

## ОБЗОР

УДК 579.66

## Протеолитические ферменты грибов и их ингибиторы как перспективные биоцидные средства антифунгального действия

И.Л. Шамрайчук<sup>1,2,\*</sup>, Г.А. Белякова<sup>3</sup>, И.М. Еремина<sup>2</sup>,  
А.В. Кураков<sup>3</sup>, М.А. Белозерский<sup>1</sup>, Я.Е. Дунаевский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Отдел белков растений, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40;

<sup>2</sup>лаборатория химико-биологических исследований, Всероссийский художественный научно-реставрационный центр имени академика И.Э. Грабаря, Россия, 105005, г. Москва, ул. Радио, 17, корп. 6;

<sup>3</sup>кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*e-mail: irashamr@yandex.ru

Обзор посвящен выявлению групп пептидаз, вовлеченных в процессы роста грибов, а также ингибиторов таких пептидаз. Рассмотрены имеющиеся данные по разнообразию, значимости, представленности и особенностям протеолитических ферментов представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* и *Alternaria*. На основе анализа данных сделан вывод, что сериновые, металло- и глутаминовые пептидазы необходимы для роста грибов. Поэтому эти ферменты рассматриваются как перспективные мишени ингибиторов пептидаз, что может служить обоснованием поиска таких ингибиторов и разработки на их основе новых биоцидных средств для защиты объектов искусства от биодеструкторов.

**Ключевые слова:** пептидазы, ингибиторы, биоциды, грибы-биодеструкторы, патогены, сапротрофы, обзор

Объем литературных данных по грибным пептидазам значителен и включает сведения об их свойствах, структуре, спектре активности и влиянии на нее различных факторов, особенностях секреции и возможностях применения. Однако вопрос о том, какими функциями обладает та или иная грибная пептидаза, во многих случаях, ввиду сложности определения, не рассматривается. В целом известно, что функции пептидаз грибов часто не ограничиваются одним лишь гидролизом белков для питания. В некоторых случаях удалось различными методами (биохимическими, молекулярно-генетическими и микологическими) показать, существенна ли активность определенной пептидазы для роста гриба или она необходима для протекания иных (хотя и связанных с ростом) процессов (например, спорообразования, адаптации, патогенеза).

Несмотря на свои важные биологические функции, пептидазы могут оказывать повреждающее действие на живые системы, гидролизуя белки, необходимые для их функционирования, а поэтому должны находиться под строгим контролем. Существует несколько механизмов контроля чрезмерной активности пептидаз. Наиболее важным среди них является взаимодействие протеолитических ферментов с подавляющими их активность ингибиторами, значительная часть которых представляет собой белковые соединения. Структура ингибиторов,

типы ингибирования, кинетические и термодинамические параметры этого процесса, природа фермент-ингибиторных комплексов весьма разнообразны. Изучение веществ, подавляющих активность пептидаз, началось практически одновременно с открытием этих ферментов. В настоящее время известны сотни ингибиторов пептидаз белковой природы. Исследования этих соединений могут быть перспективными для их использования в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологии. Понимание характера взаимодействия с пептидазами является предпосылкой для разработки новых подходов к синтезу синтетических ингибиторов, которые могут впоследствии применяться как лекарственные средства. Причиной ряда заболеваний (эмфиземы легких, эпилепсии, наследственного отека Квинке и синдрома Нетертона) являются нарушения во взаимодействии «пептидаза–ингибитор» [1–4]. Эти патологии можно корректировать введением синтетических или природных ингибиторов пептидаз. Для растениеводства перспективны генетически модифицированные сорта растений, в которых экспрессируются ингибиторы гидролитических ферментов фитопатогенов и насекомых-вредителей [5–7].

