

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Попова Елизавета Андреевна

**Получение и свойства протеиназы *Aspergillus ustus*,
высокоактивной в отношении фибриллярных белков**

Специальности: 03.02.03 – микробиология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители

- *Котова Ирина Борисовна, доктор биологических наук, профессор*
- Осмоловский Александр Андреевич, кандидат биологических наук*

Официальные оппоненты

- *Дунаевский Яков Ефимович — доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, отдел белков растений, главный научный сотрудник*
- Кураков Александр Васильевич — доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микологии и альгологии, заведующий кафедрой*
- Антропова Анна Борисовна — кандидат биологических наук, ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, отдел аллергологии, лаборатория экологической биотехнологии, ведущий научный сотрудник*

Защита диссертации состоится «21» апреля 2020 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.13 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, факультет почвоведения МГУ, аудитория М-2.

E-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/282429469/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

Общая характеристика работы

Актуальность темы работы и степень ее разработанности

Поиск новых продуцентов протеолитических ферментов, в том числе активных в отношении фибриллярных белков, является актуальной задачей для современной микробиологии. Востребованность протеиназ, а также частные особенности организации промышленной сферы и рынка биотехнологий в различных странах обуславливают неугасающий интерес к подобным работам. Так, для решения некоторых задач фармацевтической, пищевой и легкой промышленности требуются ферменты направленного действия, способные эффективно расщеплять такие фибриллярные белки как коллаген, эластин и фибрин. Их используют для тендерезации мяса, обработки меха и шкур животных, широко применяют в терапии различных заболеваний (Bhagwat & Dandge, 2018).

В настоящее время фибринолитические, коллагенолитические и эластинолитические протеиназы получают из разных микробных источников, однако существующие разработки не лишены некоторых недостатков. Так, например, активно используемыми продуцентами коллагеназ являются анаэробные бактерии рода *Clostridium*, такие как *C. histolyticum* и *C. tetani*, но их патогенная природа накладывает определённые ограничения и усложняет производственный процесс (Bhagwat & Dandge, 2018). Похожие проблемы возникают и при получении эластаз. Данные ферменты рассматривают в качестве фактора вирулентности микроорганизмов и, как правило, получают с помощью бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и микромицета *Aspergillus fumigatus*, ассоциированных с заболеваниями респираторной системы человека и животных (Zohri et al., 2017).

Среди всего объема научных публикаций, посвященных выявлению новых микробных фибринолитических, коллагенолитических и эластинолитических протеиназ, которые регулярно появляются в рецензируемых научных журналах по всему миру (например, Hu et al., 2019, Wu et al., 2019), значимое место занимают исследования образования таких протеиназ мицелиальными грибами (Martínez-Medina et al., 2019). Микромицеты имеют ряд важных преимуществ по сравнению с другими продуцентами протеолитических ферментов – они способны к образованию обширного комплекса протеиназ в широком диапазоне pH и температур при росте на различных недорогих субстратах. Такие особенности позволяют затрачивать меньшее количество ресурсов для реализации производственных схем, а также использовать микромицетов не только для решения задач получения биотехнологических продуктов, но и для утилизации органических отходов агропромышленного комплекса. В совокупности, использование мицелиальных грибов в качестве продуцентов протеолитических ферментов позволяет не

только увеличить эффективность и снизить стоимость получения протеиназ, но и существенно улучшить экологическую безопасность проектируемого производства, что показано на примере индийской биотехнологической компании “Biocon” (Suryanarayan, 2003; Chandel et al., 2007).

Физиология микромицетов, в том числе регуляция образования протеолитических ферментов, также интересуют ученых уже на протяжении более 70 лет. Несмотря на внушительную историю развития данной тематики, постоянно увеличивающиеся возможности технологического аппарата современной науки открывают все новые и новые горизонты для изучения данной проблемы (Tales et al., 2019; Zhao et al., 2019).

Таким образом, поиск среди микромицетов новых, эффективных продуцентов протеиназ направленного действия, а также изучение физиологии их образования представляется актуальной задачей как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Цель и задачи исследования

Цель работы: изучение способности микромицетов секретировать внеклеточные протеиназы, высокоактивные по отношению к фибриллярным белкам.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Отобрать среди изученных ранее микромицетов, образующих фибринолитические протеиназы, продуцентов протеолитических ферментов, активных к другим фибриллярным белкам.
2. Подобрать оптимальные условия культивирования отобранного микромицета (*A. ustus* 1) для образования протеолитических ферментов, расщепляющих фибриллярные белки.
3. Изучить динамику накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования (ТФК).
4. Выделить протеиназы *A. ustus* 1, высокоактивные в отношении фибриллярных белков, и изучить их свойства.

Научная новизна работы

В работе впервые показана способность микромицета *A. ustus* 1 к образованию новой протеиназы, высокоактивной по отношению к таким фибриллярным белкам, как коллаген, фибрин и эластин.

Выявлены оптимальные условия образования данной протеиназы в условиях глубинного и твердофазного культивирования.

Показано увеличение значений коллагенолитической, фибринолитической и эластинолитической активности протеиназ в условиях ТФК от 1,7 до 9 раз по сравнению с глубинным культивированием.

Новый фермент, образуемый микромицетом *A. ustus* 1, впервые был очищен и охарактеризован по таким показателям, как рН и температурный оптимум, рН и температурная стабильность работы протеиназы, молекулярная масса, субстратная специфичность, природа активного центра, наличие углеводного остатка в составе и изоэлектрическая точка белка.

