010).

Протеолитические ферменты необходимы для протекания множества разнообразных биологических процессов у организмов. Кроме их фундаментальной роли в расщеплении и катаболизме белков, у многих организмов эти ферменты в процессе эволюции приобрели специализированные функции.

Патогенные микроорганизмы вырабатывают как неспецифические, так и высокоспецифичные пептидазы, способствующие развитию инфекционного процесса. Пептидазы как факторы вирулентности микроорганизмов участвуют на различных этапах взаимодействия возбудителей заболеваний с организмом хозяина (dos Santos, 2011). Поэтому биохимическая характеристика протеолитических ферментов микробного происхождения важна для понимания их роли при инфекционных заболеваниях, а также для разработки рациональной химиотерапии таких заболеваний.

1.2.5.2. Функции пептидаз у микромицетов

Сериновые пептидазы вовлечены во многие взаимодействия грибов с организмом-хозяином, как симбиотические, так и паразитические (Muszewska et al., 2017). Они важны для расщепления белковых субстратов растительного или животного происхождения.

Предполагается, что многие субтилазы у патогенных аскомицетов могут играть различные роли при патогенезе, в том числе, увеличивать адаптированность и круг хозяев, а также выполнять различные функции, обеспечивающие выживание в разных экологических нишах вне организма-хозяина (Hu, Leger, 2004).

И хотя гены субтилаз считаются ключевыми факторами вирулентности у некоторых патогенов, связи между распространенностью генов этих ферментов и патогенностью у ряда грибов не обнаружено (Li et al., 2017). Так, некоторые оппортунистические грибы-патогены, такие как *Aspergillus fumigatus* и *A. clavatus*, характеризуются сходным и небольшим числом генных копий субтилаз по сравнению с сапротрофными представителями рода *Aspergillus*. Дрожжеподобные грибы-патогены человека и животных *Candida* spp. также обладают сходным с сапротрофными грибами подотдела *Saccharomycotina* числом генов субтилаз. Два фитопатогенных вида грибов – *Sclerotinia sclerotiorum* и *Botryotinia fuckeliana*, – относящиеся к классу *Leotiomycetes*, содержат небольшое число копий генов субтилаз. В отличие от них, ряд сапротрофных грибов, таких как *Uncinocarpus reesei*, *Trichoderma reesei* и *Podospora anserina*, характеризуется чрезвычайно высокой распространенностью генов субтилаз в геномах. Это предположительно указывает на то, что распространенность генов, кодирующих эти ферменты, не связана с патогенностью, по крайней мере, у некоторых мицелиальных грибов. Однако определить точные функции множественных генов субтилаз у видов грибов сложно, так как делеция одного фактора патогенности может только незначительно ослабить патогенность гриба. Более того, для патогенных грибов важно взаимодействие различных факторов патогенности, которые могут включать и множественные гены субтилаз.

Секретируемые трипсин-подобные пептидазы предположительно исполняют свои функции при взаимодействии с окружающей средой у тех грибов, которые экспрессируют их на высоком уровне, и, возможно, преадаптируют грибы к определенному образу жизни, такому как патогенез (Hu, Leger, 2004).

Пептидазы используются грибами и для выполнения защитных функций. В процессе эволюции грибы развили несколько механизмов, позволяющих преодолевать такой барьер растений, как секреция ими хитиназ, обладающих высокой антифунгальной активностью. Одним из них (наряду с секрецией эффекторов LysM) является секреция грибами протеолитических ферментов, расщепляющих хитиназы (de Sain, Rep, 2015).

При этом фермент, кодируемый одним и тем же или сходным геном, у разных видов может выполнять различные функции, что, возможно, связано с занимаемыми экологическими нишами. Так, имеются данные, что отдельные пептидазы, такие как фермент Prb1, ассоциированные с патогенностью гриба-патогена человека *Cryptococcus neoformans*, вносят незначительный вклад в общую секретируемую протеолитическую активность и предположительно обладают очень строгой субстратной специфичностью (Clarke et al., 2016). В

другой работе (Shi et al., 2014) отмечается, что белок Prb1, предполагаемая субтилизин-подобная протеаза фитопатогенного гриба *Cryphonectria parasitica*, обладает множественными функциями и может участвовать в регуляции вегетативного роста и развития гриба, оставаясь при этом фактором вирулентности. Вклад фермента у этого фитопатогена в общую протеолитическую активность был значительным (60 %). По-видимому, такие функциональные различия связаны с адаптацией грибов к различным условиям организма-хозяина.

1.2.6. Практическое применение пептидаз

В настоящее время протеолитические ферменты занимают второе место после амилаз среди наиболее важных в промышленном отношении ферментов (Бут и др., 2005). Ежегодно в мире производится примерно 500 т этих ферментов, используемых прежде всего в производстве моющих средств. Огромным достижением для промышленности стало внедрение способа получения протеаз из *B. licheniformis*, в первую очередь субтилизина. К концу 1960-х гг. пептидазы включали в состав примерно 50 % всех детергентов, производимых в Европе и США. Постоянно продолжаются исследования, направленные на усиление ферментативной активности пептидаз, их способности к удалению различных пятен и стабилизацию активности в мыльной пене. Поскольку продуктивность штаммов дикого типа низка для промышленных целей, проводятся интенсивные исследования с целью ее повышения. Кроме того, клонированы гены нескольких пептидаз, и с помощью методов генетической инженерии получены штаммы рода *Bacillus*, продуцирующие модифицированные сериновые пептидазы. Например, замена в них аминокислотного остатка Met-222 на остаток одной из неокисляемых аминокислот позволила получить пептидазы, значительно более устойчивые к действию H_2O_2 . Продукция внеклеточных пептидаз регулируется главным образом составом среды. Так, ее подавляют ионы аммония и аминокислоты, в связи с чем при промышленном культивировании продуцентов в основном используют технологию с постоянной подачей питательных веществ в биореактор, чтобы поддерживать в среде низкую концентрацию этих источников азота. Синтез пептидаз начинается в конце экспоненциальной фазы роста культуры. Содержание добавок пептидаз в моющих средствах составляет 0,5 %, при этом вносимый препарат содержит активный фермент в количестве 3 %. Такая относительно низкая концентрация фермента в детергенте вполне достаточна благодаря высокому сродству фермента к субстрату.

Пептидазы микроорганизмов нашли применение во многих отраслях промышленного производства. Так, щелочные пептидазы микробного

происхождения используют не только в производстве моющих средств, но и в производстве кормов для животных, пептидном синтезе, легкой промышленности, фармакологии и других отраслях (Gupta et al., 2002).

Пептидазы широко используются в пищевой промышленности. Эти ферменты применяют для улучшения усвояемости пищевых продуктов и их органолептических свойств, а также для обеспечения здорового питания за счет сокращения в нем аллергенных компонентов (Tavano, 2013). Пептидазы, образуемые *Mucor michei* и *Endothia parasitica*, постепенно замещают ренин в производстве сыров (Demain, Adrio, 2008).

Таким образом, протеолитические ферменты микроорганизмов представляют одну из самых значимых групп гидролитических ферментов в энзимологии. Возрастающий интерес к пептидазам микробного происхождения связан не только с их ролью как ферментов, необходимых для нормального функционирования клеточных метаболических процессов, но и с широкой возможностью их использования в различных отраслях промышленности.

Сериновые, цистеиновые, аспартатные пептидазы и металлопротеазы широко распространены среди многих патогенных микроорганизмов, выступая в качестве факторов колонизации. Учитывая приобретающую все более высокий уровень резистентность многих возбудителей инфекционных заболеваний (особенно госпитальных штаммов) к фармакологическим препаратам (Ayres, Schneider, 2008), особую актуальность приобретает поиск эффективных ингибиторов микробных пептидаз. Исследование же биохимических свойств протеолитических ферментов микроорганизмов способствует более полному пониманию функций этих ферментов, а также разработке новых высокоспецифичных ингибиторов их активности.

1.2.7. Разнообразие и особенности внеклеточных пептидаз у микромицетов

Активность грибов зависит от их способности получать питательные вещества из живых или мертвых организмов растений или животных (Hu, Leger, 2004). Для обеспечения питания грибов высокомолекулярные соединения должны быть расщеплены внеклеточными гидролазами до низкомолекулярных продуктов, поступающих в клетки.

Таким образом, разнообразие грибов во многом обусловлено разнообразием секретируемых ими ферментов, в том числе пептидаз.

В целом пептидазы грибного происхождения характеризуются активностью в широком диапазоне значений pH (pH 4 – 11) и невысокой субстратной специфичностью. При этом грибные пептидазы обладают рядом преимуществ перед протеолитическими ферментами бактерий, одним из

которых является более широкий набор ферментов, и, соответственно, более широкий спектр активностей.

У семи различных видов рода *Aspergillus* (*A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. flavus*, *N. fischeri* и *A. fumigatus*) идентифицированы 133 возможные пептидазы (Budak et al., 2014). При этом только 25 из них предположительно не были внеклеточными. По мнению авторов работы, некоторые из них могут секретироваться посредством альтернативных (не классических) систем секреции. Согласно результатам сравнительной геномики, наиболее крупную группу генов пептидаз исследованных видов рода *Aspergillus* составляли гены, кодирующие сериновые пептидазы. Протеомные и энзиматические исследования в целом подтверждают эти результаты, так как сериновые пептидазы действительно представляют наиболее крупный класс протеолитических ферментов у видов данного рода. Добавление пшеничных отрубей приводило к более сильной индукции пептидаз по сравнению с добавлением свекловичного жома. Наиболее широкий спектр пептидаз обнаружен у *A. flavus*.

Определено, что сапротрофный вид *Aspergillus fumigatus* секретирует эндопептидазы, которые могут быть классифицированы как аспартатные пептидазы пепсинового семейства, сериновые пептидазы седолизинового и субтилизинового семейств, а также металлопротеазы двух различных семейств (Reichard et al., 2006).

Согласно данным Landowski с сотрудниками (Landowski et al., 2015), штамм *Trichoderma reesei* на среде с добавлением экстракта зерна секретирует широкий круг протеолитических ферментов, среди которых – аспартатные, глутаминовые, а также сериновые (субтилизин- и трипсин-подобные) пептидазы.

Различные внеклеточные сериновые пептидазы были найдены у фитопатогенного гриба *Alternaria solani* (Chandrasekaran, Sathiyabama, 2014), у *Fusarium eumartii* (Olivieri et al., 2002), *F. culmorum* (Pekkarinen et al., 2003) и *Penicillium italicum* (Abidi et al., 2014).

Во многих работах авторы предполагают значительную функциональную роль грибных пептидаз, однако вклад протеолитических ферментов паразитических штаммов в фитопатогенез часто остается невыясненным.

1.2.8. Секреция пептидаз микромицетами

Микроорганизмы образуют широкий набор протеолитических ферментов, делящийся на внутри- и внеклеточные пептидазы (de Souza et al., 2015; Krishnan et al., 2018). Внутриклеточные пептидазы важны для различных клеточных и метаболических процессов, таких как споруляция и

дифференциация, созревание ферментов и гормонов и поддержание клеточного белкового пула. Внеклеточные пептидазы необходимы для гидролиза белков, находящихся в окружающей среде, и дают возможность клеткам абсорбировать и использовать продукты гидролиза (Gupta et al., 2002).

Главными факторами, влияющими на образование пептидаз у грибов, являются отношение C/N, присутствие легко метаболизируемых сахаров (таких, как глюкоза), наличие ионов металлов, а также физические факторы – степень аэрации, концентрация посевного материала, величина pH, температура и время инкубации (de Souza et al., 2015). Так, секреция пептидаз у представителей рода *Mucor* начиналась в первые 24 ч, когда происходило интенсивное потребление питательных веществ клетками грибов (Alves et al., 2005). Уменьшение ферментативной активности пептидаз наблюдалось после достижения ее максимума (120 ч роста).

Описаны различные механизмы, регулирующие синтез и секрецию внеклеточных пептидаз. Наличие белкового субстрата в оптимальной концентрации в среде культивирования – обязательное условие секреции пептидаз у некоторых фитопатогенных грибов (Chandrasekaran, Sathiyabama, 2013). Высокие концентрации конечных продуктов, таких как аминокислоты, ионы аммония и легко метаболизируемые источники углерода, могут репрессировать образование протеолитических ферментов (de Souza et al., 2015). С другой стороны, образование пептидаз может усиливаться в присутствии недостаточных количеств источника углерода, азота и серы. Внеклеточные ферменты могут секретироваться конститутивно на низком уровне вне зависимости от доступности субстрата. Образование пептидаз микроорганизмами зависит от природы источника азота. В целом, грибы образуют больше протеолитических ферментов в присутствии более сложных белковых источников азота, чем в присутствии низкомолекулярных или неорганических источников азота.

1.2.9. Секреция вторичных метаболитов и пептидазы микромицетов

В последнее время исследователей все больше интересуют вопросы, связанные с комплексным действием гидролитических ферментов, в том числе пептидаз, с вторичными метаболитами. Возможно, некоторые вторичные метаболиты помогают грибам устранять конкурентов при развитии, другая же их часть способствует преодолению барьеров, препятствующих укреплению микроорганизмов (в том числе микроскопических грибов) в определенной экологической нише.

Вторичные метаболиты – небольшие органические молекулы, продуцируемые различными микроорганизмами (главным образом

микроскопическими грибами и актинобактериями) посредством действия крупных ферментов, таких как нерибосомальные пептидсинтазы и поликетидсинтазы, или таких ферментов, как диметилаллилтрансферазы и пренилтрансферазы (Scharf et al., 2014). Эти особые метаболиты в большинстве случаев не необходимы для роста, но, вероятно, создают преимущества продуцирующему их организму в определенных условиях обитания. У грибов гены, ответственные за биосинтез вторичных метаболитов, обычно объединены в кластеры (Brakhage, 2013), которые часто расположены на концах хромосом в субтеломерных участках (Palmer, Keller, 2010). Ко вторичным метаболитам грибов относят пигменты, антибиотики, микотоксины, гормоны, микоспорины и другие соединения.

Для части этих молекул обсуждается их вклад в патогенность грибов.

Наглядным примером вторичных метаболитов, необходимых для проявления патогенных свойств грибов, являются меланины, речь о которых уже шла выше (в п. «Гидролитические ферменты микроскопических грибов»). Меланины – темные пигменты, получаемые окислительной полимеризацией из фенольных предшественников (Jacobson, 2000; Eisenman, Casadevall, 2012).

Меланины встречаются у организмов всех царств органического мира (Engh et al., 2007). У грибов эти макромолекулы играют важную роль в выживании в экстремальных условиях и в поддержании более продолжительного существования. У патогенных грибов меланин не только ответственен за их выживание при неблагоприятных физико-химических условиях (повышенном УФ-облучении и температурах, засухе и др.), но и важный фактор вирулентности (Henson et al., 1999, Calvo et al., 2002).

У грибов два главных типа меланинов, дигидроксинафталиновый и дигидроксифенилаланиновый, а также их производные, вносят вклад в вирулентность (Scharf et al., 2014). Способность образовывать меланин через полимеризацию ди- или тетрагидроксинафталена широко распространена среди грибов, а для некоторых грибов показано образование дигидроксифенилаланинового меланина из L-тирозина через дигидроксифенилаланин. Функции меланинов необычайно многообразны. Они наделяют полезными функциями организм-продуцент благодаря тому, что опосредуют общую защиту против широкого спектра экзогенных стрессов. Меланины часто ассоциированы с клеточной стенкой и поэтому участвуют в организации грибных структур и процессов, таких как орнаментация споровой поверхности или стабилизация давления. Неудивительно, что меланины вносят вклад в патогенность у ряда грибных патогенов растений и человека.

Два значимых вида грибов, у которых дигидроксинафталиновый меланин является предпосылкой вирулентности, – патоген человека *Aspergillus fumigatus* и фитопатоген *Magnaporthe oryzae* (Scharf et al., 2014). У *A. fumigatus* дигидроксинафталиновый меланин образуется главным образом в процессе конидиогенеза и вызывает характерный серо-зеленый цвет спор. Эти споры широко распространены в природе; по оценкам, каждый человек вдыхает сотни – тысячи конидий каждый день. Это представляет собой важный вопрос, особенно для пациентов с ослабленной иммунной системой, что делает *A. fumigatus* самым главным грибным патогеном человека, споры которого распространены в воздухе (Brakhage et al., 2010).

В легких конидиям *A. fumigatus* противостоит иммунная система организма человека; фагоциты представляют собой первую линию защиты (Scharf et al., 2014). Лишенные пигмента белые конидии значительно менее вирулентны, что показано в исследованиях на мышах. Пигментированные конидии обладают двойным действием на фагоциты: во-первых, они предотвращают гибель после фагоцитоза благодаря тому, что препятствуют фаголизосомальному окислению; во-вторых, они подавляют апоптоз макрофагов. Таким образом, меланин *A. fumigatus* важен в установлении ниши в присутствии фагоцитов, в которой гриб защищен от дальнейших иммунных реакций организма, обеспечивая себе возможность роста.

У фитопатогенного гриба *M. oryzae*, который вызывает повсеместно наиболее значимую болезнь риса пирикулярриоз, механизм, благодаря которому дигидроксинафталиновый меланин влияет на вирулентность, принципиально отличается от такового у *A. fumigatus* (Wilson, Talbot, 2009). Инфекция листьев растений риса требует проникновения гриба в растительную клеточную стенку. Повышенный тургор, необходимый для этого процесса, создается благодаря специализированным грибным структурам – аппрессориям, меланин которых задерживает выход растворенного вещества (Soanes et al., 2012). Меланин-дефицитные мутанты формируют непигментированные аппрессории, не способные проникать в эпидермальные клетки кутикулы листьев (Howard, Valent, 1996). Показано, что целевые ингибиторы ферментов путей образования дигидроксинафталинового меланина, такие, как карпропамид, эффективно предотвращают развитие инфекции.

Cryptococcus neoformans, главный возбудитель оппортунистической грибной инфекции у пациентов, страдающих СПИДом, образует меланин исключительно через дигидроксифенилаланиновый путь. Меланизация происходит в течение инфекции, и мутанты *C. neoformans*, лишенные

меланинового пигмента, показали уменьшенную вирулентность при инфекции у мышей (Liu, Nizet, 2009).

Обнаружение каких-либо корреляций между образованием меланинов, пептидаз и доказанных факторов патогенности могло бы помочь в воссоздании общей картины их действия на определенных этапах развития микроорганизмов (например, таких как фитопатогенез).

1.2.10. Внеклеточные пептидазы различных родов мицелиальных микромицетов

1.2.10.1. Внеклеточные пептидазы видов рода *Alternaria*

Виды рода *Alternaria* – главным образом сапротрофные микромицеты, часто встречаемые в почве и на отмерших растительных тканях (Thomma, 2003). Некоторые виды рода *Alternaria* являются оппортунистическими экономически значимыми фитопатогенами, вызывающими ряд болезней растений, включая зерновые, декоративные, масличные и овощные культуры. Некоторые представители рода – клинически значимы ввиду образования токсических вторичных метаболитов, к которым относятся и микотоксины, вовлеченные в развитие рака у млекопитающих. Споры альтернаний являются одними из наиболее распространенных аллергенов.

При изучении микромицетов рода *Alternaria* упор делается, главным образом, на образование меланинов и секрецию специфических токсинов у патогенных видов. Вопрос об образовании пептидаз у этих грибов рассматривается относительно редко.

Меланины повышают вирулентность патогенов за счет механического усиления клеточной стенки, повышения их резистентности к различным механизмам защиты хозяина, подавления, например, иммунного ответа при заражении (Nosanchuk, Casadevall, 2006; Taborda et al., 2008). Поэтому меланин и путь его биосинтеза являются «мишенью» для ряда соединений, применяемых для защиты растений от грибных патогенов. Меланин обычно локализован в клеточной стенке грибов, на ее поверхности и экскретируется в культуральную жидкость. Его количество значительно варьирует в зависимости от вида и штамма (Nosanchuk et al., 2015).

На сегодняшний день пептидазы *Alternaria* spp. привлекают пристальное внимание как сильные аллергены, критичные на ранних стадиях развития астмы (Boitano et al., 2011; Matsuwaki et al., 2012). Однако во взаимодействиях патогенного гриба с организмом хозяина секретлируемые грибом протеолитические ферменты могут играть большую роль как факторы вирулентности. С этих позиций пептидазы представителей рода *Alternaria* практически не изучались. Можно отметить работы Chandrasekaran с соавторами, в которых идентифицирована и охарактеризована щелочная

сериновая пептидаза фитопатогенного гриба *A. solani* и подобраны оптимальные условия ее образования (Chandrasekaran, Sathiyabama, 2014; Chandrasekaran et al., 2016). Максимум образования пептидазы в среде, содержащей 1 % казеина, был отмечен на 9-е сутки культивирования, когда значение рН среды достигало 8,5 ед. В средах, содержащих индукторы, отличные от казеина, такие как желатин, глицин или глутаминовая кислота, были детектированы низкие уровни пептидаз. Очищенный фермент характеризовался оптимумом рН 9, оставался активным в диапазоне рН 7 – 10. Пептидаза обладала широким температурным диапазоном активности и, по мнению авторов, может служить маркером фитопатогенности у *A. solani*.

Для раскрытия механизмов патогенеза важно иметь данные о спектре, активности и специфичности протеолитических ферментов, а также интенсивности синтеза меланинов фитопатогенными грибами различных видов. На сегодня недостаточно информации по этому вопросу для многих фитопатогенов и, в частности, для грибов рода *Alternaria*, распространенных возбудителей некротрофных заболеваний растений (Dang et al., 2015).

1.2.10.2. Внеклеточные пептидазы *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers. Fr. – патоген, вызывающий повсеместно болезни более 200 видов культур растений (Williamson et al., 2007). Этот вид грибов – типичный некротроф: он вначале убивает клетки растения-хозяина, а затем колонизирует мертвые ткани (Amselem et al., 2011). Наиболее уязвимы для развития *B. cinerea* зрелые и стареющие ткани двудольных растений. Проникнув в такие ткани на более ранних стадиях развития растений, *B. cinerea* обычно находится в состоянии покоя длительный период.

B. cinerea характеризуется множественными механизмами поражения растительных тканей, широким спектром растений-хозяев и способностью длительное время переживать неблагоприятные условия в виде склероций (Williamson et al., 2007).

B. cinerea, как и многие другие мицелиальные грибы, секретирует ряд внеклеточных ферментов, расщепляющих полимеры растительной клеточной стенки с целью проникновения в нее и питания (Shah et al., 2009).

Анализ генома *B. cinerea*, проведенный Amselem с коллегами (Amselem et al., 2011), выявил гены, кодирующие белки с предполагаемой протеолитической активностью секретируемых аспартатных протеиназ (13 генов), карбоксипептидазы Y (8 генов), седолизина (7 генов), субтилизина (2 гена), цистеиновых пептидаз (2 гена). Этот анализ показал, что геном *B. cinerea* содержит большое количество генов, кодирующих пептидазы с низким оптимумом рН. Полученные данные указывают на адаптацию протеолитических ферментов гриба *B. cinerea* к его существованию в среде с

низкими значениями рН, создаваемыми образуемой им щавелевой кислотой (Amselem et al., 2011).

Исследования, проведенные ten Have с сотрудниками (ten Have et al., 2010), показали, что у *B. cinerea* существует 14 аспартатных пептидаз с различной клеточной компартиментализацией, включая цитозоль (BcAP1). Самым распространенным протеолитическим ферментом оказался белок BcAP8, активность которого составляла 70 – 80% общей секретируемой протеолитической активности.

Показано, что *B. cinerea* образует значительные количества внеклеточных пептидаз, обнаруживаемых после 6 дней культивирования в жидкой среде с 2 % (w/v) желатина, используемым в качестве индуктора секреции (Abidi et al., 2008). Максимальный уровень активности пептидаз был отмечен авторами после 9 дней культивирования штамма. Сочетание дрожжевого экстракта и пептона в среде значительно увеличивало продукцию пептидаз.

Учитывая экономическую значимость заболеваний, вызываемых *B. cinerea* у растений и возможное участие в этих процессах пептидаз, а также экологические особенности этого вида микромицетов, важным и интересным представляется сравнение секреции разных групп пептидаз этого гриба на средах с различными индукторами секреции, а также выявление характера развития его протеолитической активности во времени при культивировании в жидкой среде.

1.2.10.3. Внеклеточные пептидазы видов рода *Fusarium*

Микромицеты из рода *Fusarium* – широко распространенные факультативные паразиты, являющиеся опасными возбудителями болезней сельскохозяйственных культур (Бородин, Котлярова, 2005). Виды рода *Fusarium* часто относят к почвенным микромицетам ввиду их широкой распространенности в почве, а также частой ассоциации с корнями растений, что характерно как для паразитических, так и сапротрофных культур (Nelson et al., 1994). Высокая частота встречаемости видов этого рода может быть обусловлена их способностью расти на различных субстратах и эффективными механизмами распространения.

К факторам вирулентности *Fusarium* spp. относят токсины, ферменты и адгезивность.

До недавнего времени не было обнаружено, чтобы патогенные фузариумы образовывали специализированные структуры для проникновения в клетки растений-хозяев (аппрессории или гаустории); считалось, что эти грибы проникают в организм растений через естественные отверстия на их поверхности или посредством коротких инфекционных гиф (Kikot et al.,

2009). Однако недавно были описаны специфические инфекционные структуры, образующие трихотецены, у *F. graminearum* (Boenisch, Schäfer, 2011). Среди токсинов, образуемых представителями рода *Fusarium*, – боверицин, фумонизин, монилиформин и другие соединения (Desjardins et al., 2000).

Многие представители фузариев являются фитопатогенами, вызывают увядание растений и корневые гнили. Известно, что кутиназа (Kang, Buchenauer, 2000a; Kang et al., 2005), пектиназы, целлюлозолитические ферменты, ксиланазы (Kang, Buchenauer, 2000a,b; Wanyoike et al., 2002; Kang et al., 2005), эндоглюканызы и липазы (Jenczmionka, Schäfer, 2005) играют важную роль в проникновении патогена в ткани растения. Значение пептидаз у этих грибов, как и у представителей других таксонов, в поражении растений рассматривается редко, недостаточно сведений об особенностях этих протеаз (Jenczmionka, Schäfer, 2005). Вместе с тем некоторые авторы полагают, что эти ферменты также необходимы для успешного инфицирования и колонизации растений-хозяев (Pekkarinen et al., 2000; Olivieri et al. 2002).

Среди идентифицированных и изученных пептидаз *Fusarium* можно отметить очищенную и охарактеризованную сериновую пептидазу, образуемую фитопатогенным грибом *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* (Olivieri et al., 2002). N-Концевая аминокислотная последовательность полипептида обнаружила высокое сходство с грибной сериновой пептидазой субтилизинового семейства.

Очищена также трипсин-подобная протеиназа штамма *F. culmorum*, культивируемого в глютен-содержащей среде (Pekkarinen, Jones, 2002). Наибольшая активность фермента наблюдалась при pH 9 и температуре 45 °C, но при этих условиях он не был стабильным. Стабильность фермента увеличивалась при добавлении ионов кальция и белков. Наиболее стабильна пептидаза была при pH 6 – 7 при комнатной температуре, но быстро инактивировалась при температуре 50 °C. Сходство N-концевой аминокислотной последовательности фермента с трипсин-подобным ферментом *F. oxysporum* составляло 88 %. По мнению авторов исследования, эта пептидаза, вероятно, помогает грибу колонизировать злаковые культуры.

В другом исследовании показано, что штаммы *F. culmorum*, *F. graminearum* и *F. roae* способны образовывать нейтральные и щелочные пептидазы при росте в среде, содержащей пшеничный глютен (Pekkarinen et al., 2000). Выявлено, что *F. roae* секретировал также кислую пептидазу в данных условиях.

Транскриптомный анализ *F. graminearum* выявил пептидазы с высокой и низкой экспрессией (Lowe et al., 2015). В пределах образуемых ими групп обнаружены гены пептидаз, регулируемые условиями роста, такими как репрессия в процессе роста *in planta*, и индуцируемые при биосинтезе микотоксинов. Кластер пептидаз P1 в целом характеризовался низкой экспрессией; кластеру P2 была свойственна более высокая экспрессия в течение инфекции растений; кластер P3 содержал пептидазы со средне-низкой экспрессией. У кластеров P4 и P5 была высокая экспрессия. Экспрессия в кластере P6 в целом была низкая в процессе роста *in planta*, а в кластере P7 – высокая как *in vitro*, так и *in planta*.

Сериновые пептидазы были представлены в кластере P3 и в меньшей степени в кластерах P1 и P2 (Lowe et al., 2015). Цистеиновые пептидазы содержались в кластерах P6 и P7, тогда как металло- и треониновые пептидазы – в кластере P5. Аспаратные пептидазы были найдены в самом маленьком кластере P4. Сериновые пептидазы экспрессировались наиболее часто на низком и среднем уровнях, тогда как аспаратные пептидазы транскрибировались конститутивно на высоком уровне.