Ингибиторы активности или синтеза/секреции грибных пептидаз могут найти применение в качестве биоцидных агентов для подавления роста микромицетов на объектах искусства. Поиск

новых антифунгальных соединений для защиты произведений искусства от биоповреждений, вызываемых микромицетами и приводящих к искажению цвета, разрушению красок и образованию темно-окрашенных пятен, актуален. Используемые в настоящее время антимикробные препараты био-защиты имеют ряд недостатков. Широко применяемое четвертичное аммониевое соединение катамин АБ, несмотря на присущие ему ценные характеристики как биоцида, обладает отдельными нежелательными свойствами, среди которых – зависимость активности от присутствия органических и неорганических веществ [8]. Другое вещество, используемое в реставрационной практике, – нипагин (метилловый эфир параоксибензойной кислоты), – плохо растворяется в воде и не обладает длительным эффектом защиты.

В настоящем обзоре мы рассмотрели накопленный в литературе материал по пептидазам, их особенностям и вовлечению в процессы роста у мицелиальных микроскопических грибов, способных вызывать биоповреждения, а также ингибиторам пептидаз, способным подавлять их рост и выступать в качестве перспективных антифунгальных соединений для создания биоцидных средств.

#### Пептидазы мицелиальных микроскопических грибов

Пептидазы – ферменты, катализирующие распространенную химическую реакцию гидролиза пептидных связей (СО–NH) белков и расщепляющие белки на пептиды или свободные аминокислоты [9, 10]. Термины протеаза, пептидаза, протеолитический фермент и пептид-гидролаза синонимичны.

По механизму катализа пептидазы делят на следующие группы [11]: 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 [10].

Все перечисленные группы пептидаз найдены у грибов. В целом, грибы образуют больше протеолитических ферментов в присутствии сложных белковых источников азота, чем в присутствии низкомолекулярных или неорганических. Образование пептидаз может усиливаться при недостаточном содержании доступных углерод-содержащих веществ, что часто наблюдается

при росте грибов на каменных скульптурах и темперной живописи.

У представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, патогенных для растений и человека, а также часто ответственных за биоповреждения, внеклеточные пептидазы могут являться главными факторами патогенности/вирулентности и отвечать за порчу материальных и художественных ценностей.

#### Пептидазы микромицетов рода *Aspergillus*

Грибы рода *Aspergillus* – чрезвычайно разнообразная и метаболически гибкая группа микромицетов. Среди них известны как сапротрофы, так и патогены человека и растений. Пристальное внимание к грибам этого рода во многом объясняется активным образованием ими микотоксинов, способных вызывать отравление человека при употреблении в пищу пораженного зерна или микотоксикозы животных при использовании контаминированного корма.

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 [12]. 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* составляют 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.

У *Aspergillus westerdijkiae* по результатам геномного анализа, проведенного Хэном с коллегами [13], наиболее крупной группой пептидаз были сериновые пептидазы (176 генов), а за ними следовали металлопептидазы (103 гена). В значительно меньших количествах были представлены пепсин А-подобные пептидазы (11 генов аспартатных пептидаз), убиквитин-специфичные пептидазы (17 генов цистеиновых пептидаз), а также бета-компонент протеосомы (14 генов треониновых пептидаз).

*Aspergillus fumigatus* секретировал эндопептидазы, которые могут быть классифицированы как сериновые пептидазы седолизинового и субтилизинового семейств, аспартатные пептидазы пепсинового семейства, а также металлопротеазы двух различных семейств [14, 15].

Уровень секреции пептидаз зависел от типа доступного субстрата. Так, добавление пшеничных отрубей приводило к более сильной индукции пептидаз, чем добавление свекловичного жома. Наиболее широкий спектр пептидаз обнаружен у *Aspergillus flavus*.

### Пептидазы микромицетов рода *Penicillium*

Грибы рода *Penicillium* распространены повсеместно и составляют в природе важное экологическое звено деструкторов органических веществ, активно продуцируют антибиотики, микотоксины и другие биологически активные соединения. Известна способность видов этого рода контаминировать зерно и плоды растений.

Показано, что гены пептидаз относятся к наиболее крупной группе генов *Penicillium digitatum*, активируемых при инфекции плодов цитрусовых [16]. Среди пептидаз этого вида выявлены аспаратные эндопептидазы, трипептидил-пептидазы, сериновая пептидаза и карбоксипептидаза S.

