

Г. В. САМСОНОВ, Л. К. ШАТАЕВА, О. В. ОРШЕВСКАЯ

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОТЕАЗЫ ИЗ ГРИБА *ASPERGILLUS TERRICOLA*

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 6 XII 1971)

К настоящему времени выделены и идентифицированы пять нейтральных протеаз из грибов рода *Aspergillus* следующих видов: *Asp. saitoi* (1), *Asp. oryzae* (2, 3), *Asp. sojae* (4), *Asp. flavus* (5). В предлагаемой работе сообщаются данные об изучении новой нейтральной протеазы, выделенной А. А. Имшенецким с сотрудниками из *Asp. terricola* (6). Ранее сообщалось о тромболитическом действии протеолитических препаратов, полученных из этого гриба, а также о возможности с помощью ионнообменного метода достигнуть высокой степени очистки этих ферментных препаратов (7). Тромболитический препарат террилитин, получаемый в Ленинградском научно-исследовательском институте антибиотиков, содержит нейтральную протеазу, незначительное количество кислой амилазы и продуктов автолиза протеазы. Методом гельхроматографии на биогеле Р-150 эти компоненты хорошо разделяются (8). Полученная при этом протеаза (террилитин) является ферментом, гомогенным при центрифугировании и электрофорезе (8). Коэффициент седиментации, определенный в ультрацентрифуге УЦА-5, равен  $3 \cdot 10^{-13}$ . Коэффициент диффузии протеазы, по данным наших исследований на поляризационном диффузомере Цветкова, равен  $10,4 \cdot 10^{-7}$ ; рассчитанный из этих параметров молекулярный вес составил 26 400. Выделенная на биогеле Р-150 индивидуальная протеаза была изучена в электрофорезе на полиакриламидном геле в интервале рН 3,5—8,0 при 10°. Зависимость электрофоретической подвижности зоны террилитина от величины рН раствора позволила определить изоэлектрическую точку фермента:  $pI = 4,6$ .

Террилитин подвергается автолизу с образованием неактивных продуктов. Это было показано нами как по изучению закономерности падений активности фермента в растворе, так и гель-хроматографическим анализом автолизата. При определении N-концевых аминокислот в продуктах автолиза по реакции динитрофенилирования (9) нами были обнаружены аланин, серин, глицин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Автолитическое расщепление протеазы не позволило нам на данной стадии исследования идентифицировать N-концевую аминокислоту террилитина. В продуктах кислотного гидролиза террилитина методом бумажной хроматографии были обнаружены моносахара: манноза, глюкоза, галактоза.

Полный кислотный гидролиз террилитина проводили в 6N соляной кислоте в присутствии меркаптоэтанола при 105° в течение 48 час. Аминокислотный анализ гидролизата, выполненный на анализаторе тина 60-20 А (Чехословакия), позволил установить общую формулу террилитина:  $\text{Лиз}_{13}\text{Гис}_4\text{Арг}_3\text{Асп}_{25}\text{Тре}_{13}\text{Сер}_{23}\text{Глу}_{16}\text{Про}_4\text{Гли}_{23}\text{Ала}_{29}\text{Вал}_{15}\text{Мет}_1\text{Иле}_{10}\text{Лей}_{12}\text{Тир}_7\text{Фен}_6\text{Трп}_3$ . Цистин — цистеин определяли в виде цистеиновой кислоты при гидролизе в присутствии диметилсульфоксида (10). Установлено отсутствие цистеина в молекуле террилитина. Рассчитанный по аминокислотному

составу молекулярный вес террилитина равняется 26 810, что сопоставимо с приведенной выше величиной 26 400, полученной при использовании физических методов исследования — седиментации и диффузометрии.

В табл. 1 приведены данные об аминокислотном составе ряда нейтральных протеаз, выделенных из грибов рода *Aspergillus*. Полученные результаты показывают, что протеаза из *Asp. terricola* имеет близкое строение с протеазами из *Asp. oryzae* и *Asp. flavus*: они имеют сходный аминокислотный состав, высокое содержание серина, аспарагина и глутамина; четыре фермента из шести не содержат цистеина. Все протеазы имеют углеводный компонент в молекуле.