Актуальным остается вопрос о зависимости протеолитической активности видов рода *Fusarium* от факторов окружающей среды.

1.2.10.4. Внеклеточные пептидазы видов рода *Trichoderma*

Микромицеты из рода *Trichoderma* – распространенные почвенные сапротрофы, характеризующиеся минимальными питательными потребностями, а также способностью к быстрому росту на различных субстратах и образованию широкого спектра вторичных метаболитов. Эти признаки обеспечивают им конкурентное преимущество перед другими организмами при занятии экологической ниши (Kubicek, Harman, 2002). Среди видов рода *Trichoderma* – широко известные гиперпродуценты ферментов деградации органических материалов (как природного, так и ксенобиотического происхождения), в том числе хитиназ, участвующих в лизисе мицелия, а также целлюлаз. Вследствие этого эти микромицеты используют в качестве биоконтрольных агентов и стимуляторов роста растений, а также в качестве подавляющих грибов агентов в пищевой промышленности. Известны периодические сообщения об инфекциях, вызываемых родом *Trichoderma* (Sandoval-Denis et al., 2014). В целом, несмотря на их широкое распространение и общее значение, относительно слабо изученным остается вопрос о связи между образованием ферментов и экологическими особенностями рода.

Внеклеточные пептидазы *Trichoderma* spp. могут играть значительную роль в лизисе клеточных стенок фитопатогенных грибов, так как хитин и/или

фибриллы β -глюкана (которые являются компонентами клеточных стенок грибов) погружены в белковый матрикс (Markovich, Kononova, 2003). Исследовано, что фермент Prb1 – щелочная сериновая пептидаза с молекулярной массой 31 кДа (pI 9,2) – синтезируется как препрофермент. Показано, что сериновую пептидазу с такой же молекулярной массой секретируют *T. harzianum* штамм 101645, патоген насекомых, и штамм 206040, патоген фитопатогенных грибов, используемый для биологического контроля (Shakeri, Foster, 2007).

У другого штамма *T. harzianum* – СЕСТ 2413 – идентифицирована аспаратная пептидаза (P6281: молекулярная масса 33 кДа, pI 4.3), индуцируемая в присутствии грибных клеточных стенок (Suárez et al., 2005). Авторы предполагают вовлечение этой пептидазы в микопаразитическую активность гриба.

Аспаратная протеиназа была идентифицирована также у *T. asperellum* (Viterbo et al., 2004). В этом случае она секретировалась в среде совместных культур растение – *Trichoderma*. Идентифицирован ген, кодирующий фермент.

Показано, что *T. reesei* – активный продуцент 4-х аспаратных пептидаз: PEP1 (42,7 кДа), PEP2 (42,4 кДа), PEP3 (49 кДа) и PEP5 (45 кДа) (Landowski et al., 2015). Эти пептидазы проявили 51 – 64 % степени сходства в аминокислотной последовательности.

Следует отметить, что хотя способность штаммов рода *Trichoderma* продуцировать пептидазы известна давно, при этом их протеолитические системы остаются относительно слабо изученными.

1.3. Ингибиторы пептидаз

Пептидазы выполняют необходимые метаболические и регуляторные функции во многих биологических процессах, поэтому необходима тонкая регуляция их активности. Подавление активности пептидаз ингибиторами – очень важный механизм ее регуляции (Lopez-Otin, Bond, 2008; Rawlings et al., 2010). В качестве ингибиторов пептидаз могут выступать низкомолекулярные соединения, а также белки. Они могут быть классифицированы согласно их источнику (микробные, грибные, растительные, животного происхождения), структуре (первичной, трехмерной), ингибиторному профилю (широкого действия, специфичные) и механизму реакции (конкурентные, неконкурентные, обратимые, необратимые) (Rawlings et al., 2004; Christeller, 2005; Rawlings, 2010).

Чувствительность к ингибиторам является одним из характерных свойств пептидаз, позволяющим установить их принадлежность к определенному классу (dos Santos, 2011). Ингибиторы пептидаз блокируют

каталитический центр протеолитических ферментов, что препятствует формированию фермент-субстратного комплекса. При конкурентном ингибировании ингибитор связывается с активным центром фермента, делая невозможными фермент-субстратные взаимодействия. При неконкурентном ингибировании ингибитор связывается с аллостерическим центром фермента, что приводит к изменению активного центра, становящегося недоступным для субстрата.

Ингибиторы пептидаз могут быть разделены на два функциональных класса в зависимости от характера воздействия на чувствительные к ним протеазы: обратимые и необратимые (dos Santos, 2011). На основе структурных различий ингибиторы пептидаз классифицируют на такие группы, как низкомолекулярные пептидомиметические и белковые ингибиторы.

К первой группе относится ингибитор сериновых пептидаз фенилметилсульфонилфторид (PMSF), который связывается с ними ковалентно, подобно суицидному субстрату (Биссвангер, 2013). Он плохо растворим в воде. В водных растворах PMSF быстро разлагается (время полураспада около 30 мин). Необратимой инактивации подвергается лишь та часть молекул пептидаз, которые прореагировали немедленно, остальные остаются активными, поэтому реагент необходимо вносить снова.

Некоторые вещества действуют на пептидазы различных типов, например, α_2 -макроглобулин (Биссвангер, 2013). Лейпептин (0,5 мкг/мл), TLCK (L-1-хлор-3-(4-тозиламидо)-4-фенил-2-бутанон, 0,1 мг/мл) действуют как против сериновых, так и против цистеиновых пептидаз.

К бактериальным ингибиторам пептидаз относят лейпептин, проявляющий активность широкого спектра действия по отношению к сериновым и цистеиновым протеазам, включая плазмин, трипсин, папаин, кальпаин, клострипаин и катепсин В. Это соединение, впервые выделенное из *S. exfoliates*, образуют почвенные стрептомицеты, относящиеся к более чем 11 видам, что указывает на широкую распространенность генов, ответственных за биосинтез лейпептина, среди различных представителей рода *Streptomyces* (Umezawa, 1982; Kantlyka et al., 2010). Способность штаммов образовывать лейпептин передается при конъюгации, что предполагает плазмидную локализацию таких генов (Umezawa, 1982).

К ингибиторам цистеиновых пептидаз относятся E-64 (N-[N-(L-3-*транс*-карбоксихлорид-2-карбонил)-L-лейцил]агматин, 0,01 мг/мл) или ингибитор кальпаина I (N-ацетил-Leu-Leu-норлейцинал, 0,01 мг/мл) (Биссвангер, 2013).

Пепстатин А – ингибитор аспартатных пептидаз, проявляющий антимикробные свойства по отношению к *Candida albicans*; показано, что ингибитор подавляет пролиферацию и адгезию клеток к абиотическим и биотическим структурам (dos Santos, 2011). Продуцентами пепстатинов являются виды рода *Streptomyces*: *S. testaceus*, *S. naniwaensis* (Umezawa, 1982).

Фосфорамидон, продуцируемый *S. tanashiensis*, подавляет активность металлопротеаз. Установлено, что к этому ингибитору чувствительны термолизин, металлопротеиназы *B. subtilis* и *S. griseus*, а также эластаза *P. aeruginosa* (Umezawa, 1982).

Действие металлопротеиназ эффективно подавляется и в присутствии комплексообразователей, таких как ЭДТА (этилендиаминтетраацетат, 1 мМ) или о-фенантролин (Биссвангер, 2013). Однако эти вещества инактивируют и все металлозависимые ферменты.

Многие эндогенные ингибиторы протеиназ имеют белковую природу (Vode, Huber, 1992). Количество выделенных и охарактеризованных белковых ингибиторов протеиназ огромно. Большая часть таких ингибиторов обладает активностью по отношению к сериновым протеиназам; белковые ингибиторы металлопротеиназ и аспартатных протеиназ гораздо меньше изучены.

Группу «канонических» ингибиторов сериновых протеиназ составляют относительно небольшие белки, состоящие из 29 – 190 аминокислотных остатков. К другим ингибиторам сериновых протеиназ относят серпины (serpins, serine proteinase inhibitors), представляющих группу гомологичных, крупных (глико-)протеинов, в состав которых входит более 400 остатков аминокислот.

У многих растений обнаружены белки, действующие преимущественно как ингибиторы протеиназ микроорганизмов (Валуева, Мосолов, 2002). Отмечено, что некоторые из этих белков, кроме действия на ферменты микроорганизмов, способны ингибировать также химотрипсин, другие не активны по отношению к протеиназам животного происхождения. Показано, что ингибиторы протеиназ фитопатогенных микроорганизмов, выделенные из различных растительных источников (семена фасоли, плоды тыквы, каштана), способны подавлять активность протеиназ следующих групп: сериновых (гриба *Colletotrichum lindemuthianum*), аспартатных (гриба *Glomerella cingulata*) и цистеиновых протеиназ (гриба *Botrytis cinerea*).

1.3.1. Грибные ингибиторы пептидаз

По меньшей мере некоторые представители грибов секретируют ингибиторы пептидаз – важные элементы регуляции их ферментативной

активности. Функции грибных ингибиторов пептидаз до конца не определены; возможно, они участвуют в подавлении активности растительных пептидаз, секретируемых при ответной реакции растений на атаку патогенами при фитопатогенезе, или защите пищевых ресурсов от конкурирующих организмов (Dunaevsky et al., 2014). Содержащиеся в литературе данные о грибных ингибиторах пептидаз относительно немногочисленны.

К наиболее охарактеризованным ингибиторам пептидаз относятся ингибиторы из *Saccharomyces cerevisiae* и *S. carlsbergensis* (Wolf, 1980; Wolf, Holzer, 1980). Ингибиторы специфичны к аспартатной протеиназе А, сериновой протеиназе В и карбоксипептидазе Y и связывают ферменты, формируя комплексы 1:1. Показано (Beck et al., 1980), что протеиназа А и ее ингибитор – две независимо синтезируемые полипептидные цепи. Открыты две формы (изоингибиторы) обоих ингибиторов протеиназ А (I^A) и В (I^B). Ингибиторы I^A и I^B – маленькие белки, кислото- и термостабильные. Семейство ингибиторов I9 из *S. cerevisiae* содержит ингибиторы сериновых пептидаз субтилизинового семейства (S8) (MEROPS).

Известно, что эпоксидный ингибитор цистеиновых пептидаз E-64 (L-транс-эпоксисукцинил-лейциламид-(4-гуанидино)бутан) был впервые выделен из *Aspergillus japonicus* (Asgian et al., 2002).

Из ферментационной среды культуры *Penicillium griseofulvum* Mer-0442 (SCF-1704) выделен ингибитор пептидазы вируса гепатита С (Chu et al., 1999). Этот грибной метаболит представляет собой бициклический лактон. Продуцент ингибитора был выделен из образца почвы пустыни в штате Аризона, США.

Показано, что у биотрофного фитопатогена *Cladosporium fulvum* один из секретируемых эффекторных белков Avr2 является истинным фактором вирулентности, взаимодействующим с Cys пептидазой Rcr3 из томата, вовлеченной в основную защиту растения (van Esse et al., 2008).

Белковый ингибитор цистеиновых пептидаз был также выделен из дерматофитного вида *Trichophyton mentagrophytes* (Bajuk et al., 2011). Показано, что этот ингибитор находится в высоко- (24 кДа) и низкомолекулярной (12 кДа) формах. Авторами найдено, что ингибитор подавляет активности папаина, катепсинов В и L, но не катепсина Н или трипсина. Однако физиологическая мишень данного ингибитора пока не найдена. Предполагается, что, кроме регуляторной роли в эндогенном протеолизе гриба, функция ингибитора заключается в защите против клеток иммунной системы организма-хозяина.

Кроме ингибиторов цистеиновых пептидаз, для некоторых видов мицелиальных грибов характерны также секретируемые ингибиторы сериновых пептидаз. Так, показано, что 6 из 13 штаммов *Aspergillus fumigates*, а также 2 штамма *A. flavus* способны образовывать внеклеточные ингибиторы эластазы (Okumura et al., 2004). Ингибиторы эластазы оставались активными при нагревании при 100° С в течение 10 мин. По мнению исследователей, ингибиторная активность грибов участвует в подавлении иммунной системы организма. Вероятно, ингибиторы эластазы обладают резистентностью к защитной системе организма и могут участвовать в развитии микоза.

Таким образом, ингибиторы пептидаз играют важную роль в регуляции протеолитической активности, а их изучение важно для создания диагностических и терапевтических средств лечения болезней, связанных с изменением активности протеолитических ферментов.

В целом, многими исследователями сделаны попытки идентифицировать детерминанты патогенности у мицелиальных грибов – индивидуальные гены, необходимые для того, чтобы успешно атаковать растение-хозяина, но несущественные для сапротрофного роста грибов. Также изучены продукты этих генов, хотя комплексное исследование их свойств, а также роли в фитопатогенезе еще не проводилось. Определено, что идентифицированные факторы патогенности вовлечены в функции, ассоциированные с инфекцией растения-хозяина, такие как расщепление растительной клеточной стенки, биосинтез вторичных метаболитов и защита от ответных реакций растения на действия патогенов. По-видимому, важную, но пока не доказанную роль играют при этом и секретируемые грибами пептидазы, которые являются частью гидролитического комплекса грибов-фитопатогенов.

Как показал анализ литературных данных, нехватка сведений о разнообразии и свойствах секретируемых грибных пептидаз – довольно актуальная проблема при определении потенциала мицелиальных микромицетов расщеплять белки и белковые компоненты субстратов. Эта проблема накладывает свой отпечаток на состояние как современной биотехнологии, так и промышленного производства лекарств, все еще требующее высокие затраты на выпуск необходимых ферментных препаратов. И несмотря на то, что в последнее время прослеживается тенденция к поиску новых перспективных продуцентов протеолитических ферментов среди грибов, их спектр, свойства и зависимость секреции пептидаз от факторов окружающей среды исследуются редко.

2. Материалы и методы

2.1. Штаммы микромицетов и условия их хранения

В работе были использованы 38 штаммов микромицетов из родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Trichoderma*, полученных из коллекций ВИЗРа, кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и ВКПМ (таблица 2).

Таблица 2. Список грибов, использованных в работе

№	Вид микромицета	Штамм	Место хранения
1	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	2п	коллекция кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.
2	<i>Alternaria kulundii</i> Bilanen-ko, Georgieva, Grum-Grzhim.	M309	коллекция кафедры микологии и альгологии
3		M310	коллекция кафедры микологии и альгологии
4	<i>Alternaria linariae</i> (Neerg.) E.G.Simmons (= <i>Alternaria tomatophila</i> E.G.Simmons)	MF-P580-141	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
5		MF-P641-011	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
6		MF-P645-011	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
7		MF-P649-011	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
8		MF-P658-021	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
9		MF-P680-021	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
10	<i>Alternaria</i> sp.		коллекция кафедры микологии и альгологии
11	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	3-L 12pnR	коллекция кафедры микологии и альгологии
12	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.		коллекция кафедры микологии и альгологии
13	<i>Fusarium anguioides</i> Sherb.	MFG 111502	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
14		MFG 108802	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
15		MFG 103100	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)

16		MFG 119913	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
17	<i>Fusarium chlamydosporum</i> Wollenw., <i>Reinking</i> (= <i>Fusarium fusarioides</i> (Gonz. Frag et Cif.) C.Booth)		Коллекция кафедры микологии и альгологии
18	<i>Fusarium langsethiae</i> Torp et Nirenberg	MFG 191500	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
19		MFG 160710	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
20	<i>F. oxysporum</i> Schltldl.	F137	коллекция кафедры микологии и альгологииК
21	<i>F. poae</i> (Peck) Wollenw.	MFG 103403	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
22		MFG 11046	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
23		MFG 200610	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
24	<i>Fusarium roseum</i> Link (=F. <i>roseum</i> Fuckel)	F-900	ВКПМ, Москва
25	<i>F. sibiricum</i> Gagkaeva, Burkin, Kononenko, Gavrilova, O'Donnell, T.Aoki et Yli-Mattila	MFG 11014	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
26		MFG 11005	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
27		MFG 200303	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
28	<i>F. sporotrichioides</i> Sherb.	MFG 11018	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
29		MFG 11039	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
30		MFG 163101	Коллекция ВИЗР (Санкт-Петербург)
31	Pleosporaceae sp.	M303	Коллекция кафедры микологии и альгологии
32		M305	Коллекция кафедры микологии и альгологии
33		M311	Коллекция кафедры микологии и альгологии
34	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. et Nirenberg	Mg-6	Коллекция кафедры микологии и альгологии
35		K-1	Коллекция кафедры

			микологии и альгологии
36	<i>Trichoderma</i> sp.	штамм 1	Коллекция кафедры микологии и альгологии
37		штамм 2	Коллекция кафедры микологии и альгологии
38		C16-05	Коллекция кафедры микологии и альгологии

Эти микромицеты относились к различным эколого-трофическим группам (таблица 3). Штаммы *F. anguioides* были выделены из зерна (таблица 4).

Таблица 3. Эколого-трофические группы некоторых использованных в работе микромицетов

№	Микромицет	Эколого-трофическая группа
1	<i>Alternaria</i> sp.	Сапротроф/факультативный фитопатоген
2	<i>A. alternata</i>	Сапротроф (преимущественно)/ факультативный фитопатоген/оппортунистический патоген человека
3	<i>A. linariae</i>	Факультативный фитопатоген
4	<i>Aspergillus terreus</i>	Сапротроф
5	<i>Botrytis cinerea</i>	Факультативный фитопатоген (некротроф)
6	<i>Fusarium anguioides</i>	Факультативный фитопатоген
7	<i>F. chlamydosporum</i>	Сапротроф/ оппортунистический патоген человека
8	<i>F. langsethiae</i>	Факультативный фитопатоген
9	<i>F. poae</i>	Факультативный фитопатоген
10	<i>F. sibiricum</i>	Факультативный фитопатоген
11	<i>F. sporotrichioides</i>	Факультативный фитопатоген
12	<i>F. oxysporum</i>	Факультативный фитопатоген
13	<i>F. roseum</i>	Факультативный фитопатоген

14	<i>Trichoderma</i> sp.	Сапротроф
15	<i>T. asperellum</i>	Сапротроф/микопаразит

Таблица 4. Штаммы *F. anguioides*, использованные в работе

№ кол. MFG	Происхождение	Растение	Субстрат	Год
103100	Калининградская обл.	овес	зерно	2007
108802	Псковская обл.	ячмень	зерно	2008
111502	Вологодская обл.	ячмень	зерно	2008
119913	Кировская обл.	овес	зерно	2008

Культуры хранили на стандартной агаризованной среде Чапека, содержащей (в г/л) сахарозу – 30,0, NaNO₃ – 2,0, K₂HPO₄ – 1,0, KCl – 0,5, MgSO₄·7H₂O – 0,5, FeSO₄·7H₂O – 0,01 и агар – 15,0 при 4° С.

Инокулятом служила споровая суспензия, полученная путем смыва дистиллированной водой спор с поверхности 7 – 14 суточных культур, выращенных на среде Чапека при 25° С. Штаммы *F. anguioides*, как и многие штаммы других видов, использованные в работе, при выращивании на твердой среде Чапека образовывали колонии, различающиеся по морфологии (рис. 1).

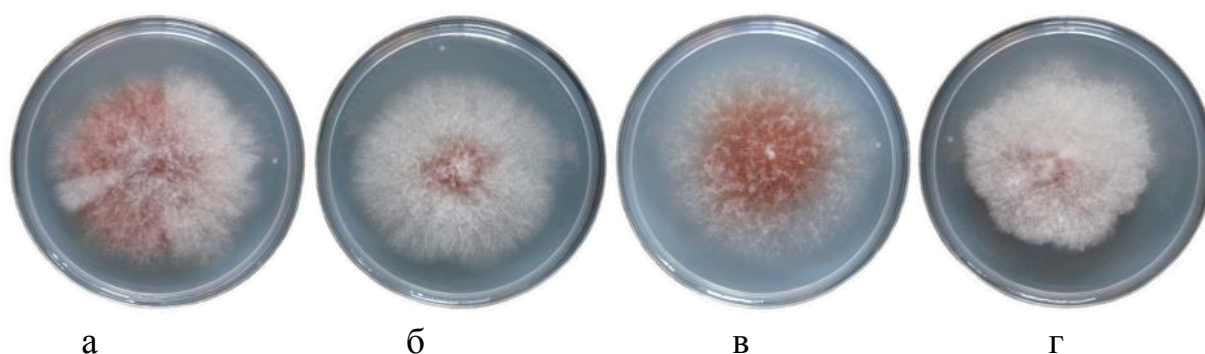


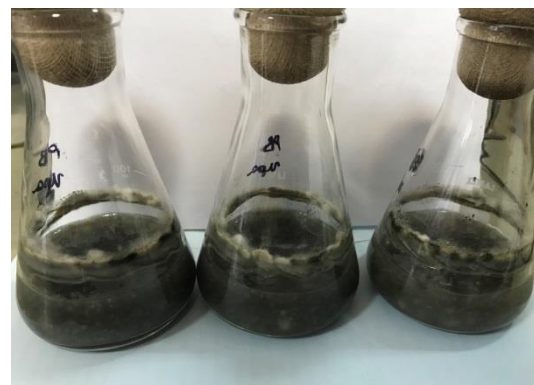
Рис. 1. Рост культур штаммов *F. anguioides* на агаризованной среде Чапека в течение 7 суток: **а** – MFG 111502, **б** – MFG 108802, **в** – MFG 103100, **г** – MFG 119913.

2.2. Получение жидких культур микромицетов.

В настоящей работе в качестве источника азота и индуктора секреции пептидаз был использован белок казеин, выбор которого обусловлен достижением в его присутствии значительной протеолитической активности грибов в жидкой среде (Dunaevskii et al., 2006; Shakeri, Foster, 2007). Для изучения протеолитической активности штаммы культивировали в жидкой среде Чапека, в которой NaNO_3 заменен на казеин (1%), добавляемый в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4. Секрецию и активность пептидаз *F. roseum* (= *F. sambucinum*) штамма ВКПМ F-900 исследовали также при росте на стандартной среде Чапека и среде Чапека без NaNO_3 , содержащей клеточные стенки растения *Vigna radiata* (3%). Культивирование проводили в качалочных колбах на 100 мл (180 об./мин) при 22° С в течение 7 суток, при исследовании динамики протеолитической секреции – в течение 2 – 20 суток на шейкере модели Excella E24R New Brunswick Scientific Edison, New Jersey, USA. Общий объем питательной среды составлял 50 мл, споровую суспензию вносили в объеме 2 мл.

Культуральную жидкость отделяли фильтрованием с последующим центрифугированием фильтрата при 12000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге модели 5415С. Для предотвращения контаминации в бесклеточный супернатант добавляли 0,02% NaN_3 и хранили при -20°С. Биомассу мицелия определяли взвешиванием после высушивания при +80° С до постоянного веса.

При постановке эксперимента по установлению влияния постоянного значения рН среды (рН 7,0) на секрецию пептидаз в жидких культурах *B. cinerea* использовали среду Чапека с 1% казеина, приготовленную не на основе дистиллированной воды, как описано выше, а на основе 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,0 (рисунок 2).



а.

б.

Рис. 2. Культуры *V. cinerea*, выросшие на модифицированной среде Чапека (на дистиллированной воде – **а** и на 0,1 М фосфатном буфере – **б**) с 1% казеина

Такие культуры развивались с некоторой задержкой роста, но на 10-е сутки роста характеризовались высоким уровнем биомассы, сопоставимым с уровнем биомассы культур, выросших на среде с дистиллированной водой (рис. 2).

2.3. Получение клеточных стенок растения *Vigna radiata*.

Клеточные стенки получали по методике д.б.н. Н.Р. Мейчик (Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия). Пигменты из листовых пластинок *V. radiata* удаляли промывкой 70% ацетоном. Затем растительный материал промывали водой, обрабатывали 1% NaOH, после чего промывали водой, обрабатывали 1% HCl и вновь промывали водой. Полученный сырой препарат клеточных стенок в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4, использовали в качестве единственного источника азота в жидкой среде Чапека.

2.4. Определение протеолитической активности.

Общую протеолитическую активность культуральной жидкости грибов определяли по азоказеину. К 100 мкл буфера (0,02 М цитратно-фосфатного, рН 4,0, или 0,1 М фосфатного, рН 7,0, или 0,1 М Трис-HCl, рН 9,0) добавляли 50 мкл культуральной жидкости и 150 мкл водного раствора азоказеина (0,5%), затем инкубировали в течение 3 – 5 ч при +37° С. Значения рН в реакционных растворах устанавливались, соответственно, на уровне 6,0, 7,0 и 8,0.

Для штаммов *F. anguioides* протеолитическая активность была определена и при рН 5,0 и 9,0. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10% трихлоруксусной кислоты, после чего раствор выдерживали 30 мин при +4° С. Осадок из раствора отделяли центрифугированием при 12000 об./мин в

течение 15 мин. Из проб отбирали по 400 мкл супернатанта и добавляли к 400 мкл свежеприготовленного раствора 0,5 М NaOH. Поглощение раствора измеряли спектрофотометрически при 440 нм на спектрофотометре Thermo Spectronic Genesys 10 uv Scanning. Реакции в контрольных вариантах останавливали 10% трихлоруксусной кислотой непосредственно после добавления раствора азоказеина. За единицу протеолитической активности принимали количество ферментов в культуральной жидкости, вызывающее увеличение оптической плотности раствора на 0,1 оптических единиц за 1 мин гидролиза азоказеина в указанных условиях. Активность была выражена в единицах активности на сухой вес мицелия.

Класс-специфическую протеолитическую активность определяли по гидролизу синтетических хромогенных субстратов. BApNA (N α -benzoyl-L-Arg-pNA) (в концентрации 20 мМ) использовали для измерения трипсин-подобной, GlpAALpNA (Glp-Ala-Ala-Leu-pNA) (20 мМ) – субтилизин-подобной, GlpFpNA (Glp-Phe-pNA) (10 мМ) – химотрипсин-подобной активности и GlpFApNA (Glp-Phe-Ala-pNA) (20 мМ) – активности цистеиновых пептидаз. Аминопептидазную активность определяли с L-pNA (L-Leu-pNA) (40 мМ) и F-pNA (L-Phe-pNA) (35 мМ). К 185 мкл 0,01 М фосфатного буфера, рН 6,9, добавляли 10 мкл культуральной жидкости и 5 мкл разведенного в 5 раз раствора субстрата (в N,N-диметилформамиде). Для измерения активности цистеиновых пептидаз культуральную жидкость предварительно инкубировали с раствором дитиотрейтола (в концентрации 4 мМ в реакционной смеси) при комнатной температуре в течение 10 мин. Реакцию проводили при +37° С в течение 4 – 5 ч. Поглощение раствора измеряли на ридере ELx808 BioTek. За единицу энзиматической активности принимали количество фермента в культуральной жидкости, вызывающее увеличение оптической плотности раствора на 0,01 оптических единиц при 405 нм за 1 мин при гидролизе субстратов при +37° С. Активность была выражена в единицах активности на сухой вес мицелия.

2.5. Ингибиторный анализ.

Влияние PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) (ингибитора сериновых пептидаз) на общую активность внеклеточных пептидаз штаммов было исследовано при инкубировании 50 мкл культуральной жидкости штаммов с 0,2 или 1 мМ PMSF (в 50% этаноле) в течение 20 мин при комнатной температуре. Также использовали 0,5 мМ раствор TLCK (1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone HCl) (ингибитора трипсина) в дистиллированной воде. При оценке действия пепстатина (ингибитора аспартатных пептидаз) использовали 0,01 мМ раствор ингибитора (в 0,02 М

цитратно-фосфатном буфере, рН 4,0), EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate) (ингибитора металлопротеаз) – 10 мМ (в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,0), 1,10-фенантролина (ингибитора металлопротеаз) – 0,1 мМ (в 50% этаноле), E-64 (L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane) (ингибитора цистеиновых пептидаз) – 0,01 мМ раствор ингибитора (в 50% этаноле). Для активации возможных цистеиновых пептидаз в КЖ использовали 6,5 мМ DTT (dithiothreitol) (в дистиллированной воде). К смеси КЖ с ингибитором (активатором) добавляли соответствующий буфер и раствор азоказеина и реакцию проводили так, как описано выше по методу определения общей протеолитической активности по азоказеину. В контрольных вариантах вместо растворов с ингибитором или DTT добавляли соответствующий растворитель. Определяли остаточную активность пептидаз в процентах от контроля.

2.6. Гель-фильтрация пептидаз.

Диализованную культуральную жидкость наносили на колонку FPLC Superose 200 (30x1 см), уравновешенную 0,01 М раствором фосфатного буфера, рН 6,9 (содержащим 0,02% NaN_3). Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 0,5 мл/мин, фракции собирали по 1 мл. Определяли активность фракций по BAPNA (трипсин-подобную), GlpAALpNA (субтилизин-подобную), L-pNA (лейцинаминопептидазную) и F-pNA (фенилаланинаминопептидазную активность). Использовали объем выхода соответствующей активности и калибровочную кривую для определения молекулярных масс исследуемых пептидаз.