Среди представителей рода *Penicillium* известны и сапротрофные экстремофилы-продуценты пептидаз. Обнаружено, что темные пятна на глинистых скалистых поверхностях пещеры Дрины (Малые Карпаты, Словакия) являются результатом развития на них психротолерантного вида *Penicillium glandicola* [17]. Этот вид способен синтезировать протеазы наряду с амилазами и целлюлазами, но не пектиназами или кератиназами. Исследователи полагают, что *P. glandicola* не патогенен по отношению к растениям, животным или человеку.

### Пептидазы микромицетов рода *Trichoderma*

Микромицеты из рода *Trichoderma* – распространенные почвенные сапротрофы, характеризующиеся способностью к быстрому росту на различных субстратах и образованию широкого спектра вторичных метаболитов. Эти признаки обеспечивают им конкурентное преимущество перед другими организмами [18]. 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, и целлюлаз. Эти микромицеты используют в качестве биоконтрольных агентов и стимуляторов роста растений, а также в качестве противогрибных культур в пищевой промышленности. Периодически сообщают, что представителей рода *Trichoderma* обнаруживают при биоповреждениях и грибных инфекциях [19]. В целом, несмотря на широкое распространение триходерм, относительно слабо изучен вопрос о связи между образованием ферментов и экологическими особенностями этих грибов.

Внеклеточные пептидазы представителей рода *Trichoderma* могут играть значительную роль в лизисе клеточных стенок фитопатогенных грибов, так как хитин и/или фибриллы  $\beta$ -глюкана (которые являются компонентами клеточных стенок грибов) погружены в белковый матрикс [20]. Показано образование грибами этого рода фер-

мента Prb1 – щелочной сериновой пептидазы с молекулярной массой 31 кДа (pI 9,2), синтезируемой в виде препрофермента. Сериновую пептидазу с такой молекулярной массой секретирует *Trichoderma harzianum* как штамма 101645 (патоген насекомых), так и штамма 206040 (микопаразит, используемый для биологического контроля фитопатогенных грибов) [21].

У штамма *T. harzianum* СЕСТ 2413 идентифицирована аспаратная пептидаза (P6281: молекулярная масса 33 кДа, pI 4,3), индуцируемая в присутствии грибных клеточных стенок [22], в связи с чем авторы предполагают вовлечение этой пептидазы в микопаразитическую активность гриба.

Согласно данным Ландовски с сотр. [23], штамм *Trichoderma reesei* на среде с добавлением экстракта зерна секретирует широкий ряд протеолитических ферментов, среди которых – аспаратные, глутаминовые, а также сериновые (субтилизин- и трипсин-подобные) пептидазы. У *T. reesei* выявлено большое число генов субтилаз (22), что характерно и для некоторых других видов сапротрофных грибов [24]. Авторы полагают, что субтилазы помогают грибам лучше адаптироваться к меняющимся условиям, используя широкий спектр жизненных стратегий.

*T. reesei* – активный продуцент 4 аспаратных пептидаз: PEP1 (42,7 кДа), PEP2 (42,4 кДа), PEP3 (49 кДа) и PEP5 (45 кДа) [23]. Эти пептидазы обладают 51–64% сходства в аминокислотных последовательностях.

Аспаратная протеиназа была идентифицирована также у *T. asperellum* [25]. Она секретировалась в среде совместных культур «растение–*Trichoderma*». Идентифицирован ген, кодирующий этот фермент.

Итак, способность штаммов рода *Trichoderma* продуцировать пептидазы известна давно, однако их протеолитические системы остаются относительно слабо изученными.

### Пептидазы микромицетов рода *Alternaria*

Виды рода *Alternaria* – главным образом сапротрофные микромицеты, часто встречаемые в почве и на отмерших растительных тканях [26]. Ряд видов рода *Alternaria* являются экономически значимыми фитопатогенами, вызывающими болезни зерновых, декоративных, масличных и овощных культур. Некоторые представители образуют микотоксины, с которыми связывают развитие рака у млекопитающих. Споры альтернарий являются одними из распространенных аллергенов.