Практическая значимость работы

Изученный в данной работе микромицет *A. ustus* 1 показал себя в качестве перспективного продуцента протеолитических ферментов, высокоактивных в отношении фибриллярных белков. Образуемая им нейтральная протеиназа обладает высокими значениями фибринолитической, коллагенолитической и эластинолитической активности, что, в сочетании с ее широкой субстратной специфичностью, обеспечивает высокий потенциал использования данного продуцента для получения биотехнологически значимого продукта для дальнейшего использования в таких сферах, как фармакологическая, легкая и пищевая промышленность, а также сельское хозяйство. Разработаны научные основы биотехнологического процесса получения ферментного препарата.

Положения, выносимые на защиту:

1. Микромицет *A. ustus* 1 является перспективным продуцентом новых протеиназ, активных по отношению к фибриллярным белкам.
2. Для образования ферментов с искомыми активностями микромицетом *A. ustus* 1 наиболее подходящим является сочетание источников аминного и минерального азота в составе ферментационной среды. Секреция протеиназ связана с морфолого-цитологическим состоянием мицелия: максимальная активность по отношению к фибриллярным белкам соответствует нахождению культуры в состоянии потери спороношения и уплотнения вегетативного мицелия.
3. Характеристики инертных носителей (площадь доступной для мицелия поверхности и диаметр пор частиц) обеспечивают разную степень доступности питательной среды и кислорода, а также разные условия заякоривания мицелия в субстрат, в совокупности оказывая значительное влияние на образование продуктивного мицелия в системе твердофазного культивирования. Из всех исследованных носителей вермикулит является наилучшим для образования микромицетом *A. ustus* 1 протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков.
4. Протеиназа, образуемая микромицетом *A. ustus* 1, имеет высокий биотехнологический потенциал, поскольку обладает широкой субстратной специфичностью и расщепляет такие фибриллярные белки как коллаген, фибрин и эластин.

5. Потенциальным технологическим преимуществом микромицета *A. ustus* 1 является разобщение во времени максимумов накопления протеиназ, активных в отношении фибриллярных белков, и максимума накопления протеиназ с казеинолитической активностью.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях и симпозиумах: X молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2015); 5 Всероссийский симпозиум с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2015); European Biotechnology Congress (Дубровник, 2017); ISCOMS 2017 (Гронинген, 2017); 18th European Congress on Biotechnology (Женева, 2018); 14th International Conference On Pharmacology and Toxicology (Цюрих, 2019); Всероссийская конференция с международным участием «Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019).

Личный вклад автора

Результаты, изложенные в диссертации, были лично получены автором. Автор самостоятельно планировал и проводил экспериментальную часть работы, анализировал данные и подготавливал публикации по материалам исследования.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах и состоит из введения, 5 глав, заключения и выводов, включая 10 таблиц, 35 рисунков, списка литературы из 186 наименований, из них 14 – на русском и 172 – на английском языке.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Александру Андреевичу Осмоловскому и д.б.н. Ирине Борисовне Котовой за чуткое руководство, помощь и поддержку на всех этапах работы, а также к.б.н. Валериане Георгиевне Крейер и к.б.н. Нине Андреевне Барановой за ценные советы и консультации.

Основное содержание работы

Обзор литературы

Обзор литературы состоит из трех глав: «Фибриллярные белки: коллаген, фибрин и эластин», «Протеолитические ферменты», «Твердофазное культивирование микромицетов». Первая глава посвящена описанию структуры соответствующих фибриллярных белков, во второй главе рассмотрены особенности протеолитических ферментов, способных к их гидролизу, основные продуценты, сферы применения. В

третьей главе дано определение твердофазному способу культивирования микромицетов, обсуждены его преимущества и недостатки.

Материалы и методы

В качестве основных объектов данного исследования были выбраны микромицеты, для которых ранее была показана способность к образованию протеиназ, обладающих фибринолитической и коллагенолитической активностью (Шаркова и др., 2015) из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ. Для оценки протеолитического потенциала отобранных культур проводили их поверхностное культивирование в чашках Петри на агаризованных средах, содержащих в своем составе фибриллярные белки, и рассчитывали энзиматические индексы (EI) по формуле: $EI=(D+d)/D$, где D – диаметр колонии в мм, а d – диаметр зоны гидролиза в мм.

Для изучения продукции внеклеточных протеиназ и определения их активности микроскопические грибы выращивали в условиях глубинного культивирования в колбах Эрленмейера (750 мл) со 100 мл питательной среды на орбитальных качалках (200 об/мин) при 28°C. В качестве посевного материала использовали споровые суспензии 7-суточных культур микромицетов, выращенных на скошенном сусло-агаре. Культивирование проводили в две стадии, сначала на посевной среде, содержащей (в %) сусло – 6,7, глюкозу – 2,0 и пептон – 0,1, а на вторые сутки культивирования 3% биомассы от общего объема посевной среды переносили в ферментационную среду следующего состава (%): глюкоза – 3,0, глицерин – 7,0, гидролизат рыбной муки – 0,5, NaNO₃ – 0,2, KН₂РO₄ – 0,05, MgSO₄ – 0,05.

Изучение влияния источников азота на образование протеолитических ферментов микромицетов проводили на средах, содержащих в качестве единственных источников азота (в %): пептон – 1,0; нитрат аммония – 0,5; нитрат натрия – 0,5; гидролизат рыбной муки – 0,5 и пептон – 0,5; гидролизат рыбной муки – 0,5 и нитрат натрия – 0,2.