2.7. Ионообменная хроматография пептидаз.

Диализованную культуральную жидкость наносили на колонку Mono Q, уравновешенную 0,01 М раствором фосфатного буфера, рН 6,9 (содержащим 0,02% NaN_3), и проводили хроматографию при скорости 1 мл/мин с использованием следующих буферных растворов: 0,01 М раствора фосфатного буфера, рН 6,9 и 0,01 М раствора фосфатного буфера с 1М NaCl , рН 6,9. Белковые фракции элюировали линейным градиентом NaCl . Определяли активность фракций по BAPNA (трипсин-подобную), GlpAALpNA (субтилизин-подобную) и F-pNA (фенилаланинаминопептидазную активность).

2.8. Влияние пониженных концентраций кислорода на образование пептидаз.

Сырой мицелий 8-суточной культуры *A. terreus* 3-L 12pnR или 6-суточной культуры *Fusarium roseum* (= *F. sambucinum*) ВКПМ F-900, выросших на жидкой стандартной среде Чапека, вносились во флаконы с 40 мл жидкой модифицированной добавлением 1 % казеина среды Чапека (без NaNO_3). Воздушная фаза над средой во флаконах была частично (за 1 – 7 мин) или полностью (за 10 мин) вытеснена аргоном. Контрольные варианты содержали воздух во флаконах. После посева флаконы инкубировали в термостате при 27°C в течение 3 суток. Далее определение протеолитической активности культур проводили так, как описано выше.

2.9. Определение внеклеточных меланинов.

Внеклеточные пигменты штаммов вида *A. linariae* были отнесены к группе меланинов по физико-химическим свойствам (Babitskaya et al., 2000). Щелочные растворы КЖ были окислены и обесцвечены 3%-ным раствором H_2O_2 . После обработки щелочных растворов КЖ 16,0 – 19,5 мМ/г KMnO_4 происходило изменение цвета КЖ, которая приобретала зеленый оттенок, затем обесцвечивалась, и далее образовывался осадок. Экстракции из мицелия не проводили, а меланины определяли в КЖ. Интенсивность образования внеклеточных меланинов штаммов была определена спектрофотометрически по поглощению раствора (культуральной жидкости) при длине волны 459 нм (Babitskaya et al., 2000). Концентрацию меланинов определяли по калибровочному графику, отражающему зависимость оптической плотности раствора от содержания в нем коммерческого препарата меланина.

2.10. Определение ингибиторной активности.

Был проведен скрининг внеклеточных ингибиторов папаина, бромелаина, трипсина, химотрипсина и субтилизина среди некоторых штаммов грибов. Коммерческий препарат трипсина (0,1 мг/мл) был растворен в 0,001 М растворе HCl ; субтилизина (0,2 мг/мл), химотрипсина (1,8 мг/мл), папаина (5 мг/мл) или бромелаина (5 мг/мл) – в 0,01 М фосфатном буфере, рН 6,9. 50 мкл культуральной жидкости были проинкубированы с 5 мкл раствора каждого из ферментов и 8 мкл 0,01 М фосфатного буфера, рН 6,9, при комнатной температуре в течение 30 мин. Папаин и бромелаин были активированы дитиотрейтолом (в конечной концентрации 4 мМ) при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем были добавлены 132 мкл 0,01 М фосфатного буфера, рН 6,9, и 5 мкл раствора

соответствующего хромогенного субстрата. Полученная реакционная смесь была проинкубирована в течение 30 мин при +37°C в 96-луночном микротитровальном планшете. Поглощение было измерено при 405 нм на ридере ELx808 BioTek.

В контроле учитывалась собственная протеолитическая активность штаммов. Активность растворов ферментов без культуральной жидкости (с дистиллированной водой вместо нее) или проинкубированных с питательной средой вместо культуральной жидкости была принята за 100%. Ингибиторная активность была выражена в процентах ингибирования.

Все эксперименты были проведены в трехкратной повторности.

3. Результаты и их обсуждение

Как представители различных экологических групп, мицелиальные грибы адаптированы к существованию в определенных условиях окружающей среды. Адаптация обусловлена синтезом и секрецией специфических веществ, в том числе ферментов, среди которых пептидазы наделены важнейшими функциями.

Образование грибами пептидаз зависит от многих факторов. Чтобы выявить их и понять, как эти факторы влияют на продукцию пептидаз и какие классы пептидаз секретируют исследованные в работе мицелиальные грибы, был проведен анализ протеолитической активности представителей различных родов грибов, относящихся к различным эколого-трофическим группам, при изменяющихся условиях внешней среды и с применением соответствующих ингибиторов пептидаз.

3.1. Сравнение общей внеклеточной протеолитической активности и вклада в нее различных групп секретируемых пептидаз у разных штаммов мицелиальных грибов

Проведенные исследования показали, что одной из доминирующих групп протеолитических ферментов грибов, определяемых при нейтрально-щелочных значениях рН, могут быть сериновые пептидазы, а при кислых значениях рН – аспаргатные пептидазы. Существенным фактором, определяющим их секрецию, является возраст культуры (или фаза роста). Как видно из рисунка 3, на 4-ые сутки развития (экспоненциальная фаза роста) культура *B. cinerea* секретирует в среду в основном сериновые пептидазы (82,8 %), среди которых не обнаруживалась активность трипсин-подобных ферментов. В этот период роста культуры практически не выявляются и аспаргатные пептидазы. На 10-ые сутки (стационарная фаза роста культуры) активность сериновых пептидаз несколько уменьшается, составляя 56,4 %, в то же время наблюдается появление среди них активности трипсин-подобных пептидаз (27,2 %). В этот же период выявляются и внеклеточные аспаргатные пептидазы (47,7 %).

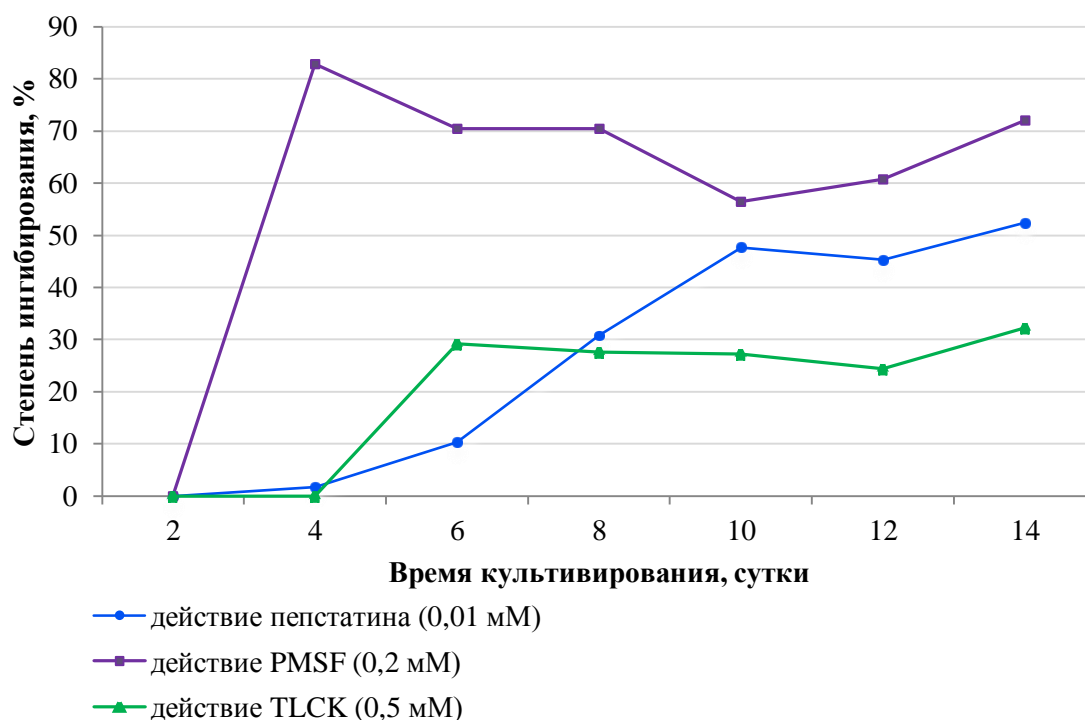


Рис. 3. Влияние некоторых ингибиторов на общую протеолитическую активность *B. cinerea* при культивировании в жидкой среде

Таким образом, наибольшая активность сериновых пептидаз отмечена на 4-е сутки роста культуры, аспаргатных пептидаз – к концу периода культивирования (10 – 14-е сутки). В этот период отмечено уменьшение биомассы, что, по-видимому, происходит из-за лизиса клеток гриба. Следует отметить возможность высвобождения некоторого количества внутриклеточных ферментов на этом этапе культивирования.

Другим важным фактором, способным влиять на секрецию и активность пептидаз, является pH среды культивирования. Для многих грибов (в том числе *B. cinerea*) характерна ацидификация среды роста, обусловленная образованием органических кислот. Найденная нами секреция аспаргатных пептидаз соотносится с изменением значений pH культуральной жидкости в ходе культивирования *B. cinerea*: на 6-е сутки роста культуры, когда значение pH снижается до 5,0 по сравнению с исходным значением 7,1, вклад аспаргатных пептидаз уже соответствует приблизительно 10 %. При этом исследованный штамм находится в конце экспоненциальной фазы роста. По мере понижения pH в культуральной среде происходит увеличение активности аспаргатных пептидаз.

Как видно из таблицы 5, на протяжении всего периода культивирования вклад других групп пептидаз (металлопротеиназ или

цистеиновых пептидаз) в общую протеолитическую активность исследованного штамма *B. cinerea* не выявляется или очень мал.

Таблица 5. Влияние ингибиторов на общую активность протеаз в КЖ *B. cinerea* при культивировании в жидкой среде

Ингибитор	Концентрация, мМ	рН испытательной среды	Остаточная активность, %	
			4 сут. КЖ	10 сут. КЖ
PMSF	0,2	7,0	17,2	43,6
TLCK	0,5	7,0	100,0	72,8
EDTA	10	7,0	98,3	104,3
Фенантролин	0,1	7,0	95,0	100,0
DTT	6,5	7,0	62,7	64,2
E-64	0,01	7,0	100,0	100,0
Пепстатин	0,01	4,0	98,2	52,3

На примере штаммов *A. linariae*, *F. anguioides* и *Trichoderma* было установлено, является ли их протеолитическая активность видо- или штаммоспецифичной. Согласно результатам ингибиторного анализа, все исследованные штаммы *A. linariae* образовывали пептидазы серинового типа (табл. 6), что может говорить о видоспецифичности этого признака. Однако интенсивность секреции сериновых пептидаз у *A. linariae* зависит от штаммовой принадлежности. Наибольшую активность таких пептидаз проявлял штамм MF-P649-011, агрессивный по отношению к томатам. Ингибиторный анализ с EDTA показал, что, помимо сериновых пептидаз, все исследованные штаммы секретируют и металлопротеиназы. Соотношение активностей сериновых пептидаз и металлопептидаз у большинства штаммов было сходно, при этом вклад металлопептидаз в общую протеолитическую активность у *A. linariae* был заметно меньше, чем сериновых ферментов.

Таблица 6. Влияние PMSF и EDTA на общую активность внеклеточных пептидаз у штаммов *A. linariae*

Ингибитор	Концентрация, мМ	рН буфера	Остаточная активность, %					
			MF-P580-141	MF-P641-011	MF-P645-011	MF-P649-011	MF-P658-021	MF-P680-021
PMSF	1,0	7,0	46,7	54,5	56,3	26,7	55,6	51,6
EDTA	10,0	7,0	80,0	82,2	82,5	87,5	83,0	83,1

Как и у *A. linariae*, общая протеолитическая активность *F. anguioides* главным образом обусловлена вкладом сериновых пептидаз, тогда как другие классы протеолитических ферментов давали минимальный вклад в общую активность. В этом случае уровень активности сериновых пептидаз также зависит от штаммовой принадлежности (таблица 7). Трипсин-подобная активность значительна для данных штаммов и составляет 23,5 – 43,1 % от общей активности пептидаз.

По литературным данным секреция сериновых пептидаз, подавляемых PMSF, характерна и для многих других видов грибов. Так, сериновая пептидаза выявлена и у *Penicillium* sp. при твердофазном культивировании на среде, состоящей из обезжиренных соевых бобов, использовавшихся в качестве источника углерода и азота (Germano et al., 2003). Отмечается, что экспрессия сериновой пептидазы At1 и At1-подобных ферментов, относящихся к группе субтилизин-подобных пептидаз, может быть общей чертой эндофитных грибов (Reddy et al., 1996).

Таблица 7. Влияние PMSF и TLCK на общую активность протеаз в КЖ некоторых штаммов *F. anguioides* при культивировании в жидкой среде

Ингибитор	Концентрация, мМ	рН буфера	Остаточная активность, %			
			MFG 111502	MFG 108802	MFG 103100	MFG 119913
PMSF	1,0	7,0	45,6	30,5	41,9	18,5
TLCK	0,5	7,0	56,9	69,0	60,5	76,5

Если для всех изученных штаммов *Alternaria* и *Fusarium* сериновые пептидазы обеспечивают основной вклад в общую активность, то для некоторых штаммов видов рода *Trichoderma* обнаружена значительная

внеклеточная аспаргатная активность (табл. 8). Ее уровень также зависит от штаммовой принадлежности триходерм. Появление аспаргатных пептидаз у культур штаммов *T. asperellum* Mg-6 и К-1 можно объяснить тем, что, как показано в случае *T. asperellum* Mg-6, в процессе их роста в жидких культурах при наступлении стационарной фазы происходит снижение рН среды (до рН 5,4), вероятно, индуцирующее секрецию аспаргатных пептидаз. При дальнейшем росте подщелачивание среды штаммами вновь возвращает значение рН до близкого к нейтральному (см. п. 3.3.2), но при этом сохраняется и активность индуцированных ранее аспаргатных пептидаз.

Таблица 8. Влияние ингибиторов на общую активность протеаз в КЖ некоторых штаммов видов р. *Trichoderma* при культивировании в жидкой среде

Ингибитор	Концентрация, мМ	рН буфера	Остаточная активность, %				
			<i>Trichoderma</i> sp. (1)	<i>Trichoderma</i> sp. (2)	<i>T. asperellum</i> Mg-6	<i>T. asperellum</i> К-1	<i>Trichoderma</i> sp. С16-05
PMSF	1,0	7,0	52,1	95,3	71,6	72,0	71,6
TLCK	0,5	7,0	66,4	88,8	100	48,8	100
Пепстатин	0,01	4,0	96,0	94,5	37,8	18,1	100

Наименьший уровень протеолитической активности проявил штамм *A. linariae* MF-P645-011, наибольший – *Trichoderma* sp. С16-05. Среди активных продуцентов пептидаз оказались штаммы рода *Fusarium*: *F. anguioides* MFG 108802 и MFG 119913, *F. roseum* ВКПМ F-900. У некоторых мицелиальных грибов (*F. roseum* ВКПМ F-900, *Trichoderma* sp. С16-05) низкий рост биомассы сопровождался сравнительно высоким уровнем секретируемой общей протеолитической активности (более 16 ед./г сух. мицелия). У более половины штаммов исследованных грибов оптимум активности явно сдвинут к более щелочному рН (рН 8,0). Как показали результаты, уровень протеолитической активности зависит не столько от видовой, сколько от штаммовой принадлежности микромицетов.

Таблица 9. Общая активность внеклеточных пептидаз и некоторые свойства культур микромицетов при росте в жидкой среде

№	Штамм	Период роста, сутки	Биомасса мицелия, г сух. миц./л	рН КЖ	Протеолитическая активность, ед./г сух. мицелия		
					рН 6,0	рН 7,0	рН 8,0
1	<i>Alternaria alternata</i> 2n	7	13,56	6,5	9,34	10,87	10,96
2	<i>A. kulundii</i> M309	10	23,95	5,9	4,06	6,65	9,58
3	<i>A. kulundii</i> M310	10	11,32	6,1	2,94	8,07	8,07
4	<i>Alternaria</i> sp.	7	21,70	6,7	4,46	5,68	6,08
5	<i>A. linariae</i> MF-P580-141	10	21,66	6,4	0,95	1,11	0,92
6	<i>A. linariae</i> MF-P641-011	10	8,18	6,6	2,85	5,20	3,16
7	<i>A. linariae</i> MF-P645-011	10	5,03	6,1	1,06	2,12	0,8
8	<i>A. linariae</i> MF-P649-011	10	23,82	6,6	1,12	1,09	0,9
9	<i>A. linariae</i> MF-P658-021	10	14,01	6,1	2,19	7,14	6,72
10	<i>A. linariae</i> MF-P680-021	10	13,45	6,4	5,21	12,89	6,01
11	<i>Botrytis cinerea</i>	7	27,58	4,4	6,92	4,26	3,68
12	<i>Fusarium anguioides</i> MFG 103100	7	23,72	6,5	4,73	5,23	5,86
13	<i>F. anguioides</i> MFG 108802	7	15,62	6,5	11,42	15,16	22,63
14	<i>F. anguioides</i> MFG 111502	7	18,49	6,4	6,96	7,75	13,05
15	<i>F. anguioides</i> MFG 119913	7	19,13	6,5	13,07	16,55	22,36
16	<i>F. chlamyosporum</i>	20	11,87	5,5	4,41	5,29	5,70
17	<i>F. oxysporum</i> F137	7	15,78	6,2	3,82	4,42	5,27
18	<i>F. roseum</i> ВКИМ F-900	7	7,19	5,5	16,60	18,82	17,43
19	<i>Trichoderma</i> sp. (1)	7	25,33	4,6	8,11	5,92	4,12

20	<i>Trichoderma</i> sp. (2)	7	21,28	4,6	9,15	7,11	3,64
21	<i>Trichoderma</i> sp. C16-05	20	1,49	7,1	18,31	28,09	28,79
22	<i>T. asperellum</i> K-1	7	17,08	6,8	3,12	2,30	3,47
23	<i>T. asperellum</i> Mg-6	7	19,03	6,9	3,36	2,14	2,31
24	Pleosporaceae sp. M303	10	5,66	6,8	4,01	5,54	6,01
25	Pleosporaceae sp. M305	10	24,71	6,2	1,13	1,84	3,10
26	Pleosporaceae sp. M311	10	13,50	6,5	1,93	3,56	4,64

3.2. Спектр специфической протеолитической активности культур микромицетов

Как видно из таблицы 10, изучение спектра специфической протеолитической активности у 26 штаммов мицелиальных грибов показало, что у большинства исследованных фитопатогенных штаммов микромицетов присутствует значительная трипсин-подобная активность. Наблюдаемая в ряде случаев низкая активность трипсин-подобных ферментов и относительно высокие активности субтилизин-подобных пептидаз и аминокептидаз у ряда штаммов фитопатогенных грибов, возможно, обусловлены длительным поддержанием сапротрофной фазы роста при культивировании микромицетов на агаризованных питательных средах в лабораторных условиях. Для большинства изученных штаммов не характерны активности химотрипсин-подобных и цистеиновых пептидаз.

Таблица 10. Спектр специфической протеолитической активности культур микромицетов при росте в жидкой среде

№	Штамм	Активность, ед./г сух. мицелия					
		Трипсин-подобная активность (субстрат ВApNA)	Субтилизин-подобная активность (субстрат GlpAALpNa)	Химотрипсин-подобная активность (субстрат GlpFpNa)	Активность цистеиновых протеиназ (субстрат GlpFApNa)	Аминопептидазная активность	
						субстрат L-pNa	субстрат F-pNa
1	<i>Alternaria alternata</i> 2n	9,83	70,80	16,72	0	129,93	26,34

2	<i>A. kulundii</i> M309	18,22	23,53	0	0	18,30	68,06
3	<i>A. kulundii</i> M310	108,65	164,73	70,80	0	167,70	155,68
4	<i>Alternaria</i> sp.	78,66	47,32	23,35	0	131,68	46,64
5	<i>A. linariae</i> MF- P580-141	9,37	81,62	5,80	11,60	2,23	10,70
6	<i>A. linariae</i> MF- P641-011	33,98	43,49	0	36,70	0	0
7	<i>A. linariae</i> MF- P645-011	55,64	0	7,9	0	85,17	80,44
8	<i>A. linariae</i> MF- P649-011	4,48	62,69	2,80	0	16,99	20,49
9	<i>A. linariae</i> MF- P658-021	145,97	78,54	0	11,90	0	0
10	<i>A. linariae</i> MF- P680-021	89,67	0	0	16,53	24,06	19,68
11	<i>Botrytis cinerea</i>	210,87	31,97	0	0	4,73	7,78
12	<i>Fusarium</i> <i>anguioides</i> MFG 103100	281,08	374,77	0	0	67,67	102,02
13	<i>F. anguioides</i> MFG 108802	456,29	675,99	0	0	593,27	3070,41
14	<i>F. anguioides</i> MFG 111502	222,09	517,54	0	0	45,89	233,16
15	<i>F. anguioides</i> MFG 119913	675,34	1540,95	0	0	60,02	79,38
16	<i>F.</i> <i>chlamydosporu</i> <i>m</i>	239,55	803,81	0	0	24,33	37,43
17	<i>F. oxysporum</i> F137	1774,74	3884,50	54,33	36,22	178,83	312,39
18	<i>F. roseum</i> BKIIIM F-900	1072,92	1311,35	0	0	228,49	337,77
19	<i>Trichoderma</i> sp. (1)	78,95	0	0	0	0	0
20	<i>Trichoderma</i> sp. (2)	100,70	0	21,63	0	0	0
21	<i>Trichoderma</i> sp. C16-05	0	0	0	0	275,80	216,17
22	<i>T. asperellum</i> K-1	0	112,87	22,76	295,08	372,07	188,12

23	<i>T. asperellum</i> Mg-6	0	99,47	0	0	298,40	527,36
24	Pleosporaceae sp. M303	25,93	35,35	7,07	0	48,40	71,55
25	Pleosporaceae sp. M305	40,79	15,10	1,93	0	12,57	129,73
26	Pleosporaceae sp. M311	105,21	161,63	94,63	0	211,69	193,43

Наибольшей активностью трипсин-подобных пептидаз (1774,74 ед./г сух. миц.) обладала культура *F. oxysporum* F137 (фитопатоген); ее отсутствием характеризовались штаммы сапротрофного рода *Trichoderma* – *Trichoderma* sp. C16-05, *T. asperellum* K-1 и Mg-6 (табл. 9). Наибольшую активность субтилизин-подобных пептидаз (3884,50 ед./г сух. миц.) проявил также штамм *F. oxysporum* F137. Культуры *A. linariae* MF-P645-011, MF-P680-021, *Trichoderma* sp. (1), (2) и C16-05 не секретировали внеклеточные субтилизин-подобные ферменты. Наиболее активным продуцентом внеклеточных аминопептидаз был штамм *F. anguioides* MFG 108802. Их активность у *A. linariae* MF-P641-011 и MF-P658-021, а также *Trichoderma* sp. (1) и (2) не обнаруживалась.

Таким образом, у большинства патогенных штаммов грибов, исследованных в данной работе, в отличие от сапротрофов, на значительном уровне поддерживалась трипсин-подобная активность, что говорит о важности данных ферментов в патогенезе.

Все исследованные штаммы грибов (*A. linariae* MF-P658-021, *B. cinerea*, *F. anguioides* MFG 108802, *F. chlamydosporum*, *F. roseum* Fuckel ВКПМ F-900 и *Trichoderma* sp. (1)) по данным гель-фильтрации на Superdex 200 (рисунки 4 – 9) секретировали сходные небольшие трипсин-подобные пептидазы с молекулярной массой 16,2 кДа. Исключение составил штамм *F. roseum* ВКПМ F-900, который секретировал пептидазу с несколько большей молекулярной массой 22,9 кДа (таблица 11).

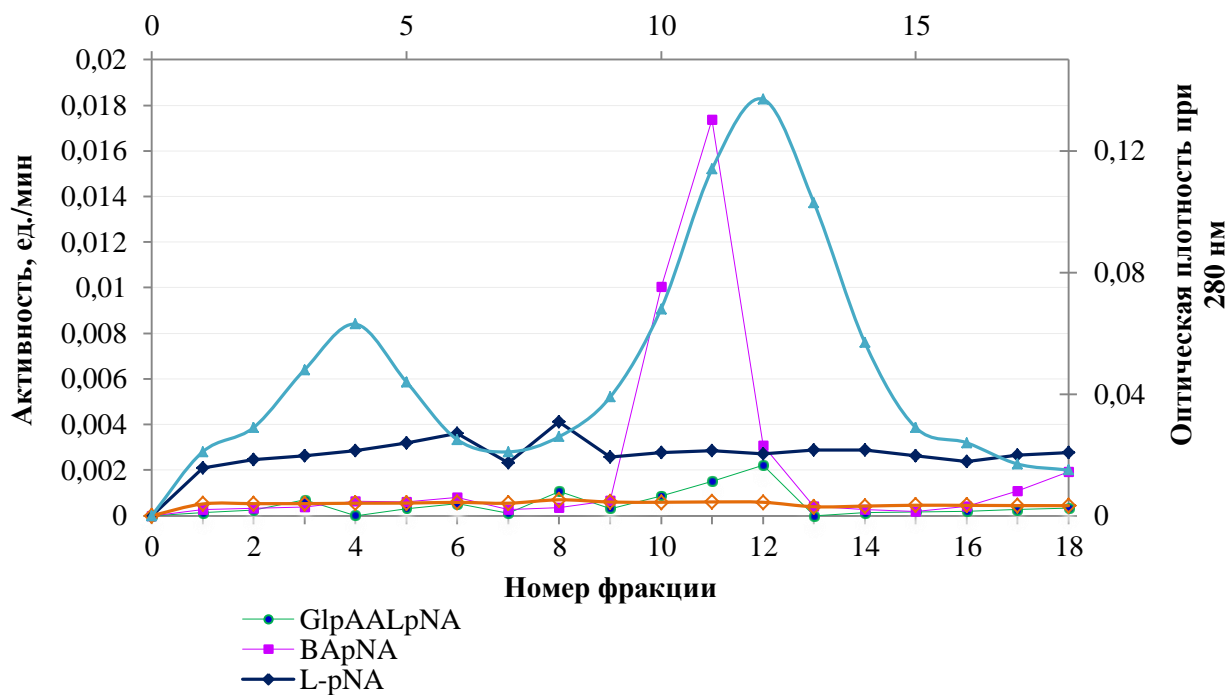


Рис. 4. FPLC Superdex 200 гель-фильтрация пептидаз из диализованной культуральной жидкости *A. linariae* MF-P658-021 (10 сутки роста культуры)

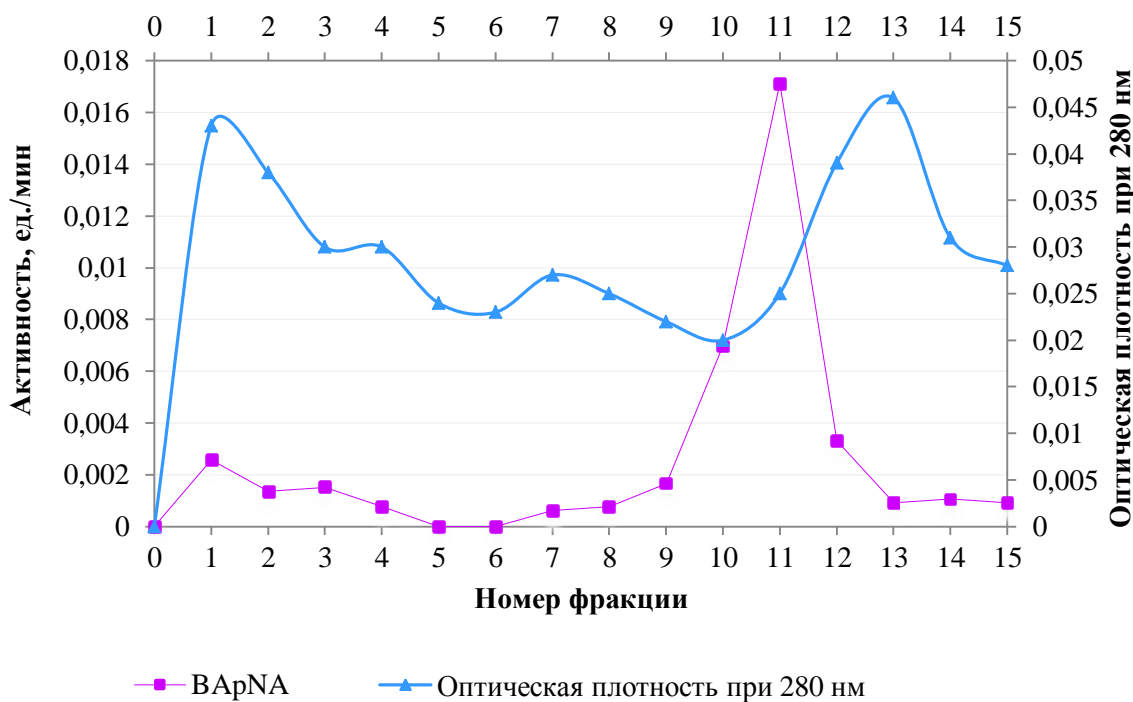


Рис. 5. FPLC Superdex 200 гель-фильтрация пептидаз из диализованной культуральной жидкости *B. cinerea* (7 сутки роста культуры)