При изучении микромицетов рода *Alternaria* акцент часто делался на образовании меланинов и секреции специфических токсинов у патогенных видов. Вопрос об образовании пептидаз у этих грибов рассматривался редко [27].

На сегодняшний день пептидазы *Alternaria* spp. привлекают пристальное внимание как сильные аллергены, критичные на ранних стадиях развития астмы [28, 29]. Идентифицирована и охарактеризована щелочная сериновая пептидаза фитопатогенного гриба *A. solani* и подобраны оптимальные условия ее образования [30, 31]. Максимум образования пептидазы в среде, содержащей 1% казеина, был отмечен на 9-е сут. культивирования, когда значение рН среды достигало 8,5; 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 и оставался активным в диапазоне рН 7–10. Пептидаза обладала широким температурным диапазоном активности и, по мнению авторов, может служить маркером фитопатогенности *A. solani*.

Исследования, проведенные Кришнаном с соавт. [32] на *Zymoseptoria tritici*, патогене пшеницы, показали, что более половины генов секретлируемых пептидаз гриба специфично экспрессируются на определенной стадии его жизненного цикла. Для многих грибных паразитов растений установлено большое разнообразие секретлируемых пептидаз. Это, возможно, связано и с необходимостью переключения ферментных систем на различные типы субстратов. У фитопатогенов, вызывающих болезни у широкого спектра растений, меньше различий в спектре субстрат-специфической активности при расщеплении белковых субстратов, чем у высокоспециализированных. При развитии микромицетов на произведениях живописи индукторами секреции ими пептидаз служат белки, входящие в состав связующих грунта и красок, а также клеев [33]. Однако конститутивный синтез пептидаз у них также возможен.

Пептидазы, не вносящие заметного вклада в общую протеолитическую активность гриба и выполняющие особые функции, как правило, высокоспецифичны. Напротив, пептидазы, необходимые для роста гриба, часто расщепляют многие пептидные связи в белках, т.е. имеют низкую субстратную специфичность [34].

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 секретлируемую протеолитическую активность и предположительно обладают очень строгой субстратной специфичностью [34]. В другой работе [35] отмечается, что белок Prb1, предполагаемая субтилизин-подобная протеаза фитопатогенного гриба *Cryphonectria parasitica*, обладает множественными функциями и может участвовать в регуля-

ции 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 фермента Prb1 связаны с адаптацией этих видов грибов к различным условиям организма-хозяина.

### 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 [36, 37]. В качестве ингибиторов пептидаз могут выступать низкомолекулярные соединения, а также белки. Они могут быть классифицированы согласно их источнику происхождения (микробные, грибные, растительные, животного происхождения), структуре (первичной, трехмерной), ингибиторному профилю (широкого действия, специфичные) и механизму реакции (конкурентные, неконкурентные, обратимые, необратимые) [38–40].

Чувствительность к ингибиторам является одним из характерных свойств пептидаз, позволяющим установить их принадлежность к определенному классу [41]. 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.

К группе низкомолекулярных ингибиторов относится ингибитор сериновых пептидаз фенилметилсульфонилфторид (PMSF), который связывается с ними ковалентно подобно суицидному субстрату [42]. Он плохо растворим в воде, где 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 низкомолекулярные вещества действуют на пептидазы различных типов. Лейпептин (0,5 мкг/мл) и TLCK (L-1-хлор-3-(4-тозиламида)-4-фенил-2-бутанон; 0,1 мг/мл) действуют как против сериновых, так и против цистеиновых пептидаз.

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

Пепстатин А – ингибитор аспартатных пептидаз, проявляющий антимикробные свойства по отношению к *Candida albicans*; показано, что он подавляет пролиферацию и адгезию клеток к абиотическим и биотическим структурам [41].

Действие металлопротеиназ эффективно подавляется в присутствии комплексобразователей, таких как ЭДТА (этилендиаминтетраацетат; 1 мМ) или о-фенантролин [42]. Однако эти вещества инактивируют и все металлозависимые ферменты.