Исходное значение pH всех сред устанавливали на уровне 5,5.

Изучение влияния исходных значений pH среды и температуры культивирования для образования протеиназ проводили в диапазоне pH от 4 до 8 и при температурах 25, 28, 30 и 32°C.

Твердофазное культивирование проводили в культуральных флаконах Т-75 («Eppendorf», Германия) в статических условиях при 28°C. В качестве содержащих питательные вещества или инертных носителей твердой фазы использовали пенополиуретан (ППУ, размер частиц приблизительно 5 мм³), вермикулит, кокосовые волокна, пшеничные отруби и силикагель. Во флаконах устанавливали следующее соотношение носитель:среда – во флаконы с ППУ на 1 г носителя добавляли 8,3 мл

ферментационной среды №1, с вермикулитом – 4,2 мл, с кокосовыми волокнами – 2,5 мл, с пшеничными отрубями – 2,3 мл и с силикагелем – 1,4 мл, соответственно. При культивировании микромицета на пшеничных отрубях, которые являются и носителем, и питательным субстратом, дополнительно изучали образование протеиназ без добавления дополнительных питательных веществ, заменяя ферментационную среду дистиллированной водой. Инокулирование осуществляли 1 мл суспензии спор культуры в дистиллированной воде с Твин-80. По истечении времени культивирования в культуральные флаконы добавляли 0,05 М Na-ацетатный буфер (рН 5,5) и флаконы помещали на орбитальную качалку (200 об/мин) на 30 мин. Во флаконы, содержащие ППУ, вносили 80 мл буфера, с вермикулитом – 20 мл, с кокосовыми волокнами и пшеничными отрубями – по 60 мл буфера, с силикагелем – 15 мл. Элюат отделяли от носителя фильтрованием через фильтровальную бумагу («ФС», Россия). В фильтрате проводили определение активности протеиназ.

Общую протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона-Хагихары по количеству тирозина в продуктах протеолиза, не осаждаемых ТХУ, после десятиминутного гидролиза 1% раствора казеина 0,05М Трис-НСl-буфере, рН 8,2 и 37°C, как описано ранее (Osmolovskiy et al., 2016). За единицу активности ($E_{\text{Тир}}$) принимали количество мкмоль тирозина, отщепившегося за минуту в 1 мл исследуемой пробы.

Фибринолитическую активность определяли по количеству тирозина в супернатанте после тридцатиминутного гидролиза 1% фибрина в 0,05М Трис-НСl-буфере, рН 8,2 и 37°C (Osmolovskiy et al., 2016; Osmolovskiy et al., 2017). Активность выражали в $E_{\text{Тир}}$.

Коллагенолитическую активность определяли колориметрически по общепринятой методике с использованием 0,2% суспензии азоколлагена (Chavira et al., 1984; Sharkova et al., 2015). Активность выражали в количестве мкг расщепившегося азоколлагена за 1 мин ($E_{\text{Азк}}$).

Определение эластинолитической активности проводили по расщеплению хромогенного пептидного субстрата эластазы – сукцинил-L-аланил-L-аланил-L-аланил-*n*-нитроанилида (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA) (Bieth & Wermuth, 1973). Поглощение определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм. Активности выражали в мкмольх *n*-нитроанилина в мин (E_{pNA}).

Для сравнения коллагенолитической активности протеиназ проводили 5-часовой гидролиз нативного бычьего коллагена. Реакцию проводили согласно общепринятой методике (Zhang et al., 2013). Активность определяли колориметрически, окрашивая продукты реакции нингидриновым реагентом, выражали в CDU. Одна единица расщепления коллагена (CDU) высвобождает пептиды из коллагена в

эквиваленте 1,0 мкмоль L-лейцина за 5 часов, при pH 7,4 при 37°C (по окраске нингидрина).

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 («BioSan», Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре BioSpectrometer kinetic, Eppendorf (Германия).

Для изучения свойств протеиназ получали комплексные препараты образуемых микромицетом внеклеточных белков путем высаливания сульфатом аммония (608 грамм $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 1 литр фильтрата), с последующим диализом осадка. Изоэлектрофокусирование комплексного препарата проводили по методу Вестерберга в градиенте pH амфолинов от 3,5-10 при градиенте плотности сахарозы 0-40% в колонке объемом 110 мл фирмы LKB (Швеция) при напряжении 800 В в течение 36 ч. Затем содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1,5 мл. В каждой фракции определяли pH, поглощение белка при 280 нм и общую протеолитическую активность (Vesterberg, 1971).

Нативный электрофорез в ПААГ проводили по методу Дэвиса в Трис-глициновом буфере (Davis, 1964). Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Лэммли с изменениями, при силе тока в 50 мА (Laemmli, 1970). Для определения молекулярной массы фермента использовали набор метчиков Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific, Lithuania).

Ингибиторный анализ проводили с ингибиторами различных классов протеиназ – ЭДТА, *o*-фенотропин, *n*-ХМБ (*пара*-хлормеркурибензоат), PMSF (фенилметилсульфонил фторид). Их действие исследовали в молярном соотношении фермент:ингибитор 1:10 и 1:100. Остаточную активность фермента определяли при 37°C с азоколлом после прединкубации фермента 90 мин при 25°C. Значение активности выражали в процентах от контроля.