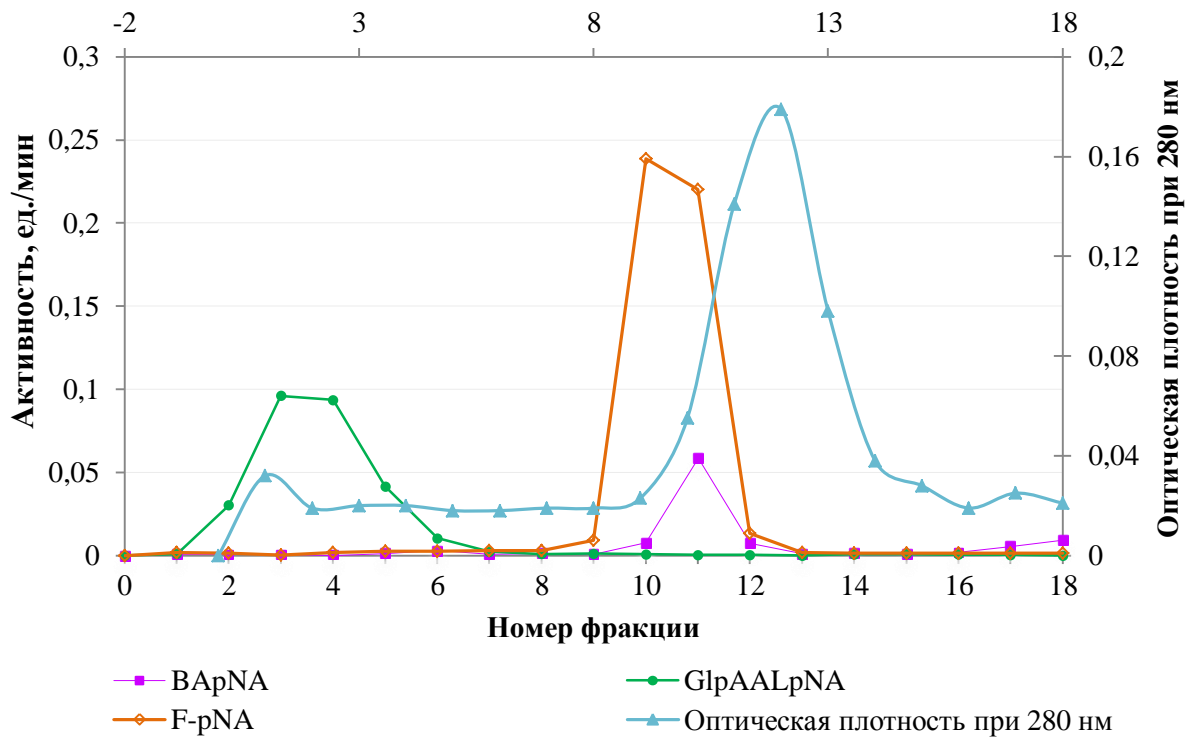


Рис. 6. FPLC Superdex 200 гель-фильтрация пептидаз из культуральной жидкости *F. anguioides* MFG 108802 (10 сутки роста культуры)

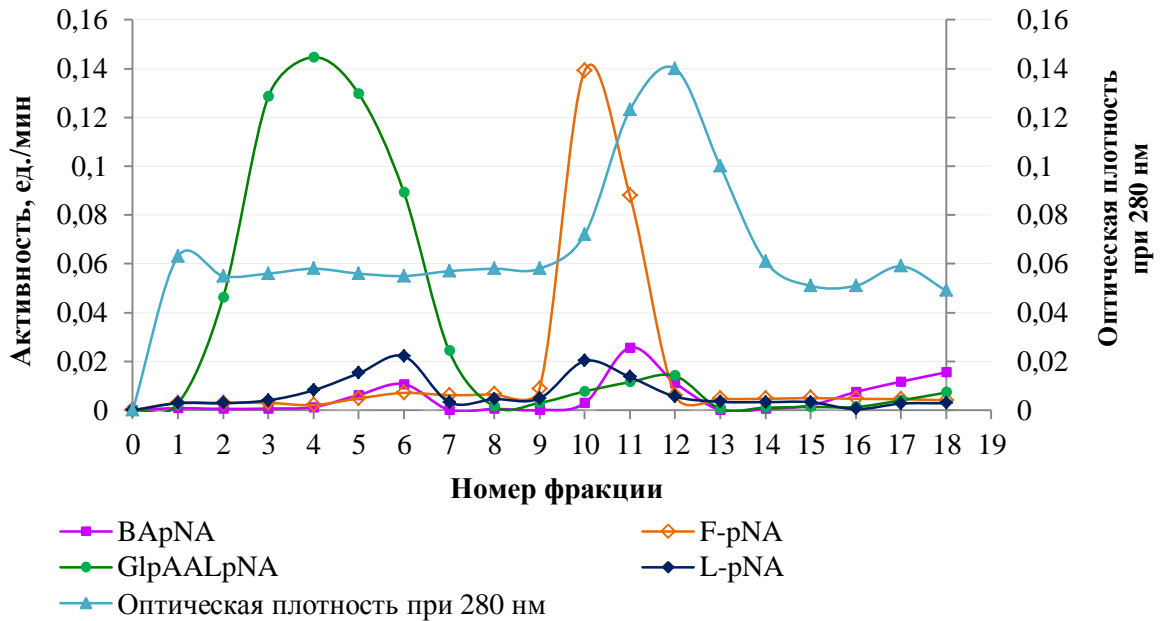


Рис. 7. FPLC Superdex 200 гель-фильтрация пептидаз из диализованной

культуральной жидкости *F. chlamyosporum* (7 сутки роста культуры)

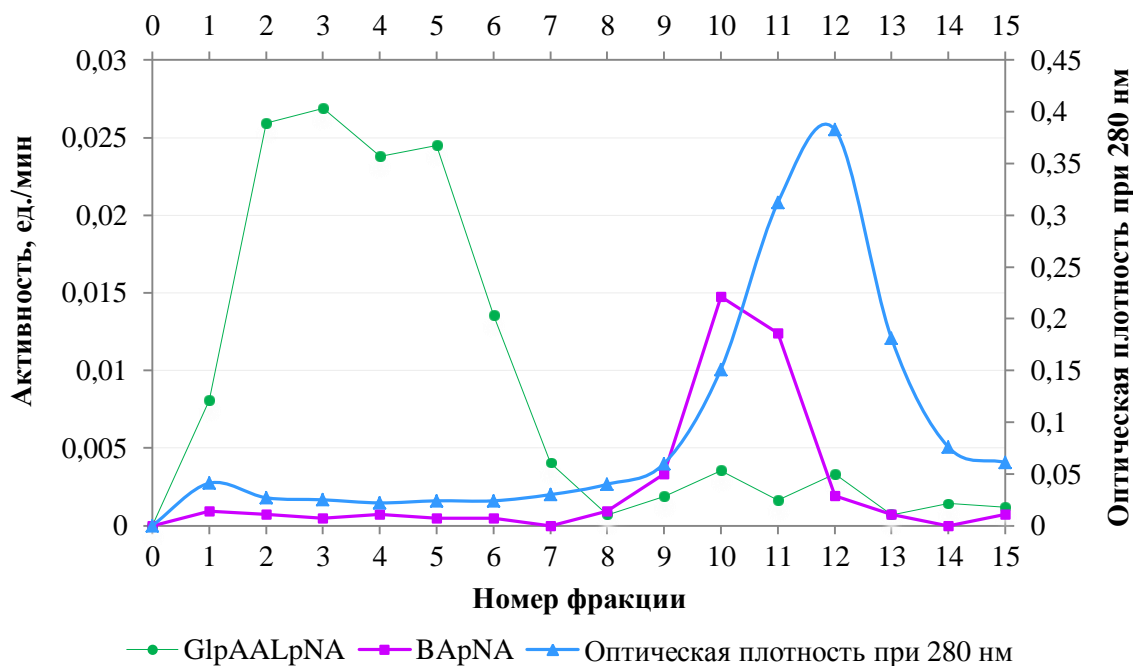


Рис. 8. FPLC Superdex 200 гель-фильтрация пептидаз, активных по GlpAALpNA, из диализованного препарата осажденных белков *F. roseum* Fuckel ВКПМ F-900 (9 сутки роста культуры)

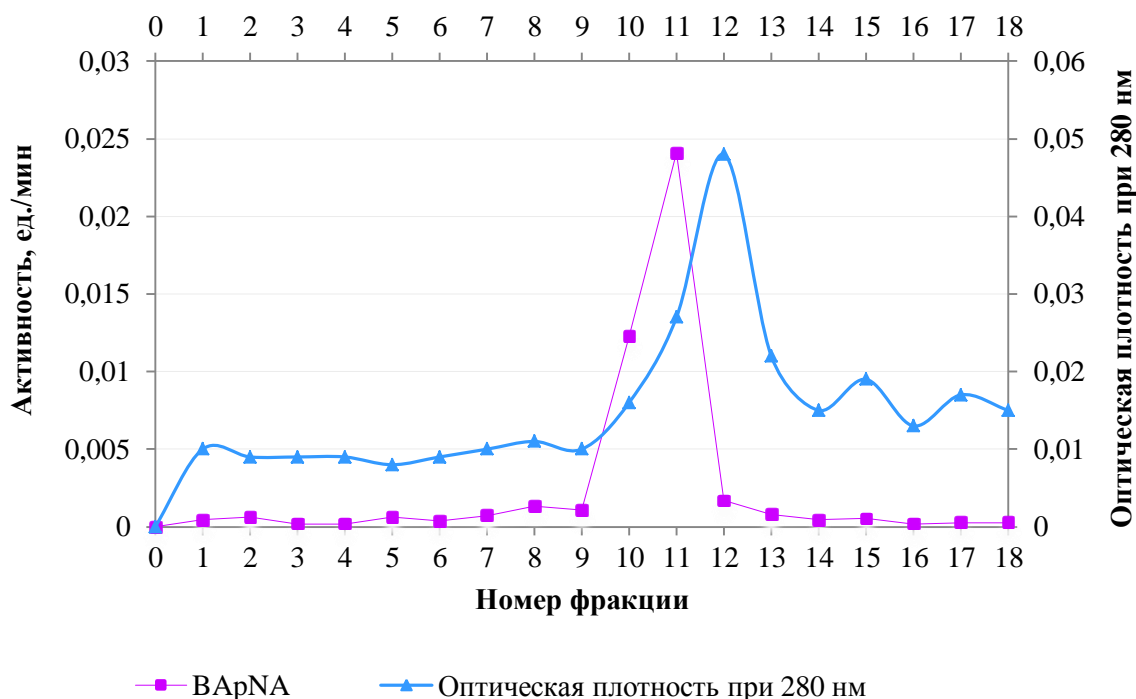


Рис. 9. FPLC Superdex 200 гель-фильтрация пептидаз из диализованной культуральной жидкости *Trichoderma* sp. (зел.-1) (6 сутки роста культуры)

Таблица 11. Трипсин-подобные пептидазы, секретируемые мицелиальными микромицетами

№	Штамм микромицета	Молекулярная масса трипсин-подобных пептидаз, кДа
1	<i>A. linariae</i> MF-P658-021	16,2
2	<i>B. cinerea</i>	16,2
3	<i>F. anguioides</i> MFG 108802	16,2
4	<i>F. chlamydosporum</i>	16,2
5	<i>F. roseum</i> ВКПМ F-900	22,9
6	<i>Trichoderma sp.</i> (1)	16,2

Интересно отметить, что среди штаммов грибов с внеклеточной трипсин-подобной активностью ферментов штамм *F. roseum* Fuckel ВКПМ F-900, секретирующий 23 кДа трипсин-подобную пептидазу, выделяется как один из ее наиболее активных продуцентов (таблица 10).

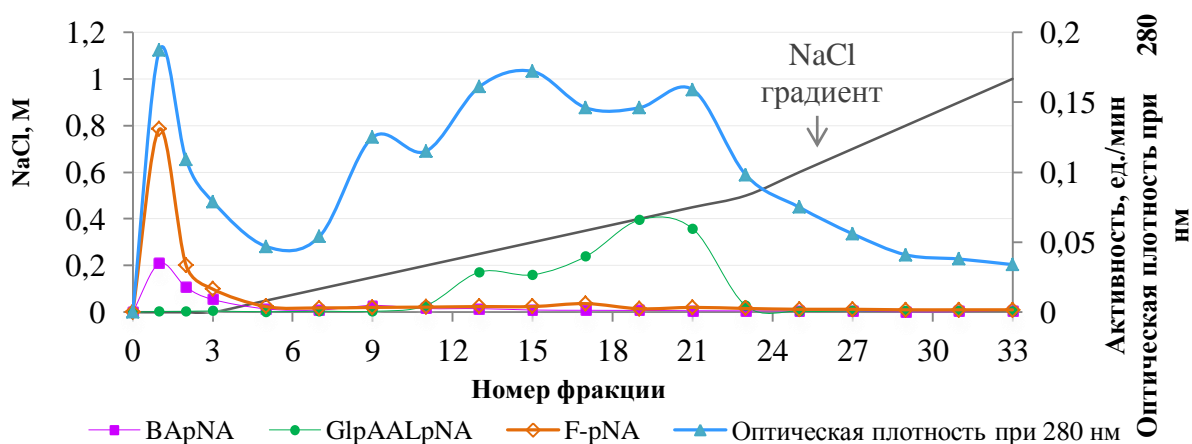


Рис.10. Колоночная хроматография на Mono Q пептидаз, секретируемых штаммом *F. anguioides* MFG 108802 на 10-е сутки роста.

Как показали результаты проведенной ионообменной хроматографии пептидаз *F. anguioides* MFG 108802 (рисунок 10), субтилизин-подобные пептидазы этого штамма заметно отличаются в значениях суммарного заряда от трипсин-подобных пептидаз и фенилаланиновых аминопептидаз, что дает возможность эффективного разделения двух главных групп сериновых пептидаз.

3.3. Влияние некоторых факторов внешней среды на секрецию грибных пептидаз

3.3.1. Развитие мицелиальных грибов и секреция ими пептидаз в анаэробных условиях и условиях пониженной концентрации кислорода воздуха

Для понимания и подбора оптимальных условий синтеза и секреции протеолитических ферментов, а также изучения адаптационных свойств грибов, была исследована зависимость их протеолитической активности от меняющихся условий внешней среды. Одним из таких условий, влияющих на активность секретируемых грибных пептидаз, может быть дефицит кислорода в среде культивирования.

Развиваясь в естественных условиях в тканях растений или толще других субстратов роста, мицелиальные грибы вынуждены сталкиваться с дефицитом кислорода.

Для всех использованных в работе штаммов грибов было характерно развитие колоний как в аэробных, так и анаэробных условиях. Однако в аэробных условиях образование спор у культур происходило гораздо раньше и активнее, чем при анаэробии. В анаэробных условиях рост некоторых из исследованных штаммов представлен на рисунке 11.



Рис. 11. Колонии *B. cinerea*, *F. roseum* ВКПМ F-900 и *Trichoderma* sp. при культивировании в анаэробных условиях в течение 9 суток

Учитывая, что для многих фитопатогенов характерна активность по ВАРНА, а для сапротрофов – аминоклеветидная активность, мы определили соответствующие активности для *F. roseum* (фитопатогена) и *A. terreus* (сапротрофа).

Общая протеолитическая активность известного почвенного сапротрофа *A. terreus* 3-L 12pnR, как и фитопатогена *F. roseum* ВКПМ F-900, уменьшалась при понижении концентраций кислорода в воздушном пространстве над средой культивирования в флаконах (таблицы 12, 13). Аминоклеветидная активность *A. terreus* по субстрату F-pNA составляла 56,9 % от контроля (воздух) уже после 1 мин вытеснения воздуха аргонном (таблица 12), тогда как трипсин-подобная активность *F. roseum* по субстрату ВАРНА составляла 91,6 % от контроля (воздух) после 2 мин вытеснения воздуха аргонном (таблица 13).

Таблица 12. Влияние пониженных концентраций кислорода на протеолитическую активность *A. terreus* 3-L 12pnR

% Оставшегося кислорода (время вытеснения воздуха аргонном, мин)	Активность			
	Общая		F-pNA	
	ед. / г сух. миц.·мин	%	ед. / г сух. миц.·мин	%
100 (0)	7,95	100	50,75	100

90 (1)	2,91	36,6	28,89	56,9
70 (3)	2,09	26,3	28,22	55,6
50 (5)	1,62	20,4	29,80	58,7
30 (7)	1,57	19,8	30,05	59,2
0 (10)	1,53	19,2	30,73	60,6

Таблица 13. Влияние пониженных концентраций кислорода на протеолитическую активность *F. roseum* ВКПМ F-900

% Оставшегося кислорода (время вытеснения воздуха аргоном, мин)	Активность			
	Общая		ВArNA	
	ед. / г сух. миц.·мин	%	ед. / г сух. миц.·мин	%
100 (0)	2,20	100	320,06	100
80 (2)	1,49	67,7	293,26	91,6
50 (5)	1,30	59,1	204,08	63,8
0 (10)	0,86	39,1	147,26	46,0

Таким образом, в основном отмечено довольно значительное падение активностей исследованных пептидаз штаммов *A. terreus* и *F. roseum* при пониженных концентрациях кислорода по сравнению с аэробными условиями. При этом для протеолитических ферментов *F. roseum*, в частности, трипсин-подобных пептидаз, характерно сохранение заметной индукции/секреции и при некотором небольшом дефиците кислорода. Можно полагать, что при адаптации к таким условиям задействованы и другие ферменты грибов. Так, в работе Mattila с сотрудниками (Mattila et al., 2020) изучено, что в условиях пониженного содержания кислорода также происходит значительное расщепление лигноцеллюлозы грибом белой гнили

Phlebia radiata, что обусловлено индукцией экспрессии вплоть до 10 генов целлюлозорасщепляющих ферментов.

В некоторых случаях недостаток кислорода может быть индуктором экспрессии пептидаз. Так, показано, что у грамотрицательных бактерий *Yersinia ruckeri*, колонизирующих кишечник рыб и являющихся возбудителем их болезней, соседние гены пептидаз *yrpA* и *yrpB* экспрессировались на высоком уровне как в присутствии пептона в среде культивирования, так и под влиянием кислород-дефицитных условий (Navais et al., 2014). Эти данные свидетельствуют о том, что протеолитические ферменты главным образом действуют в тех условиях, к которым адаптирован продуцирующий их организм.

3.3.2. Изменения pH среды культивирования в процессе роста штаммов грибов в жидкой среде и их влияние на активность секретируемых пептидаз

Все штаммы грибов, у которых исследовали динамику изменения значений pH среды роста, характеризовались ее долговременным (рисунок 12) или кратковременным (рисунки 13 – 15) подкислением в ходе культивирования. Такое уменьшение значений pH среды начиналось уже на 2 – 4-е сутки роста культур. Этим, возможно, объясняются полученные данные о преобладании у некоторых грибов активности секретируемых пептидаз, сдвинутой в сторону более кислого pH (таблица 8). У *B. cinerea* этот сдвиг явно связан с возрастанием активности аспартатных пептидаз, наблюдаемым после 4-х дней роста (рисунок 1). Для ряда штаммов грибов (*F. anguioides* MFG 119913, *F. roseum* ВКПМ F-900 и *T. asperellum* Mg-6) было свойственно также подщелачивание среды (рисунки 13 – 15), следующее за ее подкислением. Поэтому, видимо, у штаммов *F. anguioides* на 7-е сутки культивирования после подщелачивания среды наиболее активной группой пептидаз были щелочные пептидазы, а у *F. roseum* ВКПМ F-900 в тот же период обнаруживались наиболее активные нейтральные пептидазы (таблица 8).

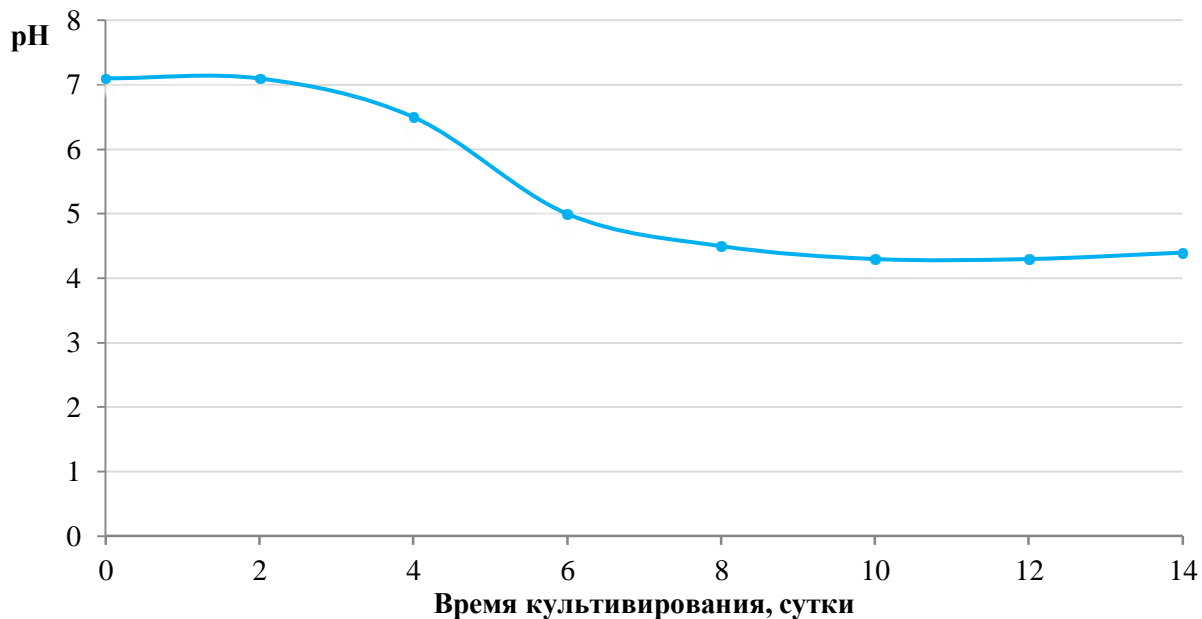


Рис. 12. Изменение значений pH среды культивирования в процессе роста *V. cinerea* в жидкой среде Чапека

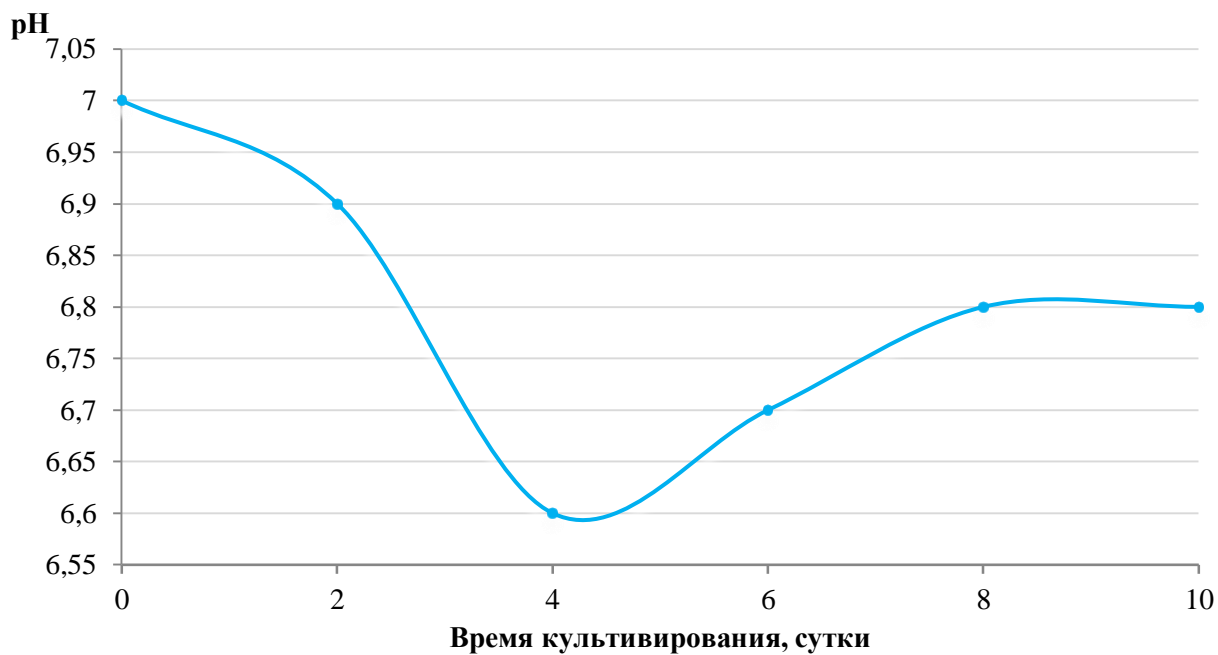


Рис. 13. Изменение значений pH среды культивирования в процессе роста *F. anguoides* MFG 119913 в жидкой среде

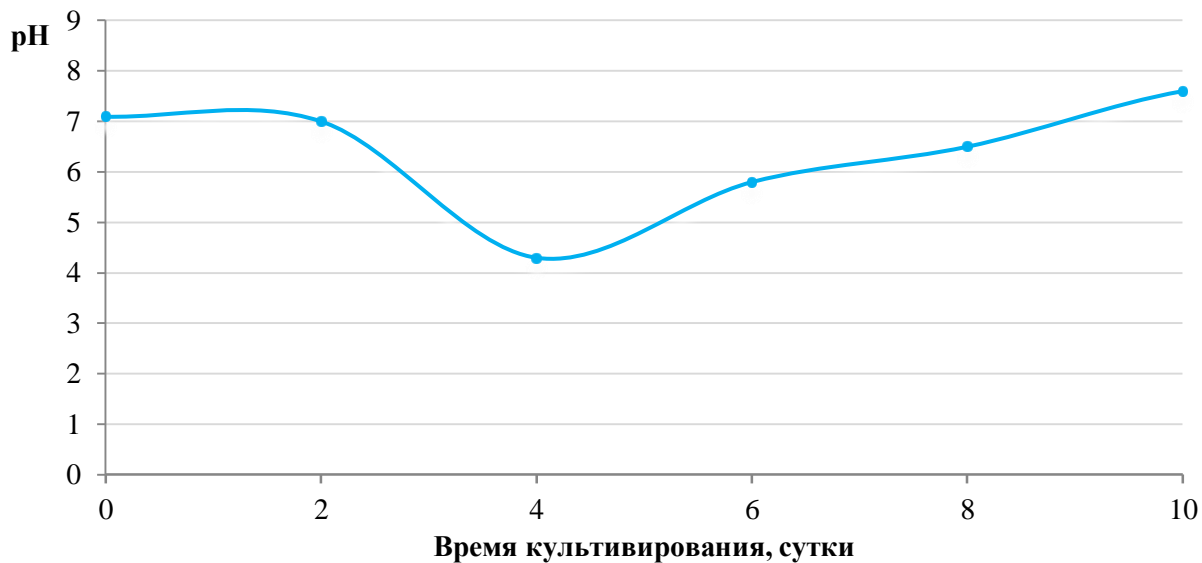


Рис. 14. Изменение значений pH среды культивирования в процессе роста *F. roseum* ВКПМ F-900 в жидкой среде

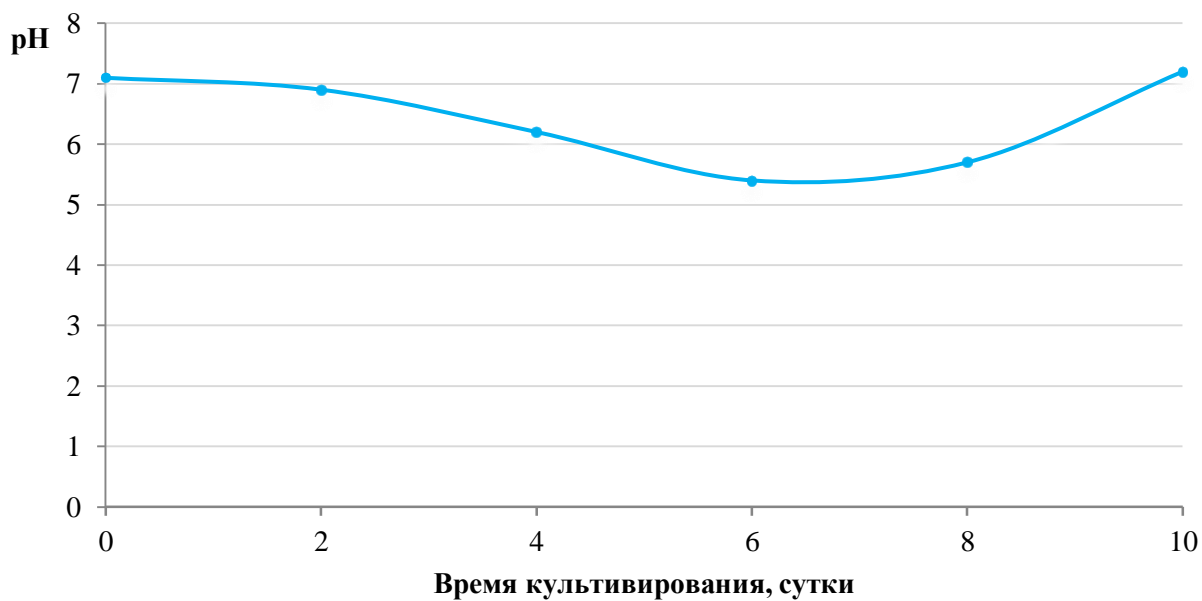


Рис. 15. Изменение значений pH среды культивирования в процессе роста *T. asperellum* Mg-6 в жидкой среде

Появление наиболее активных кислых пептидаз *T. asperellum* Mg-6 отмечено в периоде культивирования, соответствующему пониженному значению pH среды (таблица 8, рисунок 15). Значительная активность аспаргатных пептидаз у этого гриба, обнаруженная с помощью ингибиторного анализа с пепстатином (таблица 7), согласуется с полученными данными о подкислении в это время среды микромицетом (рисунок 15). Таким образом, можно заключить, что pH является одним из факторов, определяющим появление и/или изменение активности той или иной группы протеолитических ферментов.