Многие эндогенные ингибиторы протеиназ имеют белковую природу [43]. 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.  $\alpha_2$ -Макроглобулин может ингибировать пептидазы различных типов.

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

Некоторые представители грибов секретируют ингибиторы пептидаз. Функции грибных ингибиторов пептидаз до конца не определены; возможно, они участвуют в подавлении активности растительных пептидаз, секретируемых при реакции растений на атаку патогенами при фитопатогенезе, или защите пищевых ресурсов от конкурирующих организмов [44].

#### **Ингибиторы некоторых пептидаз как ингибиторы роста микромицетов**

Для некоторых видов грибов имеются хотя и отрывочные, но ценные сведения о влиянии ингибиторов пептидаз на мицелиальный рост.

Определено, что термофильный непатогенный мицелиальный гриб *Talaromyces emersonii* секретирует кислые пептидазы: РЕР1, аспартатную пептидазу (чувствительную к пепстатину), сходную с другими грибными пепсинами, и ТGР1, глутаминовую пептидазу (нечувствительную к пепстатину), которую этот гриб образует в наибольшем количестве [45]. При этом показано, что пепстатин оказывает малое влияние на рост гиф *T. emersonii*, тогда как ингибиторы глутаминовой пептидазы (пептидный аналог ТА1 и пропептидная последовательность РТ1) значительно замедляют рост гриба. Авторы сделали вывод, что рост гиф гриба зависит от активности ТGР1, но не РЕР1.

Установлено, что для подавления развития *P. digitatum* на плодах цитрусовых эффективен 1,10-фенантролин, ингибитор металлопептидаз.

Эффект от применения ряда других хелатирующих ионы металлов агентов был меньшим, хотя заметное защитное действие от *P. digitatum* наблюдалось и в присутствии ЭДТА [46].

Антифунгальную активность по отношению к фитопатогенным грибам способны проявлять ингибиторы пептидаз, выделенные из растений. Примером таких ингибиторов может служить ингибитор трипсина типа Кунитца, активный против фитопатогенов *Colletotrichum gloeosporioides* и *Fusarium oxysporum* [47]. Исследователями определен механизм его действия, заключающийся в нарушении целостности мембраны клеток. Неясно, какое действие растительные ингибиторы пептидаз оказывают на сапротрофные грибы. Это предполагает необходимость исследований, связанных с поиском антигрибных соединений, которые могли бы применяться против таких сапротрофных видов, что требуется при проведении, в частности, реставрационных работ.