Основные результаты и обсуждение

Выявление способности отобранных микромицетов к образованию протеиназ, расщепляющих фибриллярные белки

Для оценки протеолитического потенциала отобранных штаммов были рассчитаны значения энзиматических индексов на 4х агаризованных средах, содержащих в своем составе белковые субстраты. Поскольку гидролиз казеината натрия позволял оценить протеолитический потенциал по отношению к глобулярным белкам, а гидролиз фибрина, эластина и желатина - по отношению к фибриллярным, еще одним важным критерием для отбора перспективных продуцентов являлись значения отношения энзиматических индексов друг к другу, а именно $\text{EI}_{\text{Каз}}$ к $\text{EI}_{\text{Жел}}$, $\text{EI}_{\text{Фиб}}$ и $\text{EI}_{\text{Эл}}$. Данные соотношения позволяли

выявить продуцентов протеиназ, более специфичных к расщеплению фибриллярных белков. Как видно из табл. 1, на среде, содержащей желатин в качестве белкового субстрата, максимальное значение $EI_{\text{Жел}}$ было выявлено для микромицета *A. ustus* 1 и составило 1,96, что в 1,2 раза больше, чем значения, полученные для *T. inflatum* k1 и *B. bassiana* 2, и в 1,5 раза больше значений, полученных для *P. lilacinus* k1 и *C. cladosporioides* 2.

Таблица 1.

Энзиматические индексы микромицетов на средах с различными белковыми субстратами

Микромицет	На среде с казеином ($EI_{\text{Каз}}$)	На среде с желатином ($EI_{\text{Жел}}$)	На среде с фибрином ($EI_{\text{Фиб}}$)	На среде с эластином ($EI_{\text{Эл}}$)	$EI_{\text{Каз}} / EI_{\text{Жел}}$	$EI_{\text{Каз}} / EI_{\text{Фиб}}$	$EI_{\text{Каз}} / EI_{\text{Эл}}$
<i>Tolypocladium inflatum</i> k1	1,75	1,64	1,25	1,56	1,07	1,40	1,13
<i>Beauveria bassiana</i> 2	1,73	1,60	1,17	1,67	1,08	1,48	1,04
<i>Aspergillus ustus</i> 1	1,63	1,96	1,16	1,13	0,83	1,41	1,44
<i>Paecilomyces lilacinus</i> k1	1,10	1,29	1,09	1,11	0,85	1,01	0,99
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 2	1,71	1,26	1,2	1,08	1,35	1,42	1,58

Соотношение $EI_{\text{Каз}} / EI_{\text{Жел}}$ для *A. ustus* 1 оказалось минимальным среди изученных микромицетов (0,83), что говорит о том, что протеиназы, образуемые данным микромицетом, обладают выраженной активностью к фибриллярным белкам. Также перспективными для дальнейшего изучения показали себя *T. inflatum* k1 и *B. bassiana* 2: при достаточно высоких значениях $EI_{\text{Жел}}$, $EI_{\text{Фиб}}$ и $EI_{\text{Эл}}$, соотношения $EI_{\text{Каз}} / EI_{\text{Жел}}$ составляют 1,07 и 1,08, соответственно. Значения энзиматических индексов, рассчитанные для микромицетов *P. lilacinus* k1 и *C. cladosporioides* 2, были низкими, что позволило исключить данные штаммы из работы.

Для количественной оценки активностей протеиназ, образуемых отобранными штаммами (*A. ustus* 1, *T. inflatum* k1 и *B. bassiana* 2), были определены значения коллагенолитической (в реакции с азоколлагеном) и общей протеолитической (в реакции с казеином) активностей на 5 сутки культивирования в ферментационной среде, содержащей

соевую муку в качестве источника азота. Так, максимальное значение коллагенолитической активности было показано для микромицета *A. ustus* 1 ($110,6 \text{ Е}_{\text{АЗК}}/\text{мл} \times 10^{-3}$), тогда как значения данной активности у протеиназ, образуемых микромицетами *T. inflatum* k1 и *B. bassiana* 2, были в 1,62 и 1,95 раз ниже, соответственно. Максимальное значение общей протеолитической активности (ОПА) было выявлено у протеиназ, образуемых *T. inflatum* k1 – $69,2 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$, а активность, полученная для *B. bassiana* 2 оказалась на 18% меньше – $56,8 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$. Важно отметить, что минимальное значение ОПА было показано для микромицета *A. ustus* 1 – $29,8 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$, что, в сочетании с высоким значением коллагенолитической активности делает данный штамм наиболее интересным с точки зрения задачи поиска продуцента с выраженной активностью в отношении фибриллярных белков.

Были изучены динамики накопления протеиназ, образуемых *A. ustus* 1 и *T. inflatum* k1 (рис. 1). Максимальные значения ОПА для *T. inflatum* k1 были выявлены на 3 и 5 сутки культивирования и составили $70,3$ и $64,4 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$, соответственно. Максимум образования протеиназ *A. ustus* 1, обладающих общей протеолитической активностью, был показан на 5 сутки, а значение данной активности оказалось более чем в 2 раза ниже активности, показанной для *T. inflatum* k1, – $30,53 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$. Пик образования коллагенолитических протеиназ микромицетом *T. inflatum* k1 ($69,76 \text{ Е}_{\text{АЗК}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) был выявлен на 5 сутки культивирования, тогда как для *A. ustus* 1 максимальные значения ($122,6 \text{ Е}_{\text{АЗК}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) данной активности наблюдали на сутки раньше.