3.3.3. Влияние различных источников азота на активность внеклеточных пептидаз некоторых штаммов мицелиальных грибов

Без индуктора секреция пептидаз *B. cinerea* не выявляется или остается очень низкой (таблицы 14, 15). В качестве индукторов активности могут выступать как отдельные белки, в частности, казеин, так и растительные клеточные стенки, содержащие белковый компонент в своем составе. С одной стороны, полимеры растительной клеточной стенки представляют собой потенциальный защитный барьер, препятствующий проникновению в клетку и распространению в ней фитопатогенов. В то же время, растительные полимеры являются субстратами для внеклеточных ферментов микроорганизмов. Белки растительной клеточной стенки подвергаются гидролизу пептидазами при атаке растения фитопатогенным грибом в природных условиях.

Таблица 14. Общая активность внеклеточных пептидаз в КЖ *B. cinerea* при культивировании в течение 7 суток в жидкой полноценной среде Чапека и модифицированной различными источниками азота

Источник азота	Биомасса мицелия, г сух. миц./л	pH КЖ	Активность, ед. / г сух. миц.		
			pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0
NaNO ₃	20,32	5,0	0,12	0,20	0,17
Клеточные стенки <i>Vigna radiata</i>	20,92	5,0	4,43	2,68	1,98
Казеин	27,58	4,4	6,92	4,26	3,68

Активность протеолитических ферментов *B. cinerea*, секретируемых в жидкую среду, содержащую растительные клеточные стенки или казеин, определяемая при слабокислом значении pH, выше, чем та же активность, определяемая при нейтральном или щелочном значениях pH (таблица 14). По-видимому, это связано с тем, что *B. cinerea* – активный ацидификатор среды (создается pH 4,4 – 5,0), и оптимальные условия работы ферментов этого гриба – более кислые.

Определено, что трипсин-подобная активность *B. cinerea* значительно выше субтилизин-подобной при использовании любого из двух индукторов (таблица 15).

Таблица 15. Субстрат-специфичная протеолитическая активность КЖ *B. cinerea* при культивировании в течение 7 суток в жидкой полноценной среде Чапека и модифицированной различными источниками азота

Субстрат	Активность, ед. / г сух. мицелия		
	NaNO ₃	Казеин	Клеточные стенки <i>Vigna radiata</i>
BApNA	0	210,87	129,46
GlpAALpNa	2,11	31,97	23,90
GlpFApNa	0	0	0
GlpFpNa	0	0	0
L-pNa	7,72	4,73	91,81
F-pNa	5,15	7,78	31,11

Внеклеточная протеолитическая активность *F. roseum* обусловлена функционированием конститутивных (синтезируемых без индуктора) и индуцибельных (синтезируемых в присутствии индуктора) ферментов (таблицы 16, 17). При росте без индуктора (с нитратом натрия в среде Чапека) культура способна постоянно секретировать сравнительно низкие количества трипсин-, субтилизин-, химотрипсин-подобных ферментов, цистеиновых протеаз и аминокатализаторов (таблица 17). В этом случае, как и в присутствии казеина в ростовой среде, активность субтилизин-подобных пептидаз оказывалась выше активности трипсин-подобных ферментов.

Казеин и клеточные стенки стимулировали резкий рост образования трипсин-, субтилизин-подобных протеаз и экзопептидаз.

Таблица 16. Общая активность внеклеточных пептидаз в КЖ *F. roseum* Fuckel ВКПМ F-900 при культивировании в течение 7 суток в жидкой стандартной среде Чапека и модифицированной различными источниками азота

Источник азота	Биомасса мицелия, г сух. миц./л	рН КЖ	Активность, ед. / г сух. миц.		
			рН 6,0	рН 7,0	рН 8,0
NaNO ₃	11,57	8,3	17,86	20,92	23,74
Казеин	7,19	5,5	16,60	18,82	17,43
Клеточные стенки <i>Vigna radiata</i>	7,85	6,9	31,51	38,39	47,05

Таблица 17. Субстрат-специфичная протеолитическая активность КЖ *F. roseum* Fuckel ВКПМ F-900 при культивировании в течение 7 суток в жидкой стандартной среде Чапека и модифицированной различными источниками азота

Субстрат	Активность, ед. / г сух. миц. · мин		
	NaNO ₃	Казеин	Клеточные стенки <i>Vigna radiata</i>
BApNA	232,15	1072,92	870,49
GlpAALpNa	263,88	1311,35	780,26
GlpFApNa	3,26	0	0
GlpFpNa	20,88	0	0
L-pNa	65,97	228,49	483,27
F-pNa	41,75	337,77	252,76

Следует отметить, что отношение между активностями трипсин- и субтилизин-подобных ферментов значительно возросло при росте *F. roseum* в среде с клеточными стенками (таблица 17).

Таким образом, у исследованных двух фитопатогенных видов грибов при наличии многих индивидуальных особенностей имеется общая черта – более высокая активность трипсин-подобных пептидаз по сравнению с субтилизин-подобными ферментами при росте на среде с растительными клеточными стенками, что может указывать на доминирующую роль трипсин-подобных пептидаз при фитопатогенезе у грибов.

3.4. Особенности внеклеточных пептидаз различных представителей микромицетов

3.4.1. Внеклеточные пептидазы видов рода *Alternaria*

Установлено, что общая протеолитическая активность у изученных штаммов *A. linariae* варьирует в пределах от 0,8 до 12,9 ед./мин·г сух. мицелия и достигает максимума при нейтральном значении pH (таблица 9).

Спектр пептидаз, секретируемых штаммами *A. linariae*, включает сериновые, некоторое количество цистеиновых пептидаз, металлопептидазы и представителей экзопептидаз – аминопептидазы (таблица 10, рисунок 16). Цистеиновые пептидазы были представлены у небольшого числа штаммов и, чаще всего, в незначительных количествах. Чаще встречаются у всех *A. linariae* трипсин-подобные ферменты, и их активность у 4-х из 6-ти штаммов была высокой. У штаммов с низкой активностью трипсин-подобных ферментов наблюдались относительно высокие активности субтилизин-подобных пептидаз и аминопептидаз (таблица 10). Высокая активность трипсин-подобных пептидаз, являющихся у грибов возможными маркерами патогенности (Dubovenko et al., 2010), может свидетельствовать о патогенности исследованных штаммов.

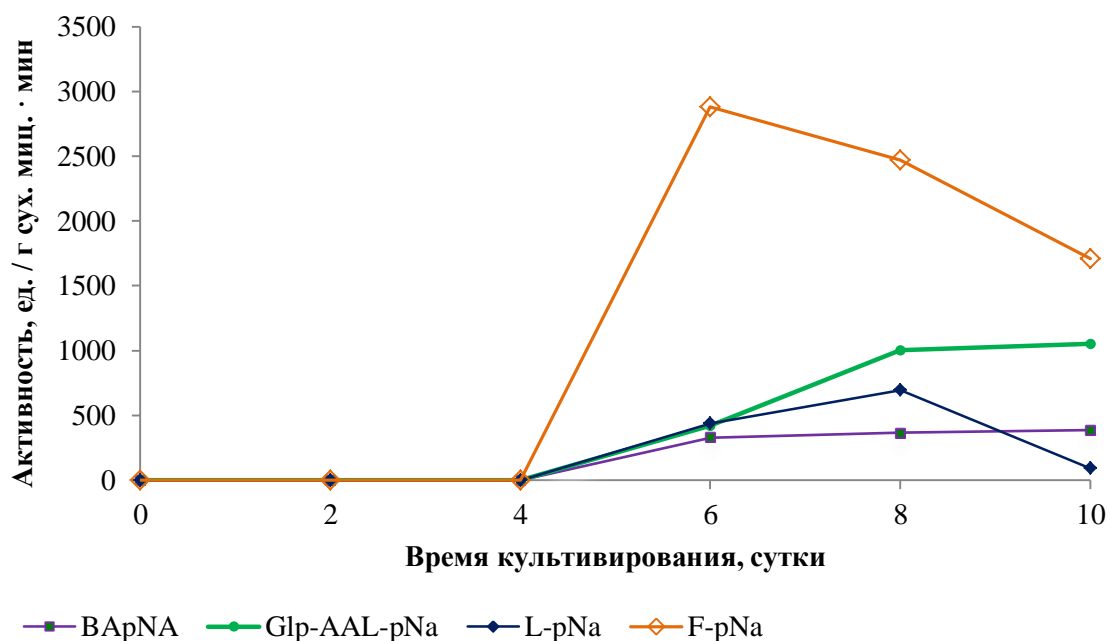


Рис. 16. Динамика субстрат-специфичной протеолитической секреции *A. linariae* MF-P680-021 в жидкой среде

У агрессивных и неагрессивных штаммов *A. linariae* исследовалась связь секреции протеолитических ферментов с образованием таких вторичных метаболитов, как меланины, известные факторы вирулентности у некоторых грибов (Henson et al., 1999, Calvo et al., 2002). Среди исследованных нами штаммов представители рода *Alternaria* наиболее активно образуют меланины. Штаммы *A. linariae* MF-P641-011, MF-P658-021 и MF-P680-021, имеющие наиболее высокую общую протеолитическую активность (таблица 10), образовывали в большем количестве меланины (таблица 18). Как видно из таблицы 10, именно эти штаммы более интенсивно секретировали трипсин-подобные пептидазы, причем два из них с наиболее высоким содержанием меланина – MF-P641-011 и MF-P680-021 – являются агрессивными патогенами растений (таблица 19).

Таблица 18. Уровень накопления биомассы и меланинов в культуральной жидкости штаммов *A. linariae*

№	Штамм	Биомасса*, г сух. миц./л	Концентрация меланина, мг/л
1	MF-P580-141	21,66	34
2	MF-P641-011	8,18	86

3	MF-P645-011	5,03	23
4	MF-P649-011	23,82	35
5	MF-P658-021	14,01	76
6	MF-P680-021	13,45	291

* - данные приведены на 10 сут. роста штаммов.

Таблица 19. Агрессивность штаммов *A. linariae*, использованных в работе (данные предоставлены Ф.Б. Ганнибалом)

№	Регион	Место	Выделен	Агрессивность*		
				Для томата	Для картофеля	Характер
MF-P580-141	Иркутская обл.	Иркутский р-н, хоз-во "Искра", теплица	2008	4,6	4,3	Не агрессивные
MF-P645-011	Адыгея	Майкопский р-н, пос. Подгорный, ВИР, опытное поле	2008	5,9	4,6	
MF-P658-021	Адыгея	Майкопский р-н, пос. Подгорный, ВИР, опытное поле	2008	4,3	5,4	
MF-P641-011	Адыгея	Майкопский р-н, пос. Подгорный, ВИР, опытное поле	2008	41	8	Агрессивные
MF-P649-011	Адыгея	Майкопский р-н, пос. Подгорный, ВИР, опытное поле	2008	31,6	6,1	
MF-P680-011	Минская обл.	г. Минск, дача Проликсеновой В.Д., теплица	2008	32,5	6,3	

*доля (%) некроза на листовом диске диаметром 10 мм, 5 dpi

Таким образом, в нашем исследовании прослежена связь между образованием трипсин-подобных пептидаз, меланина и агрессивностью штаммов *A. linariae*. Однако по данным Kawamura с коллегами (Kawamura et al., 1997), несмотря на то, что фитопатоген *Alternaria alternata* синтезирует меланин и формирует меланизированные колонии, образование меланина у него не связано с фитопатогенностью. При этом исследователями показано, что гены биосинтеза меланина *A. alternata* восстанавливают меланизацию и патогенность некоторых меланин-дефицитных мутантов *Magnaporthe grisea* – вида-фитопатогена, у которого в норме меланизация необходима для фитопатогенеза.

Однако есть данные, связывающие биосинтез меланина и фитопатогенез. Так, в другом исследовании (Lin et al., 2010) авторы Lin с сотрудниками показали, что белок AaFUS3 (MAPK, mitogen-activated protein kinase) вовлечен в образование и накопление меланина, а также фитопатогенез у *A. alternata*.

Исследователи Clarke с сотрудниками (Clarke et al., 2016) предложили гипотезу, согласно которой секретируемая сериновая пептидаза Prb1, возможно, влияет на образование внеклеточных меланинов у гриба *Cryptococcus neoformans*, патогена человека. У этого вида грибов меланин – фактор вирулентности. В ходе эксперимента исследователи обнаружили, что у мутантов гриба с делецией гена *prb1* происходит гипомеланизация. Поэтому в этом случае имеются основания полагать, что белок Prb1 также можно отнести к фактору вирулентности гриба.

Известно, что меланизированные грибы более резистентны к действию гидролитических ферментов (Jacobson, 2000), причем как чужих, так и своих. Нельзя исключать, что устойчивость фитопатогенных грибов к собственным гидролазам связана со способностью синтеза ими меланина. Возможно, именно более высокий уровень накопления меланинов снимает или снижает потенциальный вред от повышенных концентраций внеклеточных пептидаз для грибов и сочетание высокой активности пептидаз, в первую очередь трипсин-подобных, и меланинов является определяющим фактором для поддержания агрессивности фитопатогенного гриба *A. linariae*.

3.4.2. Внеклеточные пептидазы *Botrytis cinerea*

B. cinerea вызывает серую гниль у широкого спектра растений, поэтому важны данные о его ферментативной активности как компонента низкоспецифичной адаптации.

Как показали результаты, секреция пептидаз *B. cinerea* большей частью индуцибельная и ее уровень зависит от типа источника азота, присутствующего в среде культивирования (таблицы 14, 15). Наиболее

высокая общая протеолитическая активность обнаруживалась в среде, содержащей казеин в качестве индуктора синтеза/секреции пептидаз по сравнению со средой с добавлением клеточных стенок растения, служивших в качестве единственного источника азота в ней. Активность 7-суточной культуры, растущей как в присутствии казеина, так и растительных клеточных стенок в среде роста, была наиболее высокой в слабокислых условиях (рН 6,0) и уменьшалась при росте значения рН испытательной среды, достигая наиболее низкого уровня при рН 8,0. Максимальный уровень протеолитической секреции (в среде с казеином) был достигнут на 4-е сутки роста (начало экспоненциальной фазы роста, рисунок 17). В этом периоде роста протеолитическая активность культуры была практически сходной при кислых и нейтральных условиях испытательной среды.

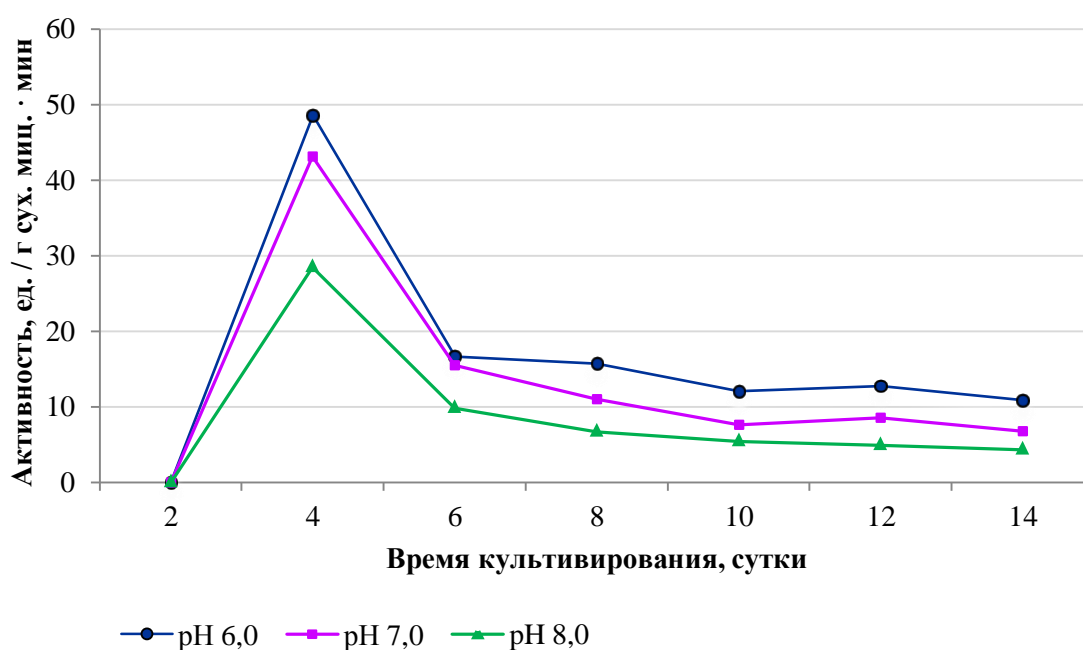


Рис. 17. Динамика общей активности внеклеточных пептидаз *B. cinerea* при культивировании в жидкой среде

В забуференной среде (рН исходной среды устанавливался 7,0 и поддерживался продолжительное время в процессе роста) общая кислая протеолитическая активность (определяемая при рН 5,0) *B. cinerea* была намного ниже, чем в среде на основе дистиллированной воды (рН исходной среды 7,0) (таблица 19). При этом биомасса и рН (рН 4,9 в опытном варианте и рН 4,8 в контрольном) обеих культур штамма к 10-м суткам роста выравнивались, хотя их кислые протеолитические активности продолжали значительно различаться, что может указывать на зависимость появления определенной протеолитической активности гриба от его стадии роста.

Таблица 19. Общая протеолитическая активность *B. cinerea* при pH 5,0 при росте штамма в среде на основе дистиллированной воды и фосфатного буфера

Основа среды	pH КЖ*	Биомасса, г сух. миц./л	Общая протеолитическая активность при pH 5,0, ед. / г сух. миц. · мин
Дистиллированная вода (pH 7,0)	4,8	39,29	8,70
0,1 М фосфатный буфер, pH 7,0	4,9	37,26	1,48

* - данные приведены на 10 сут. роста штамма

Спектр класс-специфической протеолитической активности был идентичен в обеих модифицированных различными источниками азота средах (таблица 15). Скрининг ферментов с использованием доступных *n*-нитроанилидных субстратов пептидаз, принадлежащих к различным классам и семействам, позволил выявить способность *B. cinerea* секретировать сериновые (трипсин- и субтилизин-подобные) пептидазы и аминопептидазы. Эта культура не образовывала заметных количеств секретируемых химотрипсин-подобных или цистеиновых пептидаз. Наиболее высокая активность трипсин- и субтилизин-подобных пептидаз была отмечена при росте гриба в среде с казеином, тогда как образование аминопептидаз было выше в присутствии растительных клеточных стенок.

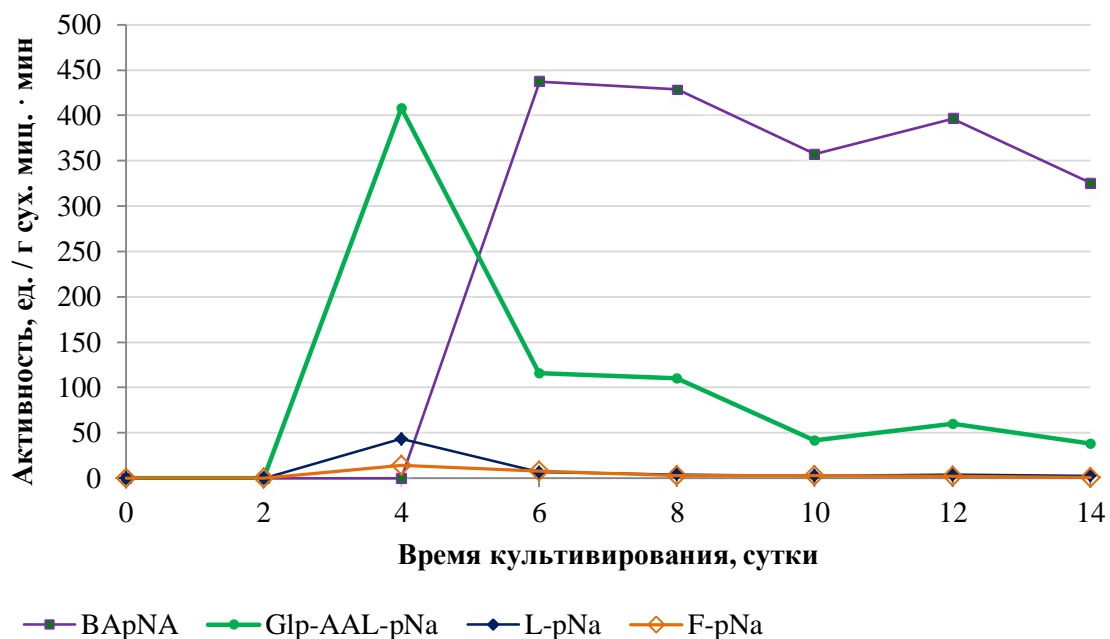


Рис. 18. Динамика субстрат-специфичной протеолитической секреции *B. cinerea* в жидкой среде

Низкий уровень секреции субтилизин-подобных пептидаз и аминокептидаз отмечен в отсутствие белкового индуктора в стандартной среде Чапека с NaNO_3 (таблица 15). В среде с казеином грибок образовывал вначале (на 4-е сутки роста) субтилизин-подобные пептидазы и аминокептидазы (лейциновые и фенилаланиновые) и позже (на 6-е сутки) трипсин-подобные ферменты (рисунок 18). После достижения пика активности субтилизин-подобные пептидазы быстро теряли свою активность, составляя 28 % от максимальной активности на 6-е сутки культивирования. Далее активность постепенно снижалась на протяжении роста культуры (до 9 % от максимальной активности на 14-е сутки роста). В отличие от субтилизин-подобных ферментов, активность трипсин-подобных пептидаз поддерживалась на значительном уровне до конца периода культивирования. Возможно, появление быстро исчезающей субтилизин-подобной активности необходимо для последующей активации трипсин-подобных ферментов, но не исключена также ее роль в предварительной подготовке субстрата для дальнейшего расщепления. Субтилизин- и трипсин-подобные пептидазы были более активны при значениях pH, близких к нейтральному, по сравнению с щелочным значением pH (pH 8,0), при котором терялось приблизительно 48 и 94 % максимальной активности по GlpAALpNA и BAпNA, соответственно.

Полученные результаты показали, что общая протеолитическая активность 4-суточной культуры *B. cinerea* приблизительно на 83 % ингибировалась PMSF. Это указывает на то, что сериновые пептидазы могут быть наиболее представленным классом пептидаз, секретируемых в течение экспоненциальной фазы роста *B. cinerea* (таблица 5). Их значительный уровень активности был отмечен на протяжении всего периода культивирования гриба. Данные по ингибированию пептидаз пепстатином показали (рисунок 3), что аспартатные пептидазы представляют собой другую группу внеклеточных пептидаз *B. cinerea*, активность которых выявляется наряду с активностью сериновых пептидаз в течение стационарной фазы роста. ЭДТА, 1,10-фенантролин и E-64 не действовали или слабо ингибировали протеолитическую активность *B. cinerea*, которая при этом ингибировалась DTT на 36 – 37 % (в зависимости от возраста гриба) (таблица 5).

На основании результатов определения активности по VApNA фракций, полученных при гель-фильтрации (рисунок 5), определено, что культура *B. cinerea*, как и подавляющая часть грибных фитопатогенов (Dubovenko et al. 2010), секретирует трипсин-подобные пептидазы с молекулярной массой 16,2 кДа.

Выявлено, что культуральная жидкость *B. cinerea* содержит ингибиторы папаина, бромелаина и химотрипсина (рисунок 19), но не активна по отношению к субтилизину или трипсину. Секреция ингибиторов была отмечена на 6-е сутки (начало стационарной фазы роста) и поддерживалась на значительном уровне в течение последующего периода культивирования.

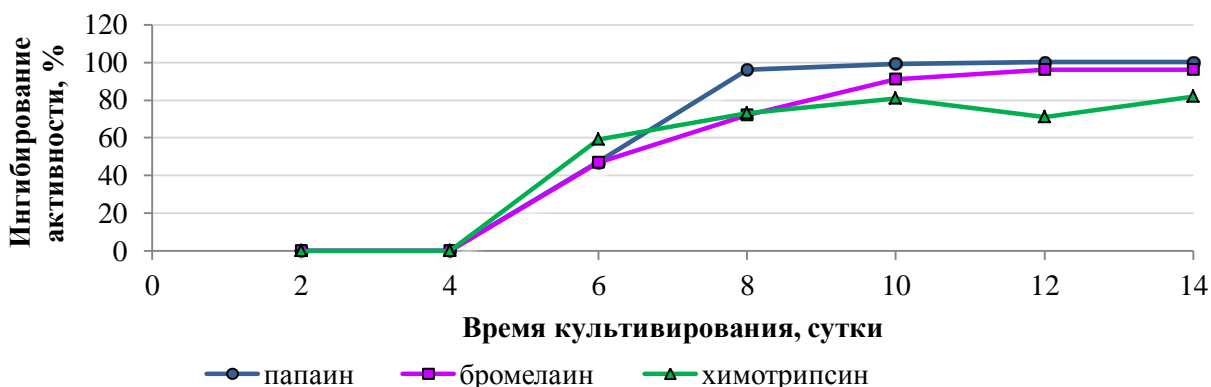


Рис. 19. Ингибиторная активность культуральной жидкости *B. cinerea* по отношению к папаину, бромелаину и химотрипсину

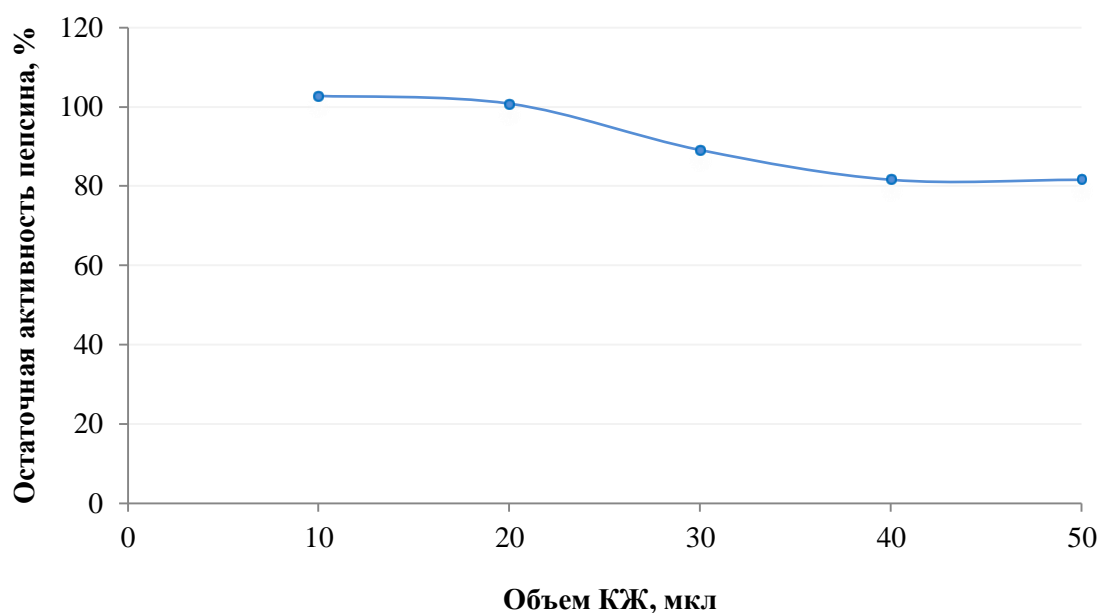


Рис. 20. Исследование влияния различных концентраций КЖ *V. cinerea* (7-суточного роста) на активность пепсина (рН 4,0)

Таблица 20. Влияние КЖ *V. cinerea* на активность пепсина при рН 4,0

Возраст культуры, сутки	Биомасса мицелия, г сух. миц./л	рН КЖ	Остаточная активность, %
4	2,74	6,0	109,8
7	22,15	4,4	81,6
10	26,73	4,2	69,2

Определено, что культура *V. cinerea* секретирует в среду также и ингибиторы аспартатных пептидаз (пепсина) (рисунок 20, таблица 20). Прогревание культуральной жидкости *V. cinerea* (7-суточного роста) в течение 15 мин при 60° С приводило к снижению ингибирующей пепсин активности, что может указывать на белковую природу ингибиторов.