Сериновые пептидазы и металлопептидазы по результатам геномного и биохимического анализов в большинстве случаев выступают как наиболее часто образуемые микромицетами пептидазы и как ферменты, необходимые для роста грибов. Поэтому они в первую очередь обращают на себя внимание как возможные мишени антигрибных агентов. Интерес представляют также глутаминовые пептидазы; их значительная роль при росте грибов установлена микологическим методом. Важны дополнительные исследования вклада этой группы пептидаз в процесс роста различных видов микромицетов. Пока недостаточно данных об ингибиторах грибных пептидаз, а также о механизме действия и спектре активности таких ингибиторов, хотя их эффективность против роста ряда микромицетов продемонстрирована убедительно. Учитывая специфичность действия ингибиторов пептидаз, мы предлагаем использовать сочетание ингибиторов указанных групп пептидаз при разработке антимикробных препаратов, которые могли бы найти применение в качестве биоцидных средств защиты произведений искусства. Для этого надо провести поиск наиболее эффективных ингибиторов и проверить их действие против широкого спектра известных видов грибов-контаминантов и биодеструкторов. Важно, чтобы ингибиторы не только подавляли рост грибных гиф, но и вызывали гибель спор. Выбор того или иного ингибитора для включения его в комплексный препарат будет зависеть также от результатов исследований его взаимодействия с красочным слоем произведений живописи и другими объектами культуры и искусства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00852 а). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bitoun E., Chavanas S., Irvine A.D., Lonie L., Bodemer C., Paradisi M., Hamel-Teillac D., Ansai S.-i., Mitsuhashi Y., Taïeb A., de Prost Y., Zambruno G., Harper J.I., Hovnanian A. Netherton syndrome: disease expression and spectrum of *SPINK5* mutations in 21 families // *J. Invest. Dermatol.* 2002. Vol. 118. N 2. P. 352–361.
2. Lehesjoki A.E. Molecular background of progressive myoclonus epilepsy // *EMBO J.* 2003. Vol. 22. N 14. P. 3473–3478.
3. Lomas D.A., Loubakos A., Cumming S.A., Belorgey D. Hypersensitive mousetraps, alpha1-antitrypsin deficiency and dementia // *Biochem. Soc. Trans.* 2002. Vol. 30. N 2. P. 89–92.
4. Ritchie B.C. Protease inhibitors in the treatment of hereditary angioedema // *Transfus. Apheresis. Sci.* 2003. Vol. 29. N 3. P. 259–267.
5. Samac D.A., Smigocki A.C. Expression of oryzacystatin I and II in alfalfa increases resistance to the root-lesion nematode // *Phytopathology.* 2003. Vol. 93. N 7. P. 799–804.
6. Telang M., Srinivasan A., Patankar A., Harsulkar A., Joshi V., Damle A., Deshpande V., Sainani M., Ranjekar P., Gupta G., Birah A., Rani S., Kachole M., Giri A., Gupta V. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* // *Phytochemistry.* 2003. Vol. 63. N 6. P. 643–652.
7. Khadeeva, N.V., Kochieva, E.Z., Tcherednitchenko, M.Y., Yakovleva E.Yu., Sydoruk K.V., Bogush V.G., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A. Use of buckwheat seed protease inhibitor gene for improvement of tobacco and potato plant resistance to biotic stress // *Biochemistry (Mosc.).* Vol. 7. N 3. P. 260–267.
8. Ребрикова Н.Л. Биология в реставрации. М.: РИО ГосНИИР, 1999. 184 с.
9. Monod M., Capoccia S., Léchenne B., Zaugg C., Holdom M., Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi // *Int. J. Med. Microbiol.* 2002. Vol. 292. N 5–6. P. 405–419.
10. López-Otín C., Bond J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 45. P. 30433–30437.
11. Barrett A.J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases // *Methods Enzymol.* 1994. Vol. 244. N 1. P. 1–15.
12. Budak S.O., Zhou M., Brouwer C., Wiebenga A., Benoit I., Di Falco M., Tsang A., de Vries R.P. A genomic survey of proteases in *Aspergilli* // *BMC Genomics.* 2014. Vol. 15: 523.
13. Han X., Chakraborti A., Zhu J., Liang Z.-X., Li J. Sequencing and functional annotation of the whole genome of the filamentous fungus *Aspergillus westerdijkiae* // *BMC Genomics.* 2016. Vol. 17: 633.
14. Reichard U., Léchenne B., Asif A.R., Streit F., Grouzmann E., Jousson O., Monod M. Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acidic pHs // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. Vol. 72. N 3. P. 1739–1748.
15. Da Silva R.R., de Freitas Cabral T.P., Rodrigues A., Cabral H. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation // *Braz. J. Microbiol.* 2013. Vol. 44. N 1. P. 235–243.
16. López-Pérez M., Ballester A.R., González-Candelas L. Identification and functional analysis of *Penicillium digitatum* genes putatively involved in virulence towards citrus fruit // *Mol. Plant Pathol.* 2015. Vol. 16. N 3. P. 262–275.
17. Ogórek R., Dylag M., Kozak B. Dark stains on rock surfaces in Driny Cave (Little Carpathian Mountains, Slovakia) // *Extremophiles.* 2016. Vol. 20. N 5. P. 641–652.
18. Kubicek C.P., Harman G.E. *Trichoderma* and *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics. Vol. 1. CRC Press, 2002. 300 pp.
19. Sandoval-Denis M., Sutton D.A., Cano-Lira J.F., Gené J., Fothergill A.W., Wiederhold N.P., Guarro J. Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities // *J. Clin. Microbiol.* 2014. Vol. 52. N 6. P. 2112–2125.
20. Markovich N.A., Kononova G.L. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2003. Vol. 39. N 4. P. 341–351.
21. Shakeri J., Foster H.A. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects // *Enzyme Microb. Tech.* 2007. Vol. 40. N 4. P. 961–968.
22. Suárez M.B., Sanz L., Chamorro M.I., Rey M., González F.J., Llobel A., Monte E. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease // *Fungal Genet. Biol.* 2005. Vol. 42. N 11. P. 924–934.
23. 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. Enabling low cost biopharmaceuticals: a systematic approach to delete proteases from a well-known protein production host *Trichoderma reesei* // *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10. N 8: e0134723.
24. Li J., Gu F., Wu R., Yang J.K., Zhang K.-Q. Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in fungi // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7: 45456.
25. Viterbo A., Harel M., Chet I. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots // *FEMS Microbiol. Lett.* 2004. Vol. 238. N 1. P. 151–158.
26. Thomma B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite // *Mol. Plant Pathol.* 2003. Vol. 4. N 4. P. 225–236.
27. Шамрайчук И.Л., Кураков А.В., Белозерский М.А., Белякова Г.А., Дунаевский Я.Е. Протеолитическая активность и образование меланина фитопатогенным грибом *Alternaria tomatophila* // *Микол. фитопатол.* 2017. Т. 51. № 6. С. 390–393.
28. Boitano S., Flynn A.N., Sherwood C.L., Schulz S.M., Hoffman J., Gruzina I., Daines M.O. *Alternaria alternata* serine proteases induce lung inflammation and airway epithelial cell activation via PAR2 // *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 2011. Vol. 300. N 4. P. 605–614.
29. Matsuwaki Y., Wada K., White T., Moriyama H., Kita H. *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.* 2012. Vol. 158. N 1. P. 19–29.
30. Chandrasekaran M., Sathiyabama M. Production, partial purification and characterization of protease from a