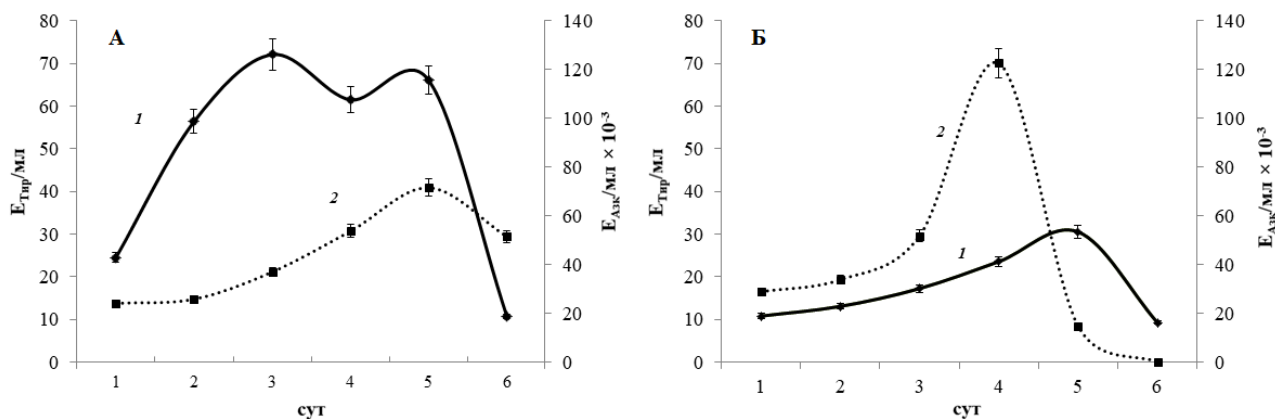


Рис. 1. Динамики накопления протеолитических ферментов микромицетами *T. inflatum* k1 (А) и *A. ustus* 1 (Б) на среде с соевой мукой. 1 – общая протеолитическая активность, 2 – коллагенолитическая активность.

Также важно отметить, что значение коллагенолитической активности протеиназ, образуемых *A. ustus* 1, оказалось в 1,75 раз больше, чем у *T. inflatum* k1. Более высокие значения активности по отношению к фибриллярным белкам и скорость накопления данных ферментов определили выбор микромицета *A. ustus* 1 для дальнейшего изучения.

Подбор оптимальных условий культивирования микромицета *A. ustus* 1

Было изучено влияние источников азота в составе питательной среды на образование протеолитических ферментов микромицетом *A. ustus* 1 при глубинном культивировании (ГК). Для этого определяли значения общей протеолитической, коллагенолитической и фибринолитической активностей в динамике накопления протеиназ, образуемых данным продуцентом в 5 различных вариантах питательных сред, содержащих либо только источники аминного азота (гидролизат рыбной муки и пептон), либо только минерального (NaNO_3 и NH_4NO_3), либо их сочетания.

На рис 2. представлена динамика накопления протеиназ, образуемых *A. ustus* 1 на среде №1, содержащей (в %): гидролизат рыбной муки - 0,5 и NaNO_3 - 0,2 в качестве источников азота. При росте продуцента на данной среде максимальные значения всех типов изученной активности были обнаружены на 5 сутки культивирования, они составили 176,10 $\text{E}_{\text{Тир}}/\text{мл}$ и 34,79 $\text{E}_{\text{Тир}}/\text{мл}$ для общей протеолитической и фибринолитической активностей и $143,99 \text{ E}_{\text{Азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$ для коллагенолитической активности.

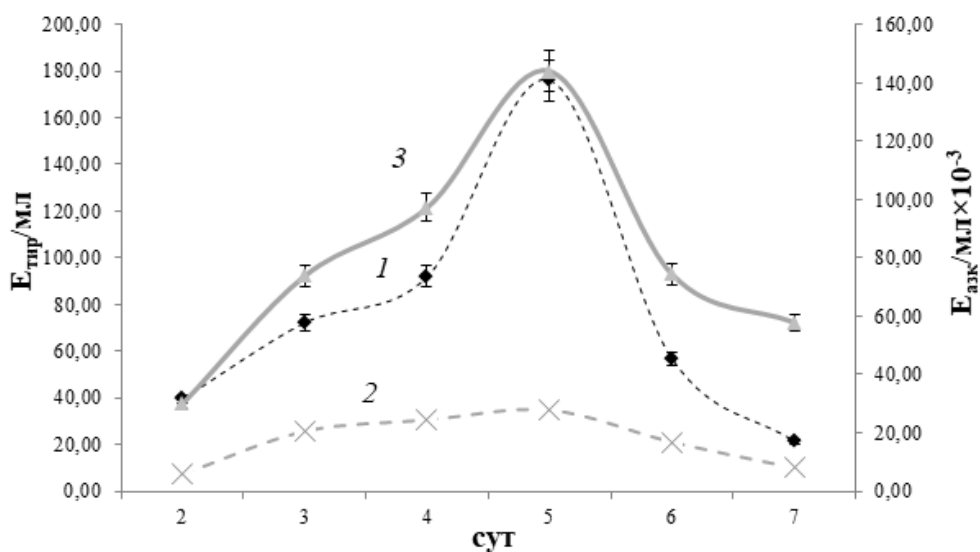


Рис. 2. Динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 на среде №1, содержащей гидролизат рыбной муки (0,5%) и NaNO_3 (0,2%) в качестве источников азота. 1 – казеинолитическая, 2 – фибринолитическая, 3 – коллагенолитическая активность.