Интересно отметить, что белковые ингибиторы протеолитических ферментов составляют наиболее крупную и структурно разнообразную группу природных ингибиторов ферментов (Otlewski et al., 2005).

B. cinerea поражает широкий спектр видов растений (Elad, 1997). Поэтому такой охват растений-хозяев подразумевает наличие у гриба метаболической гибкости, вовлекающей и широкий спектр ферментативных активностей. Выявленные в данной работе идентичные профили секреции класс-специфических групп пептидаз в среде с растительными клеточными стенками или казеином также указывают на низкоспециализированный трофический статус *B. cinerea* как оппортунистического патогена. Согласно результатам нашего исследования, вклад кислых пептидаз в общую протеолитическую активность был значительным вне зависимости от типа индуктора, присутствующего в среде. Этот факт согласовывается с известной способностью гриба к подкислению окружающей среды благодаря образованию щавелевой (Manteau et al., 2003), лимонной, яблочной и янтарной кислот (Verhoeff et al., 1988), что, возможно, и привело к адаптации протеолитической системы гриба к низким значениям рН среды, которые, в конце концов, стали подходящими условиями для ее функционирования. Идентифицированные в данном исследовании аспартатные пептидазы были ответственны за большую часть кислой пептидазной активности *B. cinerea*, что было подтверждено ингибиторным анализом с пепстатином. Кроме кислых аспартатных пептидаз, *B. cinerea* секретирует протеолитические ферменты с рН оптимумом, близким к нейтральному. Общая протеолитическая активность, выявленная при нейтральном значении рН, может быть обусловлена активностью сериновых пептидаз, ингибируемых PMSF. Анализ секреции трипсин-подобных пептидаз показал, что низкие значения рН предположительно необходимы для индукции их секреции. Эту гипотезу поддерживает то наблюдение, что, в отличие от субтилизин-подобных ферментов, трипсин-подобные пептидазы рН стабильны в кислых условиях.

Способность *B. cinerea* секретировать вначале аминопептидазы и субтилизин-подобные ферменты, а затем трипсин-подобные пептидазы (рис. 15) может объясняться разными для этих групп пептидаз индуцирующими значениями рН и биомассы, а также выполняемыми ими функциями. Наиболее высокие аминопептидазная и субтилизин-подобная активности, внесшие вклад в ранний пик общей протеолитической активности, наблюдались в условиях, характеризующихся достижением биомассы, достаточной для протеолитической секреции, но не для сильного подкисления среды культивирования. По-видимому, это привело к легкому

понижению значения рН среды (рН 6,5), при котором эти пептидазы еще сохраняют активность. Дальнейшее подкисление среды (приведшее к понижению значения рН до 5,0 и 4,3 на 6-е и 10-е сутки роста, соответственно) коррелировало с резким падением протеолитической активности вследствие возможной кислотной инактивации ранее секретируемых пептидаз. В отличие от них, секреция аспартатных пептидаз, возможно, индуцируется в кислых условиях. Не исключено, что образование этих ферментов происходит только после предварительного действия ранее секретируемых пептидаз, результат действия которых может служить сигналом успешного завершения начальной стадии расщепления белкового субстрата. Это согласуется с выводом, к которому пришли исследователи Staples и Mayer (Staples, Mayer, 1995), о том, что у *B. cinerea* могут существовать две категории атакующих ферментов: вовлеченные в первичную атаку и те, которые появляются, когда действие первых успешно завершено. Полученные данные также показали, что, вероятно, за регуляцию протеолитической секреции и активности отвечает не единичный фактор (рН, время культивирования, биомасса культуры или источник азота), а комплекс факторов. Предполагается, что значение рН среды – фактор, особо важный для функционирования протеолитической системы *B. cinerea* вследствие его возможной способности индуцировать секрецию определенных пептидаз и модулировать активность соответствующих групп протеолитических ферментов.

Внеклеточные ингибиторы трипсина или субтилизина у *B. cinerea* не обнаружены, поэтому можно предположить, что для регуляции внеклеточного протеолиза с участием этих ферментов не требуется секреции их ингибиторов. Роль выявленных внеклеточных ингибиторов ферментов (папаина, бромелаина и химотрипсина), которые не секретировались клетками гриба, возможно, заключается в подавлении защитных ответов у растений (эффекторная функция), однако точные молекулярные мишени этих ингибиторов еще не определены. Эти ингибиторы, по-видимому, не мешают полноценному действию собственных пептидаз и, возможно, участвуют в защите пищевых источников от конкурирующих микроорганизмов.

Таким образом, дифференциальная секреция пептидаз *B. cinerea* предполагает важность последовательного функционирования групп протеолитических ферментов. Ранние и кратковременно высокие аминокатазная или субтилизин-подобная активности, функционирующие при значениях рН, близких к нейтральному, могут обуславливать приобретение экологических преимуществ гриба при конкуренции за пищевой субстрат в процессе его роста как сапротрофа. Также они могут

быть вовлечены в начальные стадии колонизации растительных клеток, что выражается в повреждении поверхности растения вследствие гидролиза структурных белков клеточных стенок до проникновения в ткани, или в активацию зимогенов. Дальнейшее активное образование трипсин-подобных и аспартатных пептидаз, вероятно, необходимо для выполнения других функций, ассоциированных с понижением значений pH. Возможно, специфическая функция позже секретируемых стабильных трипсин-подобных пептидаз по преодолению защитных механизмов хозяев – важная черта фитопатогенов (Dunaevskii et al., 2006). Более того, результаты анализа гомологичных последовательностей и консервативных участков генов, соответствующих трипсинам, указывают, что присутствие генов, кодирующих трипсина или трипсин-подобные белки, представляет собой маркер грибной фитопатогенности (Dubovenko et al., 2010). Вероятно, трипсин-подобные, так же как и, возможно, аспартатные пептидазы, в большей степени необходимы для развития гриба и эффективны после проникновения в растительные ткани, характеризующиеся значениями pH в диапазоне от 3,3 до 6,3 (Manteau et al., 2003), что указывает на роль этих ферментов в фитопатогенезе. О том, что более половины генов секретируемых пептидаз грибов могут специфично экспрессироваться на определенной стадии их жизненного цикла, показано в исследованиях, проведенных Krishnan с коллегами (Krishnan et al., 2018) на *Zymoseptoria tritici*, возбудителе болезни пшеницы.

3.4.3. Внеклеточные пептидазы видов рода *Fusarium*

Представителями грибов, у которых актуально изучение специфики секретируемых пептидаз, являются фитопатогенные виды рода *Fusarium*. Они часто являются возбудителями болезней хвойных деревьев и зерновых культур (Bottalico, Perrone, 2002), вызывают гнили корней (Aoki et al., 2013) и клубней (Desjardins, Plattner, 1989), полегание сеянцев (Литовка, Громовых, 2008).

Каких-либо закономерностей, связанных с патогенностью к проросткам пшеницы исследованных штаммов *F. anguioides* и их протеолитической активностью, не найдено.

Таблица 21. Патогенность штаммов *F. anguioides* к проросткам пшеницы (лабораторный опыт, данные предоставлены Т.Ю. Гагакаевой)

№ кол-ии	Длина проростков, мм	% к контролю	Некроз, балл
103100	3,30	83,3	0,6
108802	2,07	51,9	0,9
111502	2,35	59,2	0,9
119913	2,78	69,8	0,7
КСА	3,98	100,0	0,0

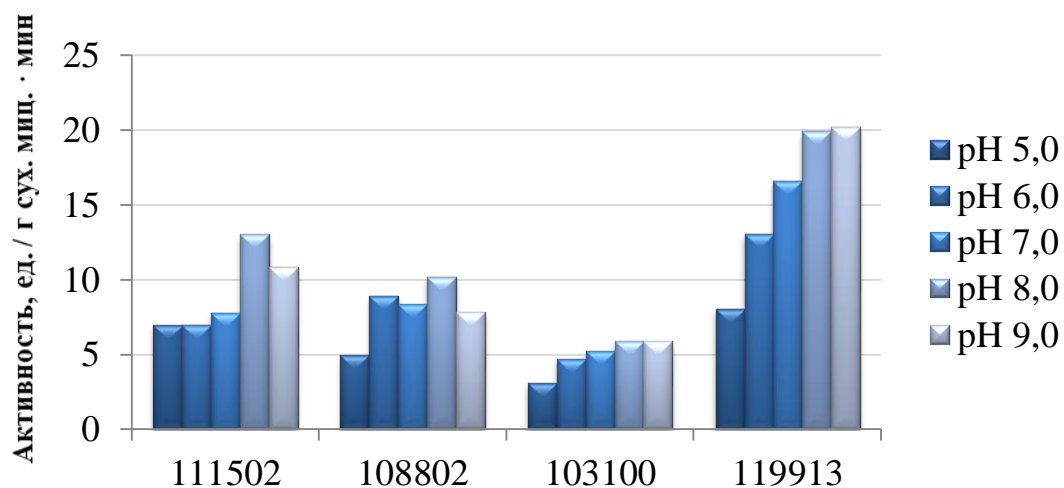


Рис. 21. Общая протеолитическая активность штаммов *F. anguioides* при различных рН испытательной среды

Таблица 22. Патогенность штаммов видов рода *Fusarium* к листьям овса (данные предоставлены Т.Ю. Гагакаевой)

№	Штамм	Некрот, балл	
		Инокул. суспензией конидий	Инокул. инакт. суспензией
1	<i>F. poae</i> MFG 103403	1,25	1,125
2	<i>F. poae</i> MFG 11046	1,75	0,75
3	<i>F. poae</i> MFG 200610	1,25	1
4	<i>F. sibiricum</i> MFG 11014	2	0,75
5	<i>F. sibiricum</i> MFG 11005	1,625	0,625
6	<i>F. sibiricum</i> MFG 200303	2	1,25
7	<i>F. langsethiae</i> MFG 191500	3	1,5
8	<i>F. langsethiae</i> MFG 160710	2,125	1
9	<i>F. sporotrichioides</i> MFG 11018	1,625	1,375
10	<i>F. sporotrichioides</i> MFG 11039	1,375	1,625
11	<i>F. sporotrichioides</i> MFG 163101	2	2

Таблица 23. Общая активность (при рН 7,0) внеклеточных пептидаз в культуральной жидкости (КЖ) некоторых штаммов видов рода *Fusarium* при культивировании в течение 7 суток в жидкой модифицированной среде Чапека с казеином

№	Штамм	Биомасса мицелия, г сух. миц./л	рН КЖ	Общая активность пептидаз при рН 7,0, ед. / г сух. миц.
1	<i>F. poae</i> MFG 103403	13,28	7,0	10,38
2	<i>F. poae</i> MFG 11046	15,59	7,2	8,78
3	<i>F. poae</i> MFG 200610	15,78	7,1	9,87
4	<i>F. sibiricum</i> MFG 11014	13,97	6,0	8,37
5	<i>F. sibiricum</i> MFG 11005	14,86	6,9	3,40
6	<i>F. sibiricum</i> MFG 200303	14,33	6,7	6,76
7	<i>F. langsethiae</i> MFG 191500	13,65	7,3	14,43
8	<i>F. langsethiae</i> MFG 160710	25,91	7,2	5,40
9	<i>F. sporotrichioides</i> MFG 11018	12,36	7,1	11,78
10	<i>F. sporotrichioides</i> MFG 11039	17,77	7,3	9,69
11	<i>F. sporotrichioides</i> MFG 163101	14,85	6,8	6,81

Таблица 24. Влияние ингибиторов на общую активность пептидаз в КЖ некоторых штаммов видов рода *Fusarium* при культивировании в жидкой среде с казеином

№	Штамм	Остаточная активность КЖ, %		
		PMSF ¹	EDTA ²	E-64 ³
1	<i>F. poae</i> MFG 103403	18,3	84,8	95,0
2	<i>F. poae</i> MFG 11046	18,5	80,5	100
3	<i>F. poae</i> MFG 200610	7,5	100	100
4	<i>F. sibiricum</i> MFG 11014	19,1	93,4	100
5	<i>F. sibiricum</i> MFG 11005	13,6	81,3	98,2
6	<i>F. sibiricum</i> MFG 200303	5,4	92,2	100
7	<i>F. langsethiae</i> MFG 191500	35,3	90,6	88,6
8	<i>F. langsethiae</i> MFG 160710	14,8	84,6	98,9
9	<i>F. sporotrichioides</i> MFG 11018	1,5	90,0	100
10	<i>F. sporotrichioides</i> MFG 11039	22,2	98,2	92,6
11	<i>F. sporotrichioides</i> MFG 163101	7,4	99,1	97,8

¹0,5 мМ

²10 мМ

³0,01 мМ

Все исследованные штаммы таких видов рода *Fusarium*, как *F. poae*, *F. sibiricum*, *F. langsethiae* и *F. sporotrichioides* секретировали в среду культивирования пептидазы, активные при pH 7,0 (таблица 23). Наиболее активным продуцентом пептидаз среди штаммов этих видов является *F. langsethiae* MFG 191500. Примечательно, что именно этот штамм вызывал

наиболее сильный некроз тканей листьев овса при их инокуляции споровой суспензией (таблица 22). Ингибиторный анализ культуральной жидкости штаммов показал, что в протеолитическую активность (при pH 7,0) вносят наибольший вклад сериновые пептидазы (таблица 24). Эффект действия ингибиторов таких классов пептидаз, как металлопептидазы (EDTA) и цистеиновые (E-64), был гораздо более слабым по сравнению с действием ингибитора сериновых пептидаз (PMSF).

Общая протеолитическая активность у штаммов *F. anguoides* и *F. roseum* варьировала в диапазоне от 4,7 до 19,9 ед./г мицелия, и проявляли они ее в исследованном диапазоне значений pH (таблица 9). Общая протеолитическая активность у штаммов *F. anguoides* была более высокой при щелочных условиях (таблица 9, рис. 21), а у штамма *F. roseum* – при нейтральном значении pH. Она увеличивалась к концу периода культивирования обоих штаммов (рисунки 22, 23).

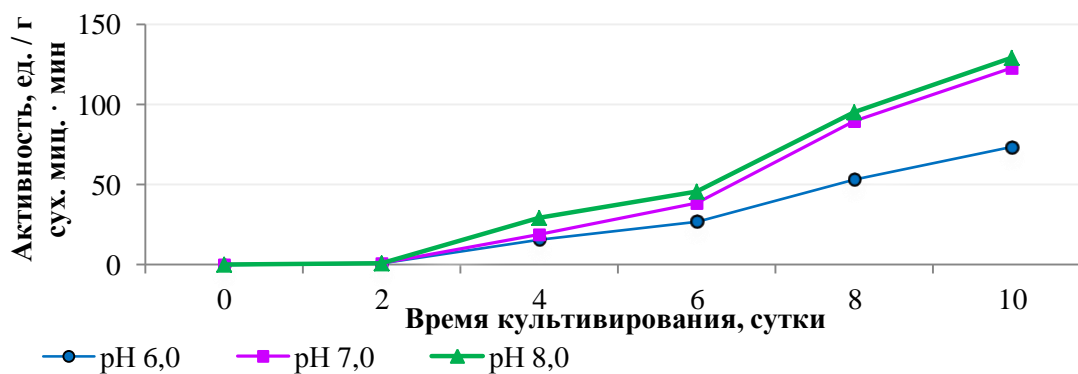


Рис. 22. Динамика общей активности внеклеточных пептидаз *F. anguoides* MFG 119913 при культивировании в жидкой среде

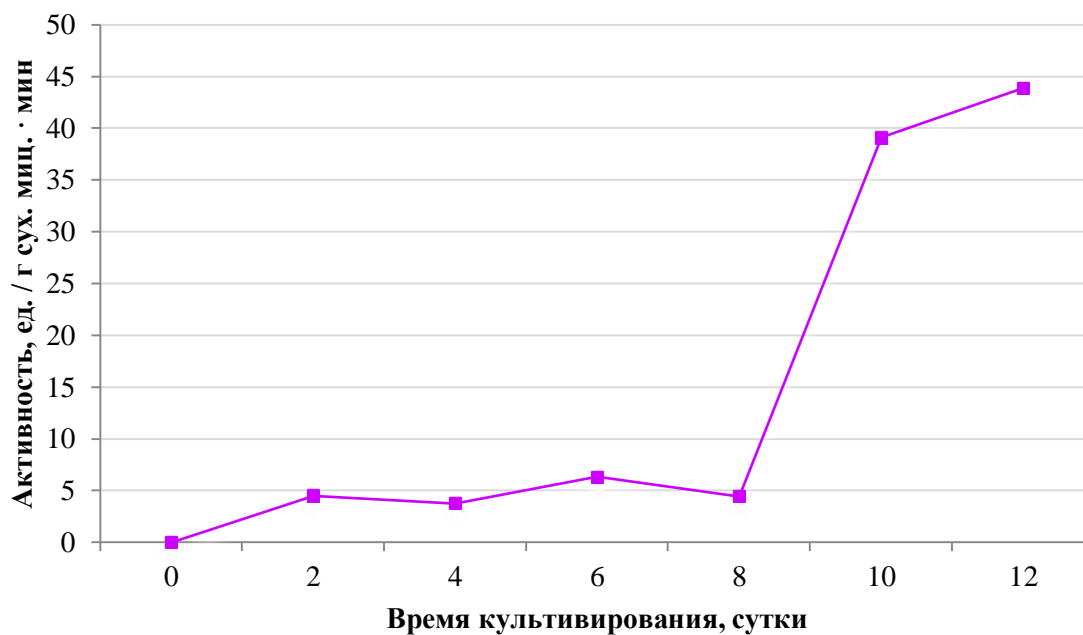


Рис. 23. Динамика общей активности (при pH 7,0) внеклеточных пептидаз *F. roseum* Fuckel ВКПМ F-900 при культивировании в жидкой среде

Данные, полученные нами на различных видах и штаммах рода *Fusarium*, согласуются с результатами исследований Пеккаринена с коллегами (Pekkarinen et al., 2003), свидетельствующими о высокой активности пептидаз при щелочных pH у фитопатогенов *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* и *F. poae*.

Все штаммы *F. anguoides* и *F. roseum* продуцировали трипсин- и субтилизин-подобные эндопептидазы, а также экзопептидазы (лейцин- и фенилаланинаминопептидазы) (таблица 10).

Активность сериновых протеаз у *F. anguoides* MFG 119913 впервые детектировалась на 4-е сутки, у *F. roseum* – на 2-е сутки и достигала максимума к концу периода культивирования, к 8 – 10-м суткам роста штаммов (рисунки 24, 25). Возможно, образование трипсин-подобных ферментов у фитопатогенов, наблюдаемое на 4 – 6-е сутки роста, происходит в ответ на изменение значения pH в процессе культивирования, резкое уменьшение которого было отмечено на 4-е сутки роста культур (рисунки 13, 14). Значительная активность экзопептидаз у обеих культур обнаруживалась уже на 2-е сутки культивирования.

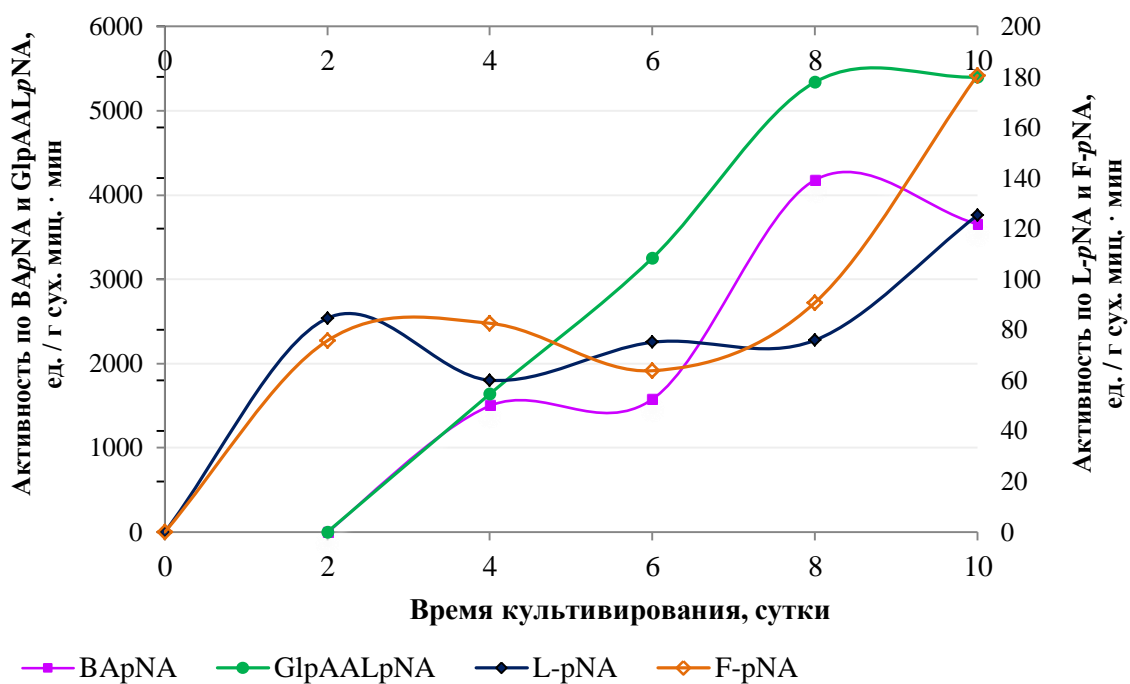


Рис. 24. Динамика субстрат-специфичной протеолитической секреции *F. anguoides* MFG 119913 в жидкой среде

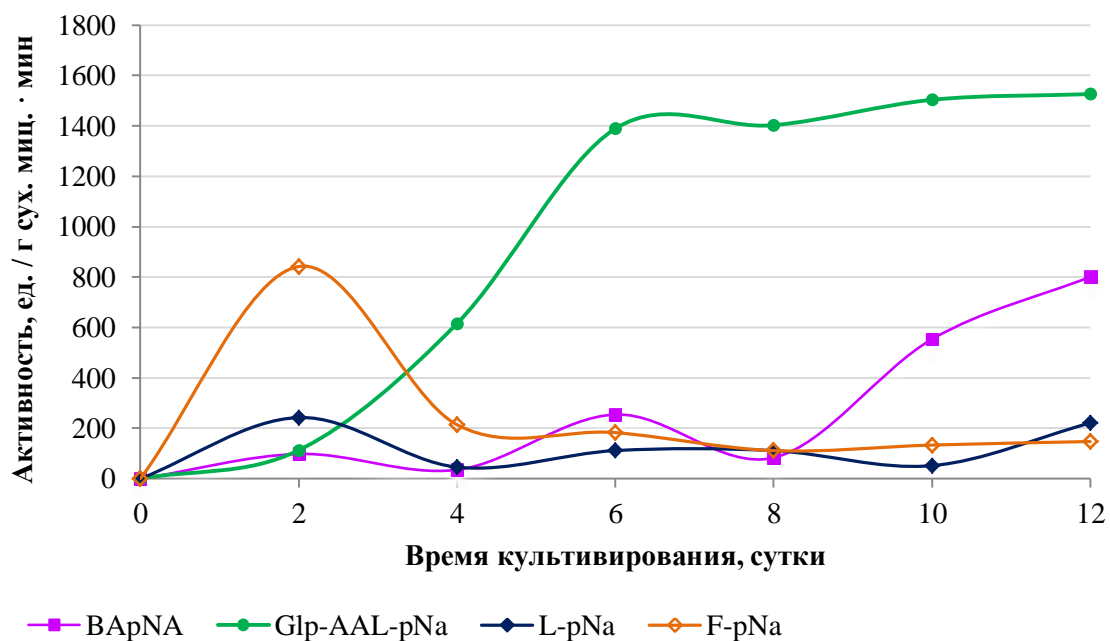


Рис. 25. Динамика субстрат-специфичной протеолитической секреции *F. roseum* Fuckel ВКПМ F-900 в жидкой среде

Таблица 25. Влияние возраста и ассоциированных с ним особенностей культуры *F. anguioides* на общую активность внеклеточных протеаз

Штамм	Возраст культуры, сутки	Биомасса мицелия, г сух. миц./л	рН КЖ	Активность, ед. /г сух. миц. · мин		
				рН 4,0	рН 7,0	рН 9,0
MFG 108802	4	2,07	6,9	0,40	1,21	1,61
	7	10,29	6,8	8,91	8,34	10,21
	10	10,05	6,9	10,29	9,79	11,53

Секретируемые пептидазы у штаммов характеризовались неодинаковыми уровнями активности (рисунки 24, 25). Активность субтилизин-подобных пептидаз у обеих культур штаммов превышала активности трипсин-подобных ферментов начиная с 4-х суток. Общая протеолитическая активность также зависела от возраста культур (таблица 25).

По литературным данным, род *Fusarium* является одной из наиболее изученных групп грибов как продуцентов пептидаз. В работе Pekkarinen et al. (2000) показано, что патогены злаковых растений *F. culmorum*, *F. graminearum* и *F. roae* образовывали пептидазы, активные в диапазоне рН от 6 до 10 и наиболее активные при рН 9,0, в среде, содержащей глютен. Трипсин-подобная пептидаза была очищена из глютен-содержащей культуральной жидкости *F. culmorum* (Pekkarinen, Jones, 2002). Дополнительно *F. roae* образовывал кислую (-ые) пептидазу (-ы) с оптимумом рН 3,0 – 3,5 (Pekkarinen et al., 2000). Пептидазная активность не была выявлена у этих трех видов рода *Fusarium* при их росте в минеральной среде, хотя невысокий уровень протеолитической активности был отмечен после истощения в среде углеродного субстрата – глюкозы.

При росте трех видов рода *Fusarium* на зернах ячменя их протеолитическая активность была сходна с той, которая обнаруживалась у культур при росте в глютен-содержащей среде (выявлялись нейтральные и щелочные пептидазы) (Pekkarinen et al., 2000).

Более высокий уровень общей активности наблюдали при использовании в качестве индуктора секреции пептидаз растительных клеточных стенок в сравнении с казеином (таблица 16). При этом, как видно из таблицы 17, отношение между активностями трипсин- и субтилизин-

подобных ферментов значительно возрастало при росте *F. roseum* в среде с клеточными стенками. Большое повышение активности трипсин-подобных пептидаз по сравнению с субтилизин-подобными происходило и у штамма другого вида – *F. anguioides* MFG 108802.

Максимальная активность внеклеточных пептидаз у штамма *F. roseum* в присутствии растительных клеточных стенок наблюдалась в щелочных условиях (при pH 8,0) (таблица 16), что, в совокупности с данными о более резком росте трипсин-подобной активности, позволяет предположить большую значимость щелочных трипсин-подобных пептидаз для грибов в фитопатогенезе.

Определение молекулярных масс сериновых протеиназ у представителей двух видов рода *Fusarium*, проведенное в условиях FPLC на Superose 200, показало, что *F. anguioides* MFG 108802 и *F. roseum* секретируют субтилизин-подобные ферменты с молекулярной массой 213,8 кДа и трипсин-подобные пептидазы, различающиеся по молекулярной массе (16,2 и 22,9 кДа, соответственно).

Согласно нашим данным, у большинства представителей сапротрофов активность трипсин-подобных пептидаз отсутствует, а если и обнаруживается, то значительно более слабая (Dubovenko et al., 2010). При сопоставлении спектра и уровней активностей у фитопатогенов, исследованных в данной работе, и, в частности, у штаммов микромицетов-сапротрофов рода *Trichoderma* выявлен ряд особенностей протеолитической активности у фитопатогенов. В отличие от сапротрофов, все исследованные штаммы фитопатогенов *F. anguioides* и *F. roseum* имели более высокие значения общей протеолитической активности и активности трипсин-подобных пептидаз (таблица 9, 10), что поддерживает высказанное предположение о биологической роли этих пептидаз в фитопатогенезе (Dubovenko et al., 2010).