phytopathogenic fungi *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sorauer // J. Basic Microbiol. 2014. Vol. 54. N 8. P. 763–774.

31. Chandrasekaran M., Chandrasekar R., Chun S.C., Sathiyabama M. Isolation, characterization and molecular three-dimensional structural predictions of metalloprotease from a phytopathogenic fungus, *Alternaria solani* (Ell. And Mart.) Sor. // J. Biosci. Bioeng. 2016. Vol. 122. N 2. P. 131–139.

32. Krishnan P., Ma X., McDonald B.A., Brunner P.C. Widespread signatures of selection for secreted peptidases in a fungal plant pathogen // BMC Evol. Biol. 2018. Vol. 18. N 7. P. 1–10.

33. Бирштейн В.Я., Голиков В.П., Горин И.П., Гренберг Ю.И., Девина Р.А., Иванов В.А., Косолапов А.И., Лукьянов Б.Б., Наумова М.М., Петушкова Ю.П., Писарева С.А., Ребрикова Н.Л., Таскаева Ю.М., Тоскина И.Н., Цейтлина М.М. Технология, исследование и хранение произведений станковой и настенной живописи. М.: Изобразительное искусство, 1987. 392 с.

34. 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. Integrated activity and genetic profiling of secreted peptidases in *Cryptococcus neoformans* reveals an aspartyl peptidase required for low pH survival and virulence // PLOS Pathog. 2016. Vol. 12. N 12: e1006051.

35. Shi L., Li R., Bai L., Lu Q., Chen B. Prb1, a subtilisin-like protease, is required for virulence and phenotypical traits in the chestnut blight fungus // FEMS Microbiol. Lett. 2014. Vol. 359. N 1. P. 26–33.

36. López-Otin C., Bond J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. N 45. P. 30433–30437.

37. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38. Suppl. 1. P. D227–D233.

38. Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors // Biochem. J. 2004. Vol. 378. N 3. P. 705–716.

39. Christeller J.T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability // FEBS J. 2005. Vol. 272. N 22. P. 5710–5722.