На рис. 3 представлены динамики накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 на средах № 2-5. Так, максимальные значения коллагенолитической ($108,6 \text{ E}_{\text{Азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) и общей протеолитической ($177,1 \text{ E}_{\text{Тир}}/\text{мл}$) активности, полученные на среде №2, содержащей только источники аминного азота (в %) - гидролизат рыбной муки - 0,5, пептон – 0,5, также были обнаружены на 5 сутки культивирования (рис.3А). По сравнению с результатами,

полученными на среде №1, наблюдали незначительное повышение общей протеолитической активности – менее 1%. Максимальное значение коллагенолитической активности, напротив, составило лишь 75% от такового, полученного на среде, содержащей как источники аминного, так и минерального азота. Пик фибринолитической ($38,4 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$) активности при культивировании на среде №2 приходился на 3 сутки культивирования, его значение превысило значение, полученное на среде №1, на 10%. При культивировании на среде №3 (рис. 3Б), содержащей только один минеральный источник азота ($0,5\% \text{ NaNO}_3$), значения всех типов активности были низкими. Максимумы общей протеолитической ($13,45 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$) и коллагенолитической ($24,19 \text{ Е}_{\text{Азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) активности были достигнуты на 5 сутки культивирования, а фибринолитическая активность не была выявлена вовсе. Очевидно, в данном случае можно наблюдать явление азотной катаболитной репрессии.

На рис. 3В отображена динамика накопления протеиназ на среде №4, также содержащей только один минеральный источник азота ($0,5\% \text{ NH}_4\text{NO}_3$). В данном случае, максимальные значения всех изученных типов активности были разнесены во времени. Так, максимум общей протеолитической активности ($136,04 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$) был выявлен на 5 сутки культивирования, коллагенолитической ($26,47 \text{ Е}_{\text{Азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) – на 4, а фибринолитической ($80,26 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$) – на 3 сутки культивирования. В данном случае также можно говорить о проявлении азотной катаболитной репрессии.

Значения протеолитической активности, выявленные на среде №5 (с $1,0\%$ пептона), оказались достаточно низкими (рис. 3Г). Стоит отметить, что максимум накопления протеиназ, обладающих коллагенолитической ($23,6 \text{ Е}_{\text{Азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) и общей протеолитической ($15,8 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$) активностью был обнаружен на 4, а максимум накопления фибринолитических ($17,11 \text{ Е}_{\text{Тир}}/\text{мл}$) протеиназ – на 3 сутки культивирования.

Таким образом, для образования искомых ферментов микромицетом *A. ustus* 1 наиболее подходящим является сочетание источников аминного и минерального азота в составе ферментационной среды.