Т а б л и ц а 1

Аминокислотный состав нейтральных протеаз из грибов рода *Aspergillus*

Продукцент	Лиз	Гис	Арг	Асп	Тре	Сер	Глу	Про	Гли	Ала	Цис	Вал	Мет	Иле	Лей	Тир	Фен	Трип	Источ-ник
<i>Asp.saitoi</i>	11	3	1	34	25	42	22	10	31	20	2	22	0	11	19	17	13	1	(1)
<i>Asp.oryzae</i> (B)	11	4	2	21	11	19	12	4	19	23	0	15	0	9	9	5	5	2	(2)
<i>Asp.oryzae</i> (C)	12	4	3	21	13	23	13	5	21	23	0	16	1	10	10	4	6	2	(3)
<i>Asp.sojae</i>	14	5	3	31	18	28	19	6	27	32	2	18	2	14	14	8	7	2	(4)
<i>Asp.flavus</i>	11	3	2	21	11	20	12	4	20	23	0	15	0	9	9	5	5	2	(5)
<i>Asp.terricola</i>	13	4	1	25	13	23	16	4	25	29	0	15	1	10	12	7	6	3	Нашие данные

П р и м е ч а н и е. Террилитин особенно близок по аминокислотному составу к протеазам из *Asp. oryzae* (3) и *Asp. flavus* (5).

Микроорганизмы, синтезирующие эти ферменты, находятся в близком филогенетическом родстве, что позволяет ставить вопрос о сопоставлении не только состава, но и последовательности аминокислот в рассмотренных протеазах.

Ранее нами было показано, что оптимум протеолитического действия террилитина расположен в области значений pH 6,8—7,4 (7). Энзиматическая специфичность террилитина была нами измерена по скорости расщепления дипептидов при pH 7,0, 37° и начальной концентрации субстрата 5 мг/мл. Измеряли накопление  $\alpha$ -аминного азота в системе пингидриновым методом. Получены следующие результаты (скорость гидролиза в мол.  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>/(мол. фермента в минуту)):

Аспарагил — гистидин	1,4
Аспарагил — глицин	1,9
Пролил — тирозин	16,0
Гистидил — лейцин	10,7
Глутаминил — аспарагин	27,0
Лейцин — валин	27,0

Амидазная активность террилитина была измерена по скорости гидролиза *L*-аспарагина до аспарагиновой кислоты по методу, принятому для определения активности *L*-аспарагиназы из *E. coli* (11). Было найдено, что террилитин обладает *L*-аспарагиназной удельной активностью  $25 \pm 5$  международных единиц на 1 мг белка, т. е. в 30 раз меньше, чем у индивидуальной *L*-аспарагиназы *E. coli*.

Специфичность действия других протеаз из грибов *Aspergillus* до настоящего времени не изучена, хотя имеется сообщение, что протеаза *Asp. flavus* гидролизует пептидные связи, включающие лейцин, тирозин и фенилаланин (12), что также указывает на сходство ее с изученной нами протеазой из *Asp. terricola*.

Институт высокомолекулярных соединений  
Академии наук СССР  
Ленинград

Поступило  
6 XII 1971

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> E. Schishima, F. Yoshida, *Biochim. et biophys. acta*, **147**, 341 (1967).  
<sup>2</sup> A. R. Subramanian, G. Kalnitsky, *Biochemistry*, **3**, 1868 (1964). <sup>3</sup> A. Nordwig, W. E. Jahn, *European J. Biochem.*, **3**, 519 (1968). <sup>4</sup> E. Hayashi, D. Fukushima, *Agr. Biol. Chem., Tokyo.*, **34**, 1237 (1967). <sup>5</sup> J. Turkova, O. Mikeš, K. Gančev, *Biochim. et biophys. acta*, **178**, 100 (1969). <sup>6</sup> А. А. Имшенецкий, С. З. Броцкая, В. В. Коршунов, *ДАН*, **163**, 737 (1965). <sup>7</sup> Л. К. Шатаева, А. А. Селезнева и др., В сборн. Синтез, структура и свойства полимеров, «Наука», 1970, стр. 225. <sup>8</sup> О. В. Орлиевская, Л. К. Шатаева, Г. В. Самсонов, *Прикл. биохим. и микробиол.*, **7**, 355 (1971). <sup>9</sup> H. Fraenkel, J. J. Harris, A. L. Levy, *Meth. Biochem. Anal.*, **2**, 363 (1955). <sup>10</sup> R. L. Spenser, *Anal. Biochem.*, **32**, 185 (1969). <sup>11</sup> J. Roberts, G. Burson, J. M. Hill, *J. Bacteriol.*, **95**, 2117 (1968). <sup>12</sup> J. Turkova, O. Mikeš, *Biochim. et biophys. acta*, **198**, 386 (1970).