40. Rawlings N.D. Peptidase inhibitors in the MEROPS database // Biochimie. 2010. Vol. 92. N 11. P. 1463–1483.

41. dos Santos A.L.S. Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events // World J. Biol. Chem. 2011. Vol. 2. N 3. P. 48–58.

42. Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. 328 с.

43. Bode W., Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases // Eur. J. Biochem. 1992. Vol. 204. N 2. P. 433–451.

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

45. O'Donoghue A.J., Mahon C.S., Goetz D.H., O'Malley J.M., Gallagher D.M., Zhou M., Murray P.J., Craik C.S., Tuohy M.G. Inhibition of a secreted glutamic peptidase prevents growth of the fungus *Talaromyces emersonii* // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. N 43. P. 29186–29195.

46. Ballester A.R., López-Pérez M., de la Fuente B., González-Candelas L. Functional and pharmacological analyses of the role of *Penicillium digitatum* proteases on virulence // Microorganisms. 2019. Vol. 7. N 7: 198.

47. Cai X., Xie X., Fu N., Wang S. Physico-chemical and antifungal properties of a trypsin inhibitor from the roots of *Pseudostellaria heterophylla* // Molecules. 2018. Vol. 23. N 9: 2388.

Поступила в редакцию 16.04.2020 г.

После доработки 01.06.2020 г.

Принята в печать 23.06.2020 г.

## REVIEW

# Fungal proteolytic enzymes and their inhibitors as perspective biocides with antifungal action

I.L. Shamraychuk<sup>1,2,\*</sup>, G.A. Belyakova<sup>3</sup>, I.M. Eremina<sup>2</sup>,  
A.V. Kurakov<sup>3</sup>, M.A. Belozersky<sup>1</sup>, Y.E. Dunaevsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Proteins, A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–40, Moscow, 119992, Russia;

<sup>2</sup>Laboratory of Chemico-Biological Researches, The Grabar Art Conservation Center, ul. Radio 17–6, Moscow, 105005, Russia;

<sup>3</sup>Department of Mycology and Algology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

\*e-mail: irashamr@yandex.ru

The review is dedicated to search for peptidase groups responsible for fungal growth and for inhibitors of these peptidases. Available data on diversity, significance, distribution and peculiarities of proteolytic enzymes of fungi of the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Alternaria* are discussed. According to analysis of the data we concluded that serine, metallo- and glutamic peptidases are necessary for fungal growth. Thus, these enzymes are considered as perspective targets for inhibitors that may serve as the reason to search for such inhibitors and development of novel biocides on their basis that protect works of art against biodestruction.

**Keywords:** peptidases, inhibitors, biocides, fungal biodestructors, pathogens, saprotrophs, review

**Сведения об авторах**

*Шамрайчук Ирина Леонидовна* – эксперт по технико-технологической экспертизе в лаборатории химико-биологических исследований ВХНРЦ им. академика И.Э. Грабаря, соискатель отдела белков растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-499-763-37-10; e-mail: [irashamr@yandex.ru](mailto:irashamr@yandex.ru)

*Белякова Галина Алексеевна* – канд. биол. наук, доц. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-49; e-mail: [adm-odo@yandex.ru](mailto:adm-odo@yandex.ru)

*Еремина Ирина Михайловна* – зав. лабораторией химико-биологических исследований ВХНРЦ имени И.Э. Грабаря. Тел.: 8-499-763-37-10; e-mail: [i.m.eremina@grabar.ru](mailto:i.m.eremina@grabar.ru)

*Кураков Александр Васильевич* – докт. биол. наук, зав. кафедрой микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-70; e-mail: [kurakov57@mail.ru](mailto:kurakov57@mail.ru)

*Белозерский Михаил Андреевич* – докт. биол. наук, зав. отделом белков растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-51; e-mail: [mbeloz@belozersky.msu.ru](mailto:mbeloz@belozersky.msu.ru)

*Дунаевский Яков Ефимович* – докт. биол. наук, гл. науч. сотр. НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-51; e-mail: [dun@belozersky.msu.ru](mailto:dun@belozersky.msu.ru)