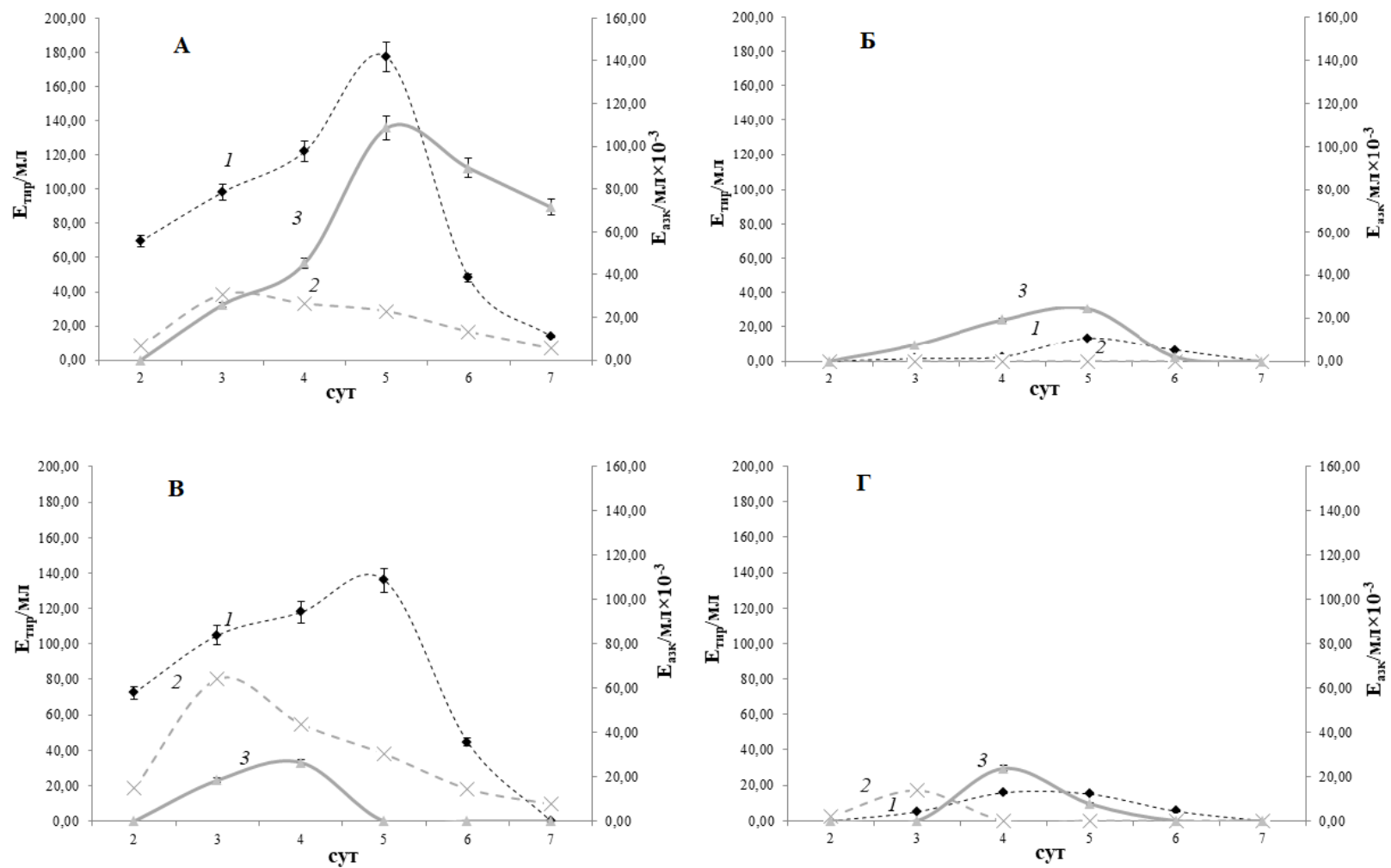


Рис. 3. Динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1. А – на среде №2 (по 0,5% гидролизата рыбной муки и пептона), Б – на среде №3 (0,5% NaNO_3), В – на среде №4 (0,5% NH_4NO_3), Г – на среде №5 (1,0% пептона). 1 – казеинолитическая, 2 – фибринолитическая, 3 – коллагенолитическая активность.

Была изучена линейная скорость роста *A. ustus* 1 и его морфолого-цитологические особенности на ферментационной агаризованной среде №1 и на сусло-агаре. Колонии, образованные микромицетом при росте на данных средах, можно охарактеризовать как плоские и бархатистые. При росте на сусло-агаре колонии имели серо-зеленую окраску, характерную для микромицетов данного вида, при росте же на ферментационной среде №1 цвет колоний был более светлым, желто-зеленым. Отличительной особенностью микромицета при росте на используемых средах можно назвать образование ярко-желтого пигмента, диффундирующего в агар, он дает характерную желтую окраску обратной стороне колоний. Максимальная линейная скорость роста микромицета *A. ustus* 1 была выявлена при температуре 28°C на ферментационной агаризованной среде №1, она оказалась на 29,1% выше, чем на сусло-агаре. Таким образом, можно сделать вывод, что наличие в среде гидролизатов белков индуцирует рост микромицета.

Была изучена динамика роста и накопления коллагенолитических протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 при росте на ферментационной среде № 1. Максимальное значение коллагенолитической активности было выявлено на 5 сутки культивирования, в конце логарифмической фазы роста, оно составило $134,86 \text{ E}_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$, значение удельной активности на биомассу – $5,39 \text{ E}_{\text{азк}}/\text{мг} \times 10^{-3}$. Также стоит отметить, что к моменту достижения максимального значения коллагенолитической активности (5 сутки культивирования) спороношение прекращалось, а мицелий можно было охарактеризовать как плотный, с гранулированной цитоплазмой.

Для изучения влияния температуры культивирования на продукцию протеиназ *A. ustus* 1 определяли значения казеинолитической, фибринолитической и коллагенолитической активности протеиназ, образуемых данным микромицетом при глубинном культивировании на ферментационной среде №1 в диапазоне температур от 25 до 32°C. Максимальные значения всех изученных типов активности были выявлены при температуре культивирования 28°C: значение казеинолитической активности составило $65,2 \text{ E}_{\text{тир}}/\text{мл}$, фибринолитической – $25,8 \text{ E}_{\text{тир}}/\text{мл}$, а коллагенолитической – $121,31 \text{ E}_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$.

Также изучили влияние начального значения pH среды (в интервале pH от 4 до 8) на образование протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 при глубинном культивировании на ферментационной среде №1. Наиболее подходящим значением pH культивирования для секреции микромицетом *A. ustus* 1 протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков, был pH 7: в нейтральных условиях значения казеинолитической активности достигали $49,68 \text{ E}_{\text{тир}}/\text{мл}$, фибринолитической – $19,3 \text{ E}_{\text{тир}}/\text{мл}$, а коллагенолитической – $127,3 \text{ E}_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$.

При переходе к твердофазному культивированию (ТФК) спектр изучаемых протеолитических активностей по отношению к фибриллярным белкам был расширен – определяли также эластинолитическую активность. С учетом данных, полученных в предыдущих экспериментах, изучение влияния природы носителя в условиях твердофазного культивирования на образование протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 проводили с использованием ферментационной среды № 1, содержащей в своем составе гидролизат рыбной муки (0,5%) и NaNO_3 (0,2%) в качестве источников азота. Данную среду использовали в качестве жидкой фазы в системе ТФК при температуре 28°C и pH 7. Для проведения данного эксперимента (рис. 4) были выбраны четыре инертных носителя и один носитель-субстрат – отруби, влияние которого изучали в двух вариантах – в сочетании либо с водой, либо с ферментационной средой №1 в качестве жидкой фазы. Интересно, что значение казеинолитической ($658,56 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) и фибринолитической ($114,79 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) активности в варианте сочетания отрубей с водой превышало значение для данных типов активности для сочетания отрубей с ферментационной средой №1 в 2,5 и в 1,8 раз, соответственно. Однако, ни коллагенолитической, ни эластинолитической активности не было выявлено ни в одном из вариантов использования отрубей в качестве субстрата.