Таким образом, все исследованные штаммы фитопатогенных микромицетов *F. anguioides* и *F. roseum* секретировали пептидазы, активные в диапазоне pH от 6,0 до 8,0. Все они имели более высокую экзопептидазную активность по ароматическим аминокислотам (фенилаланинаминопептидазная активность) по сравнению с активностью по алифатическим аминокислотам (лейцинаминопептидазная активность). Оптимальными условиями для общей протеолитической активности (с казеином) у изученных штаммов грибов были нейтральные-слабощелочные значения pH: у *F. anguioides* – pH 8,0, у *F. roseum* – pH 7,0. При наличии растительных клеточных стенок в среде происходил сдвиг соотношения активностей сериновых пептидаз у *F. roseum* в сторону увеличения трипсин-

подобной активности. Имеются данные, что у видов, принадлежащих к роду *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. graminearum* и *F. poae*), образование щелочных пептидаз коррелирует с более высокой их степенью патогенности (Pekkarinen et al., 2003). В связи с этим, можно полагать, что при инфицировании растений щелочные трипсин-подобные пептидазы у фитопатогенных грибов рода *Fusarium* имеют особую функциональную значимость.

3.4.4. Внеклеточные пептидазы представителей рода *Trichoderma*

Все исследованные штаммы триходерм секретировали внеклеточные пептидазы (таблица 8, 9, 10). Их уровень активности варьировал, достигая при слабокислом значении pH (pH 6,0) максимального значения (кроме штамма *T. asperellum* К-1).

Как показал ингибиторный анализ с PMSF (таблица 8), около 48 % общей протеолитической активности при pH 7,0 у *Trichoderma* sp. (штамм 1) обусловлено активностью сериновых пептидаз. Вклад сериновых пептидаз в общую активность пептидаз у штаммов вида *T. asperellum* был приблизительно одинаковым и составлял около 28 %. Наименьшим вкладом сериновых пептидаз (приблизительно 5 %) в общую протеолитическую активность среди изученных штаммов характеризовался штамм *Trichoderma* sp. (штамм 2).

Штаммы *Trichoderma* sp. (1) и (2) при кислом значении культуральной жидкости (pH 4,6, таблицы 9, 10) секретировали трипсин-подобные пептидазы, способные сохранять активность при низких значениях pH среды. Субтилизин-подобные пептидазы у этих штаммов выявлены не были. Штаммы же вида *T. asperellum* не секретировали трипсин-подобные пептидазы, но образовывали внеклеточные субтилизин-подобные ферменты при значениях pH культуральной жидкости, близких к нейтральному (табл. 8, 9).

По данным ингибиторного анализа с пепстатином (таблица 8), исследованные штаммы микромицетов образовывали также аспартатные пептидазы, выявленные при pH 4,0. Их вклад в общую протеолитическую активность при данном значении pH был различным у разных штаммов.

Определение молекулярной массы сериновой пептидазы у *Trichoderma* sp. (1), проведенное в условиях FPLC на Superose 200, показало, что этот штамм секретировал трипсин-подобную пептидазу с молекулярной массой 16,2 кДа.

Анализ секреции пептидаз у штамма *T. asperellum* Mg-6, одного из наиболее сильных продуцентов сериновых субтилизин-подобных ферментов на среде с казеином в качестве индуктора, показал, что достижение

максимального значения как общей, так и субтилизин-подобной активностей у штамма происходит на 4-е сутки культивирования (рис. 26, 27), когда культура находится в ранней экспоненциальной фазе роста и исходное значение рН среды (рН 7,1) заметно уменьшается, достигая рН 6,2.

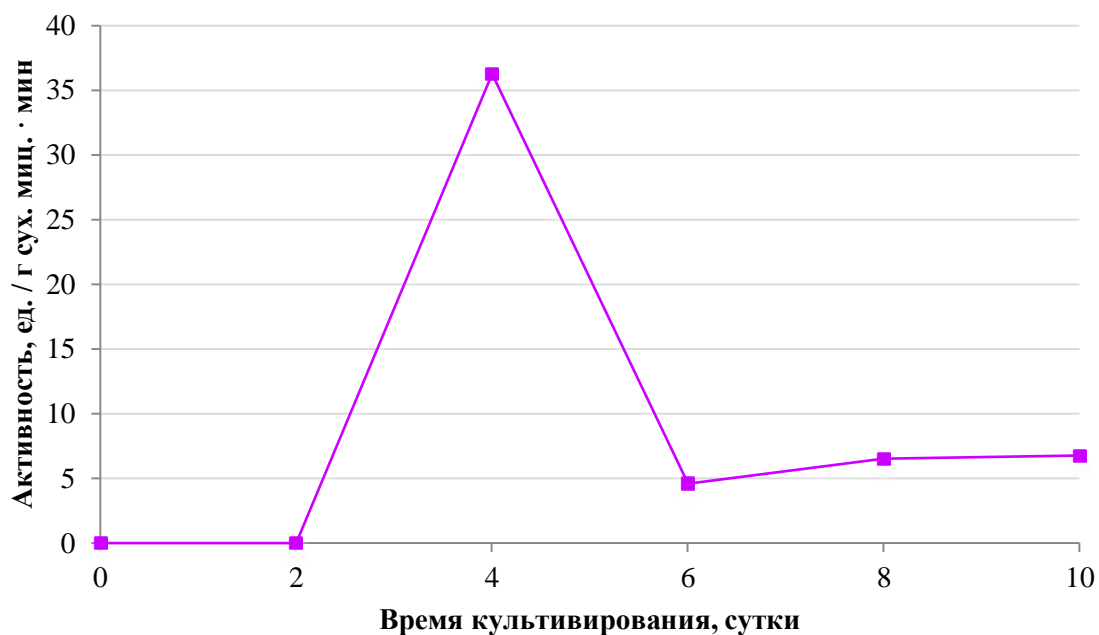


Рис. 26. Динамика активности (при рН 7,0) внеклеточных пептидаз *T. asperellum* Mg-6 при культивировании в жидкой среде

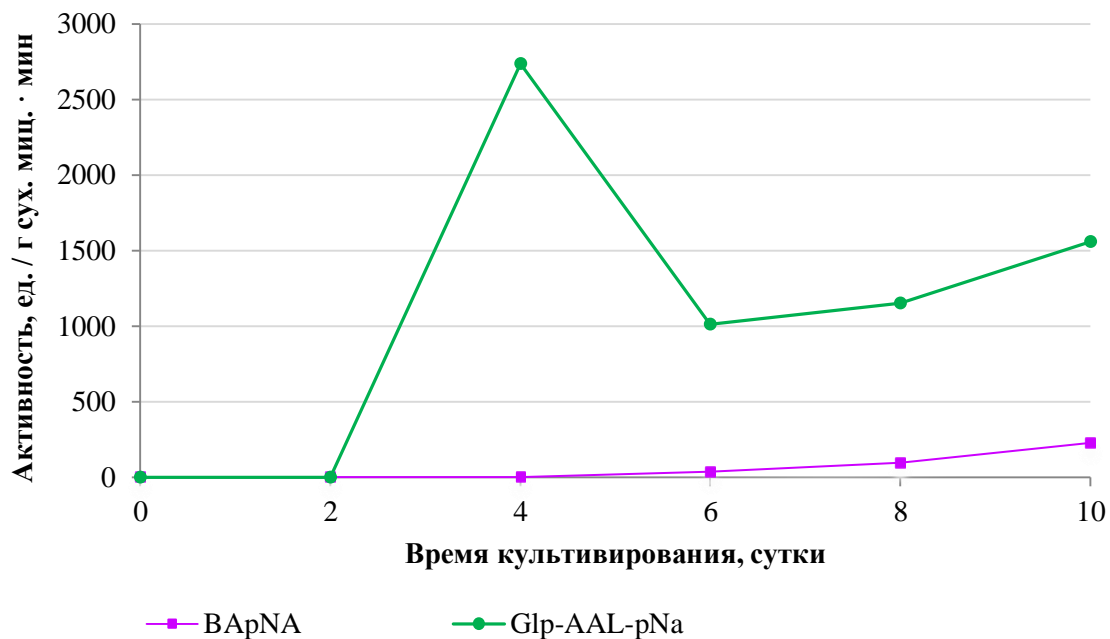


Рис. 27. Динамика субстрат-специфичной протеолитической секреции *T. asperellum* Mg-6 в жидкой среде

В отличие от результатов работы Shakeri и Foster (Shakeri, Foster, 2007), показавших, что образование протеолитических ферментов у двух штаммов *Trichoderma harzianum* в жидкой среде Чапека-Докса происходит в экспоненциальной фазе роста и достигает максимума в начале стационарной фазы (на 7-ой день культивирования), нами отмечено падение активностей пептидаз на 6-е сутки роста культуры (рисунки 26, 27). В это время достигается наименьшее значение рН среды (рН 5,4, рис. 15), которое, возможно, и обуславливает падение активности субтилизин-подобных ферментов. Учитывая, что трипсин-подобные пептидазы штамм не секретирует на использованной среде, это уменьшение активности распространяется и на всю общую протеолитическую активность, обусловленную, вероятно, главным образом активностью субтилизин-подобных ферментов. Эти факты могут свидетельствовать о регуляторном влиянии рН на активность и секрецию этих пептидаз у штамма *T. asperellum* Mg-6.

Кроме того, в работе Šimkovič et al. (2008) показано, что у *Trichoderma viride* индукторами протеолитической секреции могут быть также бычий сывороточный альбумин и овальбумин.

Таким образом, используя казеин в качестве индуктора синтеза и секреции пептидаз, мы выявили способность штаммов рода *Trichoderma* образовывать внеклеточные сериновые пептидазы. Однако следует отметить, что активные штаммы-продуценты секретируют не только сериновые пептидазы, но и протеолитические ферменты других групп, в частности, аспартатные пептидазы. По-видимому, большинство исследованных в работе штаммов секретируют комплекс протеолитических ферментов, из которого сериновые пептидазы по активности занимают довольно значительную часть (таблица 4). Работами ряда исследователей (Viterbo et al., 2004; Suárez et al., 2005) также показана способность некоторых триходерм образовывать аспартатные пептидазы, что согласуется с нашими данными. Можно предположить, что значение рН окружающей среды является одним из факторов, определяющих активность и функции той или иной группы пептидаз в природе. Так, активность сериновых пептидаз существенна при нейтральном значении рН.

Таблица 26. Ингибиторная активность культуральной жидкости некоторых штаммов рода *Trichoderma* по отношению к папаину, бромелаину, трипсину, химотрипсину и субтилизину

Штамм микромицета	Степень ингибирования, %				
	папаина	бромелаина	трипсина	химотрипсина	субтилизина
<i>Trichoderma</i> sp. (1)	70	0	59	0	0
<i>Trichoderma</i> sp. (2)	17	0	80	6	0
<i>T. asperellum</i> Mg-6	82	0	65	0	0
<i>T. asperellum</i> K-1	87	0	71	0	0
<i>Trichoderma</i> sp. (верх. т.)	100	100	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	95	100	0	0	0
<i>Trichoderma</i> sp. Gt-2	100	89	0	0	0
<i>Trichoderma</i> sp. ТВ 4-1	100	78	0	0	0

Среди исследованных представителей рода *Trichoderma* выявлены продуценты внеклеточных ингибиторов цистеиновых пептидаз (папаина и бромелаина) и трипсина (таблица 26). Интересно отметить, что ингибиторы (различного уровня активности) папаина секретировали все исследованные штаммы данного рода, тогда как продуцентов ингибиторов химотрипсина и субтилизина среди них отмечено не было. Полученные результаты указывают на возможность участия выявленных ингибиторов как в регуляции активности некоторых пептидаз (например, трипсин-подобных), так и в защите пищевых источников и гриба от действия пептидаз конкурирующих микроорганизмов.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о потенциале грибных пептидаз функционировать как при кислых, так и нейтрально-щелочных условиях. Согласно полученным результатам, большинство исследованных штаммов грибов продуцировали внеклеточные сериновые пептидазы, что было показано ингибиторным анализом и гидролизом *n*-нитроанилидных субстратов, специфичных для трипсин- и субтилизин-подобных ферментов.

Как показали наши исследования, именно трипсин-подобные пептидазы, вероятно, ответственны, наряду с другими факторами патогенности, за проявление паразитических свойств у фитопатогенных микромицетов.

У культур с ярко выраженной V-образной кривой зависимости значений рН от времени культивирования была выше общая протеолитическая активность при нейтральном и щелочном значении рН. Возможно, наличие значительной активности аспартатных пептидаз у некоторых грибов обусловлено их существованием в природных средах с пониженным значением рН, которое создается и поддерживается как самими грибами, так и соседями по занимаемой экологической нише (что выявляется у некоторых штаммов *T. asperellum*, секретирующих аспартатные пептидазы и при значении рН, близком к нейтральному).

Результаты работы показали, что на секрецию пептидаз мицелиальными микромицетами влияют такие факторы, как возраст культуры, значение рН среды культивирования, концентрация кислорода, источник азота и штаммовая принадлежность. При исследовании секреции и активности протеолитических ферментов у различных представителей нескольких распространенных родов мицелиальных микромицетов – *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* и *Trichoderma* – отмечен ряд их особенностей. Среди них – положительная корреляция между секрецией трипсин-подобных пептидаз и образованием меланинов у *A. linariae*; разделенная во времени секреция отдельных групп пептидаз у *B. cinerea*; наиболее высокая протеолитическая активность при щелочных условиях у большинства представителей рода *Fusarium*; секреция всеми изученными штаммами *Trichoderma* ингибиторов папаина.

4. Заключение

Как хемогетеротрофы, мицелиальные грибы секретируют большой спектр полимер-расщепляющих гидролаз, в том числе пептидазы, которые, наряду с другими ферментами, приводят к распаду органического материала, что необходимо для обеспечения растущих гиф питательными веществами. Многие грибы образуют органические кислоты, вызывающие подкисление среды, и одновременно секретируют ферменты, часто обладающие соответствующим данным условиям оптимумом активности.

Как показал анализ литературных данных, в последнее время пристальное внимание привлечено к установлению роли различных пептидаз на разных этапах жизнедеятельности мицелиальных грибов, в частности, в фитопатогенезе. Это связано с тем, что, во-первых, активно развивающиеся отрасли биотехнологии все чаще рассматривают фитопатогенные грибы как перспективных продуцентов тех или иных групп пептидаз. Во-вторых, кроме биотехнологических целей, фитопатогенные штаммы грибов используются как модельные объекты изучения вклада пептидаз в проявление фитопатогенных свойств у грибов. Это необходимо для разработки рациональных методов антигрибной защиты растений.

Учитывая, что функции протеолитических ферментов у эукариот многочисленны, но у грибов недостаточно исследованы, актуально проведение работ, посвященных изучению отличительных особенностей активности и секреции пептидаз, определяющих вместе с другими ферментами трофический статус грибов.

Целью данной работы явилось комплексное исследование внеклеточных протеолитических систем представителей различных экологических групп мицелиальных микромицетов. Изучение основывалось на их идентификации, определении общей и класс-специфической протеолитической активности, действии различных факторов среды (рН, различных концентраций кислорода, наличия или отсутствия индукторов синтеза пептидаз) на эту активность, исследовании физико-химических свойств некоторых пептидаз и выявлении их ингибиторов. В ходе работы проведен скрининг продуцентов среди культур 26 штаммов мицелиальных грибов. Исследована динамика развития активностей пептидаз при росте грибов в жидких культурах. Наибольший акцент в работе сделан на установлении возможной роли пептидаз в развитии фитопатогенного процесса, чему главным образом способствовали результаты по активности пептидаз при росте грибов в среде с растительными клеточными стенками и комплексный анализ протеолитической активности некротрофного вида *B. cinerea*.

Выявлены наиболее активные продуценты пептидаз: *F. anguioides* MFG 108802 и MFG 119913, *F. roseum* ВКПМ F-900. Как правило, культуры данных штаммов характеризовались довольно значительной биомассой. Эти штаммы перспективны как возможные объекты для биотехнологии, а также, будучи фитопатогенами, интересны с точки зрения рассмотрения их протеолитических ферментов как возможных участников взаимодействия растение-патоген.

Полученные данные показали, что грибы-фитопатогены способны секретировать как кислые и нейтральные, так и щелочные пептидазы. Помимо внеклеточных пептидаз, для фитопатогенных грибов рода *Alternaria* отмечено присутствие меланина, образование которого коррелировало с патогенностью грибов. Это подтверждает представление о многокомпонентности факторов патогенеза, демонстрируя, что за проявление фитопатогенных свойств, по-видимому, ответственны не только выявленные протеолитические ферменты, но и комплекс других соединений, которые в совокупности с гидролитическими ферментами определяют эколого-трофический статус гриба и способствуют развитию патогенного процесса.

Фитопатогенез – сложный комплексный процесс, требующий участия многих биологически активных соединений грибов. Идентификация молекулярных компонентов этого процесса – важный шаг к пониманию механизмов, лежащих в его основе.

Наши данные показали, что штаммы грибов секретируют разнообразные внеклеточные пептидазы при использовании белкового субстрата в качестве индуктора их секреции. Разнообразие касается как оптимума рН грибных пептидаз, так и их способности расщеплять различные субстраты. Возможно, не все идентифицированные протеолитические ферменты участвуют в фитопатогенезе в природе; скрининг пептидаз, секретируемых в жидкой среде с казеином, отразил потенциал штаммов образовывать внеклеточные протеолитические ферменты. При этом некоторые их важнейшие особенности, такие, как оптимум рН и динамика секреции, раскрывают их свойства, присущие им и в природных условиях. С целью изучения воздействия протеолитических ферментов на растение мы использовали растительные клеточные стенки – главный барьер при грибном поражении растений. Обнаружено, что смена индуктора приводит к количественным, но не качественным изменениям в спектре протеолитических ферментов, который при росте грибов как в среде с клеточными стенками, так и с казеином, одинаков; различия же касаются только уровней их активности. При этом отмечена роль трипсин-подобных

пептидаз в модельной системе фитопатогенеза; роль остальных пептидаз в этом процессе пока не ясна.

Как показали результаты, общая протеолитическая активность у исследованных микромицетов выявлялась на 2 – 4-е сутки и достигала максимума либо на 4-е сутки роста культур (для штаммов *B. cinerea* и *T. asperellum* Mg-6), либо усиливалась к концу периода культивирования, на 10 – 12 сутки (как в случае *F. anguioides* MFG 119913 и *F. roseum* ВКПМ F-900). При этом наибольшую активность грибные пептидазы проявляли как в кислых (у *B. cinerea*), так и в щелочных условиях (у *F. anguioides* MFG 119913) испытательной среды, что говорит о необходимости разных значений рН как индуцирующих факторов. Вместе с тем общая протеолитическая активность этих двух штаммов выявлялась при всех исследованных значениях рН испытательной среды (от кислых до основных). Это свидетельствует о гибкости протеолитических систем грибов-фитопатогенов, чьи ферменты могут функционировать при разных значениях рН среды роста в природных условиях.

Для протеолитической системы *B. cinerea* оказались характерны разделенные во времени появления и достижения максимума активности аминопептидаз, субтилизин- и трипсин-подобных ферментов. Для всех штаммов исследованных грибов (кроме *A. linariae* MF-P680-021) был выявлен довольно ранний пик активности аминопептидаз. В целом развитие во времени активностей различных классов пептидаз у изученных грибов не одинаково и носит по крайней мере видоспецифический характер.

Интерес представляет тот факт, что среди некоторых штаммов с проверенной наиболее сильной патогенностью имеются культуры с наиболее высокой общей протеолитической активностью (у *F. langsethiae* и *A. linariae*). Полученные нами данные также свидетельствуют в пользу того, что некоторые пептидазы мицелиальных грибов могут выступать в качестве факторов патогенности и участвовать в развитии этого процесса на определенных этапах патогенеза, таких как проникновение в ткани организма-хозяина и выживание в новых условиях.

5. Выводы

1. Спектр пептидаз, секретируемых мицелиальными грибами, относящимися к различным таксонам и эколого-трофическим группам, в основном, видоспецифичен, тогда как количественные характеристики секретируемых ферментов – штаммоспецифичны.
2. Синтез и секреция пептидаз связаны с определенными фазами развития гриба. Индуктором их появления может выступать изменение рН среды в процессе культивирования.
3. Появление и уровень пептидаз в среде зависят от наличия в среде культивирования белкового субстрата либо в виде отдельного белка, либо сложной структуры, содержащей белок в своем составе (клеточные стенки).
4. Для исследованных фитопатогенов характерно присутствие в среде трипсин-подобных пептидаз, которые могут рассматриваться как маркеры и участники патогенного процесса.
5. У сильных патогенов, кроме пептидаз, в качестве факторов вирулентности могут использоваться и другие метаболиты – меланины и ингибиторы пептидаз.

6. Благодарности

Выражаю благодарность научным руководителям – Я.Е. Дунаевскому и Г.А. Беляковой – за всегда внимательное отношение к проводимым мной исследованиям и диссертационной работе в целом. Хотела бы поблагодарить М.А. Белозерского за помощь в организации экспериментов и предоставленную возможность их проводить. За предоставленные штаммы благодарна Ф.Б. Ганнибалу, Т.Ю. Гагкаевой, Е.Н. Биланенко и А.Н. Лихачеву. Также выражаю благодарность А.В. Куракову за научные консультации и предоставленные штаммы грибов.

7. Список литературы

1. Биссвангер Х., 2013. Практическая энзимология. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 328 с.
2. Бородин С.Г., Котлярова И.А., 2005. Биологические особенности грибов рода *Fusarium* Link. на сое и подсолнечнике. Масличные культуры, вып. 2 (133), 19 – 23.
3. Егоров Н.С., 2004. Основы учения об антибиотиках. 6-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ; Наука. – 528 с.
4. Желдакова Р.А., Мямин В.Е., 2006. Фитопатогенные микроорганизмы. – Мн.: БГУ. – 116 с.
5. Немова Н.Н., Бондарева Л.А., 2008. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов. Биомедицинская химия, **54**, вып. 1., 42 – 57.
6. Abidi F., Aissaoui N., Chobert J.M., Haertlé T., Marzouki M.N., 2014. Neutral serine protease from *Penicillium italicum*. Purification, biochemical characterization, and use for antioxidative peptide preparation from *Scorpaena notata* muscle. Appl Biochem Biotechnol, **174**, № 1, 186 – 205.
7. Abidi F., Limam F., Nejib M.M., 2008. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economy raw materials: assay as biodetergent. Process Biochemistry, **43**, 1202 – 1208.
8. Alves M.H., de Campos-Takaki G.M., Okada K., Pessoa I.H.F., Milanez A.I., 2005. Detection of extracellular protease in *Mucor* species. Rev Iberoam Micol, **22**, 114 – 117.
9. Amselem J., Cuomo C.A., van Kan J.A.L., Viaud M., Benito E.P., Couloux A., Coutinho P.M., de Vries R.P., Dyer P.S., Fillinger S., Fournier E., Gout L., Hahn M., Kohn L., Lapalu N., Plummer K.M., Pradier J.-M., Quévillon E., Sharon A., Simon A., ten Have A., Tudzynski B., Tudzynski P., Wincker P., Andrew M., Anthouard V., Beever R.E., Beffa R., Benoit I., Bouzid O., Brault B., Chen Z., Choquer M., Collémare J., Cotton P., Danchin E.G., Da Silva C., Gautier A., Giraud C., Giraud T., Gonzalez C., Grossetete S., Güldener U., Henrissat B., Howlett B.J., Kodira C., Kretschmer M., Lappartient A., Leroch M., Levis C., Mauceli E., Neuvéglise C., Oeser B., Pearson M., Poulain J., Poussereau N., Quesneville H., Rasclé C., Schumacher J., Ségurens B., Sexton A., Silva E., Sirven C., Soanes D.M., Talbot N.J., Templeton M., Yandava C., Yarden O., Zeng Q., Rollins J.A., Lebrun M.-H., Dickman M., 2011. Genomic analysis of the

necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. PloS Genetics, **7**, № 8, 27 pp.

10. Anand T., Bhaskaran R., Raguchander T., Karthikeyan G., Rajesh M., Senthilraja G., 2008. Production of cell wall degrading enzymes and toxins by *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata* causing fruit rot of chillies. Journal of Plant Protection Research, **48**, № 4, 437 – 451.

11. Andersen B., Dongo A., Pryor B.M., 2008. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. Mycological Research, **112**, 241 – 250.

12. Andersen B., Nielson K.F., Fernandez P.V., Patriarca A., 2015. Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blackberry, tomato, walnut and wheat. Int. J. Food Microbiol., **196**, 1 – 10.

13. Aoki T., O'Donnell K., Geiser D.M., 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. J Gen Plant Pathol, 13 pp.

14. Asgian J.L., James K.E., Li Z.Z., Carter W., Barrett A.J., Mikolajczyk J., Salvesen G.S., Powers J.C., 2002. Aza-peptide epoxides: a new class of inhibitors selective for clan CD cysteine peptidases. J. Med. Chem., **45**, 4958 – 4960.

15. Ayres J.S., Schneider D.S., 2008. Two ways to survive an infection: what resistance and tolerance can teach us about treating for infectious diseases. Nat. Rev. Immunol., **8**, № 11, 889 — 895.

16. Bajuk B.P., Zdovk I., Smrekar V., Križaj I., Leonardi A., Košorok M.D., 2011. Dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* produces cysteine protease inhibitor. Acta Chim. Slov., **58**, 33 – 40.

17. Bara M.T.F., Lima A.L., Ulhoa C.J., 2003. Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. FEMS Microbiology Letters, **219**, 81 – 85.

18. Barata R.A., Andrade M.H.G., Rodrigues R.D., Castro I.M., 2002. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. Journal of Bioscience and Bioengineering, **94**, № 4, 304 – 308.

19. Barrett A.J., 1994. Classification of peptidases. Methods in enzymology, **244**, 15 pp.

20. Barrett A.J., 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods in enzymology*, **244**, 15 pp.
21. Bateman D.F., Beer S.V., 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **55**, 204 – 211.
22. Beck I., Fink G.R., Wolf D.H., 1980. The intracellular proteinases and their inhibitors in yeast. A mutant with altered regulation of proteinase A inhibitor activity. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4821 – 4828.
23. Bertenshaw G.P., Norcum M.T., Bond J.S., 2003. Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J. Biol. Chem.*, **278**, 2522 – 2532.
24. Berto P., Belingheri L., Dehorter B., 1997. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. *Biotechnology Letters*, **19**, № 6, 533 – 536.
25. Boenisch M.J., Schäfer W., 2011. *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology*, **11**, 13 pp.
26. Boguslawski G., Shultz J.L., Yehle C.O., 1983. Purification and characterization of an extracellular protease from *Flavobacterium arborescens*. *Anal. Biochem.*, **132**, 41 – 49.
27. Boitano S., Flynn A.N., Sherwood C.L., Schulz S.M., Hoffman J., Gruzina I., Daines M.O., 2011. *Alternaria alternata* serine proteases induce lung inflammation and airway epithelial cell activation via PAR2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **300**, № 4, 605 — 614.
28. Bottalico A., Perrone G., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 611 – 624.
29. Brakhage A.A., 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 21 – 32.
30. Brakhage A.A., Bruns S., Thywissen A., Zipfel P.F., Behnsen J., 2010. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol*, **13**, 409 – 415.

31. Budak S.O., Zhou M., Brouwer C., Wiebenga A., Benoit I., Di Falco M., Tsang A., de Vries R.P., 2014. A genomic survey of proteases in *Aspergilli*. *BMC Genomics*, **15**, № 523, 15 pp.
32. Chandrasekaran M., Chandrasekar R., Chun S.C., Sathiyabama M., 2016. Isolation, characterization and molecular three-dimensional structural predictions of metalloprotease from a phytopathogenic fungus, *Alternaria solani* (Ell. And Mart.) Sor. *J Biosci Bioeng*, **122**, № 2, 131 – 139.
33. Chandrasekaran M., Sathiyabama M., 2014. Production, partial purification and characterization of protease from a phytopathogenic fungi *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sorauer. *J. Basic Microbiol.*, 1 – 12.
37. Christeller J.T., 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS Journal*, **272**, № 22, 5710 – 5722.
34. Chu M., Mierzwa R., He L., King A., Patel M., Pichardo J., Hart A., Butkiewicz N., Puar M.S., 1999. Isolation and structure of Sch 351633: a novel hepatitis C virus (HCV) NS3 protease inhibitor from the fungus *Penicillium griseofulvum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1949 – 1952.
35. Chuang W.-J., Lin Y.-S., Wu J.-J., Liu C.-C., Lin M.T., 2013. Steptopain. In: *Handbook of proteolytic enzymes*, **2**, 2142 – 2150.
- Clarke S.C., Dumesic P.A., Homer C.M., O'Donoghue A.J., La Greca F., Pallova L., Majer P., Madhani H.D., Craik C.S., 2016. Integrated activity and genetic profiling of secreted peptidases in *Cryptococcus neoformans* reveals an aspartyl peptidase required for low pH survival and virulence. *PLOS Pathogens*, 30 pp.
38. Clarke N.E., Hooper N.M., Turner A.J., 2013. Angiotensin-converting enzyme 2. In: *Handbook of proteolytic enzymes*, **1**, 499 – 504.
- Colmenares A.J., Aleu J., Durán-Patrón R., Collado I.G., Hernández-Galán R., 2002. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *J. Chem. Ecol.*, **28**, 997 – 1005.
39. Dangl J.L., Jones J.D.G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**, 826 – 833.
40. Demain A.L., Adrio J.L., 2008. Contribution of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.*, **38**, 41 – 55.
41. Desjardins A.E., Manandhar H.K., Plattner R.D., Manandhar G.G., Poling S.M., Maragos C.M., 2000. *Fusarium* species from Nepalese rice and production

of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, № 3, 1020 – 1025.

42. Desjardins A.E., Plattner R.D., 1989. Trichothecene toxin production by strains of *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*) in liquid culture and in potato tubers. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, № 2, 388 – 392.

43. Di Petro A., Huertas-González M.D., Gutierrez-Corona J.F., Martínez-Cadena G., Méglec E., Roncero M.I.G., 2001. Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, № 5, 653 – 662.

44. Di Pietro A., Madrid M.P., Caracuel Z., Delgado-Jarano J., Roncero M.I.G., 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular plant pathology*, **4**, № 5, 315 – 325.

45. Divon H.H., Fluhr R., 2006. Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *Federation of European Microbiological Societies*, 10 pp.

46. Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C., 2016. Bacterial collagenases – a review. *Crit. Rev. Microbiol.*, **42**, № 1, 106 – 126.

47. Dunaevskii Ya.E., Gruban T.N., Belyakova G.A., Belozerskii M.A., 2006. Extracellular proteinases of filamentous fungi as potential markers of phytopathogenesis. *Microbiology*, **75**, № 6, 649 – 652.

48. Dunaevsky Y.E., Popova V.V., Semenova T.A., Beliakova G.A., Belozersky M.A., 2014. Fungal unhibitors of proteolytic enzymes: classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. *Biochimie*, **101**, 10 – 20.

49. Eisenman H.C., Casadevall A., 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol and Biotechnol.*, **93**, 931 – 940.

50. Elad Y., Chet I., Henis Y., 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.*, **28**, 719 – 725.

51. Elad Y., Kapat A., 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, **105**, 177 – 189.

52. Eshel D., Miyara I., Ailing T., Dinoor A., Prusky D., 2002. pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**, № 8, 774 – 779.

53. Van Esse H.P., van't Klooster J.W., Bolton M.D., Yadeta K.A., van Baarlen P., Boeren S., Vervoort J., de Wit P.J.G.M., Thomma B.P.H.J., 2008. The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell*, **20**, 1948 – 1963.
54. Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N., Socol C.R., 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 246 – 251.
55. Godoy G., Steadman S.J., Dickman M.B., Dam R., 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Mol Plant Pathol*, **37**, 179 – 191.
56. Goulas T., Gomis-Rüth F.X., 2013. Fragilysin. In: *Handbook of proteolytic enzymes*, **1**, 887 – 891.
57. Griffen A.M., Wiebe M.G., Robson G.D., Trinci A.P.J., 1997. Extracellular proteases produced by the Quorn myco-protein fungus *Fusarium graminearum* in batch and chemostat culture. *Microbiology*, **143**, 3007 – 3013.
58. Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, **59**, 15 – 32.
59. Heller A., Witt-Geiges T., 2013. Oxalic acid has an additional, detoxifying function in *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. *PLOS ONE*, **8**, № 8, 17 pp.
60. Hibbs M.S., Hasty K.A., Seyer J.M., Kang A.H., Mainardi C.L., 1985. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2493 – 2500.
61. Honda K., Kataoka M., Shimizu S., 2002. Functional analyses and application of microbial lactonohydrolases. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **7**, 130 – 137.
62. Howard R.J., Valent B., 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev of Microbiol*, **50**, 491 – 512.
63. Howard D.H., 1999. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev*, **12**, 394 – 404.
64. Hu G., Leger R.J.St., 2004. A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *J. Evol. Biol.*, **17**, 1204 – 1214.

65. Idnurm A., Howlett B.J., 2001. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol. Plant. Path.*, **2**, 241 – 255.
66. Ijaz A., Anwar Z., Zafar Y., Hussain I., Muhammad A., Irshad M., Mehmood S., 2011. Optimization of cellulase enzyme production from corn cobs using *Alternaria alternata* by solid state fermentation. *Journal of Cell and Molecular Biology*, **9**, № 2, 51 – 56.
67. Ishii S.-I., Kumazaki T., 2013. Mycolisin. In: Handbook of proteolytic enzymes. Aspartic and metallopeptidases, 603 – 604.
68. Ismail M.A., Abdel-Hafez S.I.I., Hussein N.A., Abdel-Hameed N.A., 2013. Contribution to physiological and biochemical diagnostics of *Fusarium* taxa commonly isolated in Egypt. *Czech Mycology*, **65**, № 1, 133 – 150.
69. Isshiki A., Akimitsu K., Nishio K., Tsukamoto M., Yamamoto H., 1997. Purification and characterization of an endopolygalacturonase from the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*, the cause of citrus brown spot disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **51**, 155 – 167.
70. James M.N.G., 2006. The peptidases from fungi and viruses. *Biol Chem*, **387**, № 8, 1023 – 1029.
71. Jankiewicz U., Bielawski W., 2003. The properties and functions of bacterial aminopeptidases. *Acta Microbiol. Pol.*, **52**, № 3, 217 – 231.
72. Jenczmionka N.J., Schäfer W., 2005. The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Curr Genet*, **47**, 29 – 36.
73. Jensen K., Østergaard P.R., Wilting R., Lassen S.F., 2010. Identification and characterization of a bacterial glutamic peptidase. *BMC Biochemistry*, **11**, № 47, 12 pp.
74. Jusko M., Potempa J., Karim A.Y., Ksiazek M., Riesbeck K., Garred P., Eick S., Blom A.M., 2012. A metalloproteinase karilysin present in the majority of *Tannerella forsythia* isolates inhibits all pathways of the complement system. *J Immunol*, **188**, № 5, 2338 — 2349.
75. van Kan J.A.L., 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *TRENDS in Plant Science*, **11**, № 5, 247 – 253.
- Kawamura C., Moriwaki J., Kimura N., Fujita Y., Fuji S.-i., Hirano T., Koizumi S., Tsugi T., 1997. The melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can

restore pathogenicity of the melanin-deficient mutants of *Magnaporthe grisea*. MPMI, **10**, № 4, 446 – 453.

76. Kechaou E.S., Dumay J., Donnay-Moreno C., Jaouen P., Gouygou J.P., Bergé J.P., Amar R.B., 2009. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: effects on lipid distribution and amino acid composition. J Biosci Bioeng, **107**, № 2, 158 – 164.

77. Kiehn T.E., Nelson P.E., Bernard E.M., Edwards F.F., Koziner B., Armstrong D., 1985. Catheter-associated fungemia caused by *Fusarium chlamidosporum* in a patient with lymphocytic lymphoma. J. Clin. Microbiol., **21**, № 4, 501 – 504.

78. Kikot G.E., Hours R.A., Alconada T.M., 2009. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. Journal of Basic Microbiology, **49**, 231 – 241.

79. King B.C., Waxman K.D., Nenni N.V., Walker L.P., Bergstrom G.C., Gibson D.M., 2011. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. Biotechnology for Biofuels, **4**, № 4, 14 pp.

80. Kondo M.Y., Okamoto D.N., Santos J.A.N., Juliano M.A., Oda K., Pillai B., James M.N.G., Juliano L., Gouvea I.E., 2010. Studies on the catalytic mechanism of a glutamic peptidase. Journal of biological chemistry, **285**, № 28, 21437 – 21445.

81. Kredics L., Manczinger L., Antal Z., Péntzes Z., Szekeres A., Kevei F., Nagy E., 2004. *In vitro* water activity and pH dependence of mycelia growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Journal of Applied Microbiology, **96**, 491 – 498.

82. Krishnan P., Ma X., McDonald B.A., Brunner P.C., 2018. Widespread signatures of selection for secreted peptidases in a fungal plant pathogen. BMC Evolutionary Biology, **18**, № 7, 10 pp.

83. Ksiazek M., Karim A.Y., Bryzek D., Enghild J.J., Thøgersen I.B., Koziel J., Potempa J., 2015. Mirolase, a novel subtilisin-like serine protease from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*. Biol. Chem., **396**, № 3, 261 – 275.

84. Kubicek C.P., Harman G.E., 2002. *Trichoderma* and *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics. CRC Press, **1**, 300 pp.

85. Kwon H.W., Yoon J.H., Kim S.H., Hong S.B., Cheon Y., Ko S.J., 2007. Detection of extracellular enzyme activities in various *Fusarium* spp. *Mycobiology*, **35**, № 3, 162 – 165.
86. Labrou N.E., 2013. Clostripain. In: Handbook of proteolytic enzymes (third edition), **2**, 2323 – 2327.
87. Landowski C.P., Huuskonen A., Wahl R., Westerholm-Parvinen A., Kanerva A., Hänninen A.-L., Salovuori N., Penttilä M., Natunen J., Ostermeier C., Helk B., Saarinen J., Saloheimo M., 2015. Enabling low cost biopharmaceuticals: a systematic approach to delete proteases from a well-known protein production host *Trichoderma reesei*. *PLOS ONE*, 28 pp.
88. Laxman R.S., Sonawane A.P., More S.V., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V., Deshpande V.V., Rao M.B., 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochem.*, **40**, № 9, 3152 – 3158.
89. Lee H.B., Patriarca A., Magan N., 2015. *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. *Mycobiology*, **43**, 93 – 106.
90. Li J., Gu F., Wu R., Yang J.K., Zhang K.-Q., 2017. Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in fungi. *Scientific reports*, **7**, 15 pp.
91. Lin S.-J., Chen L.-L., Wen C.-Y., Chu W.-S., 2010. Extracellular leucine aminopeptidase produced by *Aspergillus oryzae* LL1 and LL2. *Afr. J. Microbiol. Pes.*, **4**, № 3, 158 – 168.
- Lin C.-H., Yang S.L., Wang N.-Y., Chung K.-R., 2010. The FUS3 MAPK signaling pathway of the citrus pathogen *Alternaria alternata* functions independently or cooperatively with the fungal redox-responsive AP1 regulator for diverse developmental, physiological and pathogenic processes. *Fungal Genetics and Biology*, **47**, 381 – 391.
92. Lindberg R.A., Eirich L.D., Price J.S., Wolfenbarger Jr., Drucker H., 1981. Alkaline protease from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, **256**, 811 – 814.
93. Liu G.Y., Nizet V., 2009. Color me bad: microbial pigments as virulence factor. *Trends Microbiol*, **17**, 406 – 413.
94. Lo Presti L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M., Zuccaro A., Reissmann S., Kahmann R., 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, **66**, 513 – 545.

95. López-Otin C., Bond J.S., 2008. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of biological chemistry*, **283**, № 45, 30433 – 30437.
96. Lowe R.G.T., McCorkelli O., Bleackley M., Collins C., Faou P., Mathivanan S., Anderson M., 2015. Extracellular peptidases of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 13 pp.
97. Lumsden R.D., 1976. Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their localization in infected bean. *Can J Bot*, **54**, 2630 – 2641.
98. Mandujano-González V., Villa-Tanaca L., Anducho-Reyes M.A., Mercado-Flores Y., 2016. Secreted fungal aspartic proteases: a review. *Rev. Iberoam. Micol.*, **33**, № 2, 76 – 82.
99. Markovich N.A., Kononova G.L., 2003. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **39**, № 4, 341 – 351.
100. Marcello C.M., Steindorff A.S., da Silva S.P., do Nascimento Silva R., Bataus L.A.M., Ulhoa C.J., 2010. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research*, **165**, 75 – 81. Martínez M.J., Vázquez C., Guillén F., Reyes F., 1988. β -Glucosidase from the cellulolytic system of *Alternaria alternata* autolyzed cultures. *FEMS Microbiology Letters*, **55**, 263 – 268.
101. Marciano P., Di Lenna P., Magro P., 1982. Polygalacturonase isoenzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum* in vivo and in vitro. *Physiol Plant Pathol*, **20**, 201 – 212.
102. Marciano P., Di Lenna P., Magro P., 1983. Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiol Plant Pathol*, **22**, 339 – 345.
103. Mathivanan N., Kabilan V., Murugesan K., 1998. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Can. J. Microbiol.*, **44**, 646 – 651.
104. Matsuwaki Y., Wada K., White T., Moriyama H., Kita H., 2012. *Alternaria* fungus induces the production of GM-CSF, interleukin-6 and interleukin-8 and calcium signaling in human airway epithelium through protease-activated receptor 2. *Int Arch Allergy Immunol*, **158**, 19 – 29.

Mattila H.K., Mäkinen M., Lundell T., 2020. Hypoxia is regulating enzymatic wood decomposition and intracellular carbohydrate decomposition in filamentous white rot fungus. *Biotechnol. Biofuels*, **13**, 17 pp.

105. Maurer K.-H., 2004. Detergent proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15**, 330 – 334.

106. Maxwell D.P., Lumsden R.D., 1970. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. *Phytopathology*, **60**, 1395 – 1398.

107. Meena M., Gupta S.K., Swapnil P., Zehra A., Dubey M.K., Upadhyay R.S., 2017. *Alternaria* toxins: potential virulence factors and genes related to pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 14 pp.

108. Mendgen K., Hahn M., Deising H., 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **34**, 367 – 386.

109. Mizuno K., Matsuo H., 1984. A novel protease from yeast with specificity towards paired basic residues. *Nature*, **309**, 558 – 560.

110. Molto G.A., Gonzalez H.H.L., Resnik S.L., Gonzalez A.P., 1997. Production of trichothecenes and zearalenone by isolates of *Fusarium* spp. from argentinian maize. *Food Addit. Contam.*, **14**, 263 – 268.

111. Monod M., Capoccia S., Léchenne B., Zaugg C., Holdom M., Jousson O., 2002. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol.*, **292**, 405 – 419.

112. Mortensen U.H., Olesen K., Breddam K., 2013. Carboxypeptidase C including carboxypeptidase Y. In: *Handbook of proteolytic enzymes* (third edition), 3408 – 3412.

113. Muszewska A., Stepniewska-Dziubinska M.M., Steczkiewicz K., Pawlowska J., Dziedzic A., Ginalski K., 2017. Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. *Scientific reports*, **7**, 12 pp.

114. Navais R., Méndez J., Pérez-Pascual D., Cascales D., Guijarro J.A., 2014. The *yrpAB* operon of *Yersinia ruckeri* encoding two putative U32 peptidases is involved in virulence and induced under microaerobic conditions. *Virulence*, **5**, №5, 619 – 624.

115. Nelson P.E., Dignani M.C., Anaissie E.J., 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, **7**, № 4, 479 – 504.

116. Okada Y., Nagase H., Harris E.D., 1986. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14245 – 14255.
117. Okumura Y., Ogawa K., Nikai T., 2004. Elastase and elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Journal of Medical Microbiology*, **53**, 351 – 354.
118. Oliver R., Osbourn A., 1995. Molecular dissection of fungal phytopathogenicity. *Microbiology*, **141**, 1 – 9.
119. Olivieri F., Zanetti M.E., Oliva C.R., Covarrubias A.A., Casalongué C.A., 2002. Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 63 – 72.
120. Otlewski J., Jelen F., Zakrzewska M., Oleksy A., 2005. The many faces of protease – protein inhibitor interaction. *The EMBO Journal*, **24**, № 7, 1303 – 1310.
121. Palencia E.R., Hinton D.M., Bacon C.W., 2010. The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. *Toxins*, **2**, 399 – 416.
122. Palmer J.M., Keller N.P., 2010. Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Curr Opin Microbiol.*, **13**, 431 – 436.
123. Patil M., Shastri N.V., 1985. Purification and properties of proteases produced by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, regulation of production by fructose. *J. Biosci.*, **9**, 1 – 11.
124. Pekkarinen A.I., Jones B.L., 2002. Trypsin-like proteinase produced by *Fusarium culmorum* grown on grain proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3849 – 3855.
125. Pekkarinen A., Mannonen L., Jones B.L., Niku-Paavola M.-L., 2000. Production of proteases by *Fusarium* species grown on barley grains and in media containing cereal proteins. *Journal of Cereal Science*, **31**, 253 – 261.
126. Pekkarinen A.I., Sarlin T.H., Laitila A.T., Haikara A.I., Jones B.L., 2003. *Fusarium* species synthesize alkaline proteinases in infested barley. *Journal of Cereal Science*, **37**, 349 – 356.

127. Phadatare S., Rao M., Deshpande V., 1997. A serine alkaline protease from the fungus *Conidiobolus coronatus* with the distinctly different structure than the serine protease subtilisin Carlsberg. Arch. Microbiol., **166**, 414 – 417.
128. Phadatare S.U., Srinivasan M.C., Deshpande V.V., 1993. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with commercial detergents. Enzyme Microb. Technol., **15**, 72 – 76.
129. Phalip V., Hatsch D., Laugel B., Jeltsch J.-M., 2006. An overview of fungal community diversity in diseased hop plantations. FEMS Microbiol Ecol, **56**, 321 – 329.
130. Portnoy J., Pacheko F., Barnes C., Upadrashta B., Crenshaw R., Esch R., 1993. Selection of representative *Alternaria* strain groups on the basis of morphology, enzyme profile, and allergen content. J Allergy Clin Immunol, **91**, № 3, 773 – 782.
131. Quarta A., Mita G., Haidukowski M., Santino A., Mule G., Visconti A., 2005. Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. Food Addit. Contam., **22**, 309 – 315.
132. Qin Y., He H., Li N., Ling M., Liang Z., 2010. Isolation and characterization of a thermostable cellulase-producing *Fusarium chlamydosporum*. World J Microbiol Biotechnol, **26**, 1991 – 1997.
133. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **62**, № 3, 597 – 635.
134. Rasmussen T.B., Givskov M., 2006. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. Microbiology, **152**, 1325 – 1340.
135. Rasmussen T.B., Skindersoe M.E., Bjarnsholt T., Phipps R.K., Christensen K.B., Jensen P.O., Andersen J.B., Larsen T.O., Hentzer M., Hoiby N., Givskov M., 2005. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. Microbiology, **151**, 1325 – 1340.
136. Rawlings N.D., 2010. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. Biochimie.
137. Rawlings N.D., Barrett A.J., 1993. Evolutionary families of peptidases. Biochem. J., **290**, 205 – 218.

138. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A., 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, **38**, database issue, 227 – 233.
139. Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A. J., 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, **378**, № 3, 705 – 716.
140. Reddy P.V., Lam C.K., Belanger F.C., 1996. Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant Physiol.*, **111**, 1209 – 1218.
141. Reichard U., Léchenne B., Asif A.R., Streit F., Grouzmann E., Jousson O., Monod M., 2006. Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acidic pHs. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, № 3, 1739 – 1748.
142. Remington S.J., 2013. Serine carboxypeptidase D. In: *Handbook of proteolytic enzymes* (third edition), 3418 – 3421.
143. Roncero M.I.G., Di Pietro A., Ruiz-Roldán M.C., Huertas-González M.D., Garcia-Maceira F.I., Méglec E., Jiménez A., Caracuel Z., Sancho-Zapatero R., Hera C., Gómez-Gómez E., Ruiz-Rubio M., González-Verdejo C.I., Páez M.J., 2000. Role of cell wall-degrading enzymes in pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Rev Iberoam Micol*, **17**, 47 – 53.
144. Royer J.C., Nakas J.P., 1989. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 405 – 410.
145. Sabotic J., Kos J., 2012. Microbial and fungal protease inhibitors – current and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1351 – 1375.
146. De Sain M., Rep M., 2015. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 23970 – 23993.
147. Sandhya C., Adapa L.K., van Nampoothiri K.M., Binod P., Szakacs G., Pandey A., 2004. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. *J. Basic Microbiol.*, **44**, № 1, 49 – 58.
148. Sandoval-Denis M., Sutton D.A., Cano-Lira J.F., Gené J., Fothergill A.W., Wiederhold N.P., Guarro J., 2014. Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, № 6, 2112 – 2125.

149. dos Santos A.L.S., 2011. Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events. *World J Biol Chem*, **2**(3), 48 – 58.
150. Sanz L., Montero M., Redondo J., Llobell A., Monte E., 2005. Expression of an α -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *FEBS Journal*, **272**, 493 – 499.
151. Scharf D.H., Heinekamp T., Brakhage A.A., 2014. Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLOS Pathogens*, **10**, № 1, 3 pp.
152. Schollenberger M., Muller H.M., Ruffle M., Suchy S., Plank S., Drochner W., 2006. Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia*, **161**, 43 – 52.
153. Schrettl M., Haas H., 2011. Iron homeostasis – Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? *Curr Opin Microbiol*, **14**, 400 – 405.
154. Seifbarghii S., Borhan M.H., Wei Y., Coutu C., Robinson S.J., Hegedus D.D., 2017. Changes in *Sclerotinia sclerotiorum* transcriptome during infection of *Brassica napus*. *BMC Genomics*, **18**, № 266, 37 pp.
155. Shah P., Atwood J.A., Orlando R., Mubarek H.E., Podila G.K., Davis M.R., 2009. Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome. *Journal of Proteome Research*, **8**, 1123 – 1130.
156. Shakeri J., Foster H.A., 2007. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 961 – 968.
157. Shang Y., Xiao G., Zheng P., Cen K., Zhan S., Wang C., 2016. Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity. *Genome Biol. Evol.*, **8** (5), 1374 – 1387.
158. Shannon J.D., Baramova E.N., Bjarnason J.B., Fox J.W., 1989. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloprotease which cleaves type IV collagen and gelatin. *J. Biol. Chem.*, **264**, 11575 – 11583.
- Shi L., Li R., Bai L., Lu Q., Chen B., 2014. Prb1, a subtilisin-like protease, is required for virulence and phenotypical traits in the chestnut blight fungus. *FEMS Microbiology Letters*, **359** (1), 26 – 33.

159. Šimkovič M., Kurucová A., Hunová M., Varečka L., 2008. Induction of secretion of extracellular proteases from *Trichoderma viride*. *Acta Chimica Slovaca*, **1**, № 1, 250 – 264.
160. Sircar G., Saha B., Mandal R.S., Pandey N., Saha S., Bhattacharya S.G., 2015. Purification, cloning and immuno-biochemical characterization of a fungal aspartic protease allergen Rhio o 1 from the airborne mold *Rhizopus oryzae*. *PLoS ONE*, 26 pp.
161. Soanes D.M., Alam I., Cornell M., Wong H.M., Hedeler C., Paton N.W., Rattray M., Hubbard S.J., Oliver S.G., Talbot N.J., 2008. Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. *PLoS ONE*, **3** (6), 15 pp.
162. Soanes D.M., Chakrabarti A., Paszkiewicz K.H., Dawe A.L., Talbot N.J., 2012. Genome-wide transcriptional profiling of appressorium development by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog*, **8**.
163. De Souza P.M., de Assis Bittencourt M.L., Caprara C.C., de Freitas M., de Almeida R.P.C., Silveira D., Fonseca Y.M., Filho E.X.F., Junior A.P., Magalhães P.O., 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, **46**, № 2, 337 – 346.
164. Sriram N., Priyadarshini M., Sivasakthi S., 2012. Production and characterization of amino peptidase from marine *Aspergillus flavus*. *Int. J. Microbiol. Res.*, **3**, № 3, 221 – 226.
165. St Leger R.J., Joshi L., Roberts D.W., 1997. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*, **143**, 1983 – 1992.
166. Suarez B., Rey M., Castillo P., Monte E., Llobell A., 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematicidal activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, **65**, 46 – 55.
167. Suárez M.B., Sanz L., Chamorro M.I., Rey M., González F.J., Llobel A., Monte E., 2005. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetics and Biology*, **42**, 924 – 934.
168. Sun D., Chen S., Cheng A., Wang M., 2016. Roles of the picornaviral 3C proteinase in the viral life cycle and host cells. *Viruses*, **8**, № 3, 82 pp.

169. Takahashi Y., Shirai T., Ishii S.-i., 1975. Characterization of acylglutamine amidohydrolase and carboxypeptidase from *Fusarium anguioides*. J. Biochem., **77**, 823 – 830.
170. Tavano O.L., 2013. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. J. Mol. Catal. Enzym., **90**, 11 pp.
171. ten Have A., Espino J.J., Dekkers E., Van Sluyter S.C., Brito N., Kay J., González C., van Kan J.A.L., 2010. The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. Fungal Genetics and Biology, **47**, 53 – 65.
172. Thomma B.P.H.J., 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular plant pathology, **4**, № 4, 225 – 236.
173. Tian Y., Tan Y.L., Liu N., Liao Y.C., Sun C.P., Wang S.X., Wu A.B., 2016. Functional agents to biologically control deoxynivalenol contamination in cereal grains. Front. Microbiol., **7**, 395.
174. Tondje P.R., Roberts D.P., Bon M.C., Widmer T., Samuels G.J., Ismaiel A., Begoude A.D., Tchana T., Nyemb-Tshomb E., Ndoumbe-Nkeng M., Bateman R., Fontem D., Hebbar K.P., 2007. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. Biological Control, **43**, 202 – 212.
175. Tsuge T., Harimoto Y., Akimutsu K., Ohtani K., Kodama M., Akagi Y., Egusa M., Yamamoto M., Otani H., 2013. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. FEMS Microbiol. Rev., **37**, 44 – 66.
176. Urbanek H., Kaczmarek A., 1985. Extracellular proteinases of the isolate of *Botrytis cinerea* virulent to apple tissues. Acta Biochimica Polonica, **32**, № 2, 101 – 109.
177. Vermelho A.B., Noronha E.F., Filho E.X.F., Ferrara M.A., Bon E.P.S., 2013. Diversity and biotechnological applications of prokaryotic enzymes. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds). The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg, 213 – 240.
178. Viterbo A., Harel M., Chet I., 2004. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. FEMS Microbiology Letters, **238**, 151 – 158.

179. van den Burg B., Eijssink V., 2013. Thermolysin and related *Bacillus* metallopeptidases. In: Handbook of proteolytic enzymes (third edition), **1**, 540 – 553.
180. van der Vlugt-Bergmans C.J.B., Wagemakers C.A.M., van Kan J.A.L., 1997. Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. Molecular Plant-Microbe Interactions, **10**, № 1, 21 – 29.
181. Van Wart H.E., 2013. Clostridium collagenases. In: Handbook of proteolytic enzymes, **1**, 607 – 611.
182. Wasfy E.H., Bridge P.D., Brauford D., 1987. Preliminary studies on the use of biochemical and physiological tests for the characterization of *Fusarium* isolates. Mycopathologia, **99**, 9 – 13.
183. Watson R.R., 1976. Substrate specificities of aminopeptidases: a specific method for microbial differentiation. Methods Microbiol., **9**, 1 – 14.
184. Weaver L.H., Kester W.R., Matthews B.W., 1977. A crystallographic study of the complex of phosphoramidon with thermolysin. A model for the presumed catalytic transition state and for the binding of structures. J. Mol. Biol., **114**, 119 – 132.
185. Wilhelm S.M., Collier I.E., Kronberger A., Eisen A.Z., Marmer B.L., Grant G.A., Bauer E.A., Goldberg G.I., 1987. Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity and differential expression in normal and tumorigenic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 6725 – 6729.
186. Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., van Kan J.A.L., 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology, **8**, № 5, 561 – 580.
187. Wilson R.A., Talbot N.J., 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. Nat. Rev. Microbiol., **7**, 185 – 195.
188. Wolf D.H., 1980. Control of metabolism in yeast and other lower eukaryotes through action of proteinases. Adv. Microb. Physiol., **21**, 267 – 338.
189. Wolf D.H., Holzer H., 1980. Prpteolysis in yeast. 431 – 458. In J.W. Payne (ed.). Microorganisms and nitrogen sources. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
190. Yan L., Qian Y., 2009. Cloning and heterologous expression of SS10, a subtilisin-like protease displaying antifungal activity from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol Lett, **290**, 54 – 61.

191. Yildirim V., Baltaci M.O., Ozgencli I., Sisecioglu M., Adiguzel A., Adiguzel G., 2017. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **32**, № 1, 468 – 477.
192. Yin J., Bergmann E.M., Cherney M.M., Lall M.S., Jain R.P., Vederas J.C., James M.N.G., 2005. Dual modes of modification of hepatitis A virus 3C protease by a serine-derived beta-lactone: selective crystallization and formation of a functional catalytic triad in the active site. *J Mol Biol*, **354**, № 4, 854 – 871.