В системе ТФК, включающей в себя пенополиуретан в качестве инертного носителя, вовсе не было обнаружено активности по отношению к фибриллярным белкам, однако казеинолитическая активность была достаточно высокой и составила $634,78 E_{\text{тир}}/\text{мл}$. При использовании кокосового волокна удалось выявить казеинолитическую ($150,3 E_{\text{тир}}/\text{мл}$), коллагенолитическую ($105,43 E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) и фибринолитическую ($52,26 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) активности образуемых протеиназ, однако эти значения оказались ниже значений, полученных для вермикулита. Именно вермикулит, использованный в качестве носителя, показал себя наиболее подходящим для образования микромицетом *A. ustus* 1 протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков: значения фибринолитической и коллагенолитической активности в данных условиях были максимальными и составили $67,34 E_{\text{тир}}/\text{мл}$ и $130,36 E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$, соответственно. Максимальное же значение эластинолитической активности ($114,32 E_{\text{пНА}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) было показано при использовании силикагеля в качестве носителя в системе ТФК, оно превышает значение данной активности, полученное в системе с вермикулитом, на 7,7 %.

Вероятно, влияние природы инертных носителей на величину значений изученных типов активности обусловлено такими характеристиками, как площадь доступной для мицелия поверхности и диаметр пор инертных частиц. Эти факторы обеспечивают разную степень доступности питательной среды и кислорода, а также разные условия заякоривания

мицелия в субстрат в зависимости от типа носителя, в совокупности оказывая большое влияние на образование мицелия в системе ТФК. Так, например, площадь поверхности вермикулита заметно больше по сравнению с силикагелем, за счет размера и объема пор. Данная особенность может объяснять более высокую продуктивность мицелия в системе ТФК на вермикулите по сравнению с силикагелем, при прочих равных условиях культивирования.

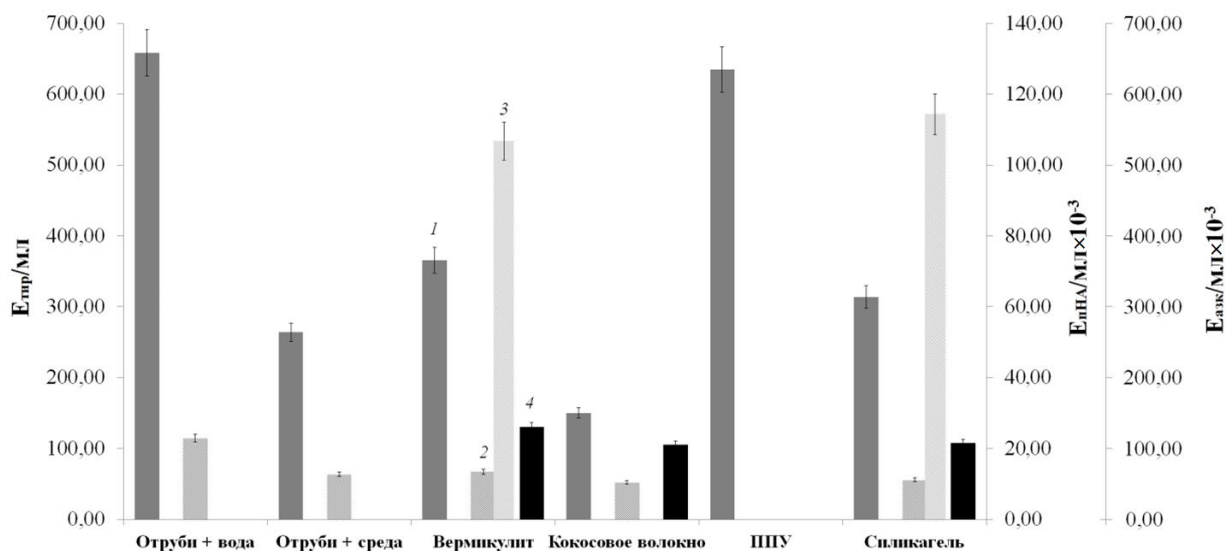


Рис. 4. Влияние природы носителя (субстрата) в условиях твердофазного культивирования на образование протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 на 7 сутки культивирования. 1 – казеинолитическая, 2 – фибринолитическая, 3 – эластинолитическая, 4 – коллагенолитическая активность.

Была изучена динамика накопления протеиназ, образуемых микромицетом *A. ustus* 1, в условиях твердофазного культивирования с использованием вермикулита в качестве носителя. В качестве жидкой фазы использовали ферментационную среду №1. Как можно видеть на рис. 5, максимальное значение казеинолитической активности (1018,9 Е_{тир}/мл) было получено на 3 сутки культивирования, оно превышает значение, полученное в условиях глубинного культивирования на ферментационной среде №1, в 16,3 раза. Максимумы накопления фибринолитических протеиназ наблюдали на 3 и 5 сутки, что в первом случае совпадает по времени с максимумом образования казеинолитических протеиназ, а во втором – с максимумом образования коллагенолитических, значения данной активности составили 237,3 и 254,4 Е_{тир}/мл на 3 и 5 сутки, соответственно. Эти значения оказались выше полученных в условиях глубинного культивирования более, чем в 9 раз (25,82 Е_{тир}/мл). Наибольшее значение коллагенолитической активности (242,7 Е_{азк}/мл × 10⁻³) было выявлено на 5 сутки культивирования. По сравнению с активностью, которую наблюдали в условиях глубинного культивирования, это значение

было выше в 2 раза. Для эластинолитической активности было показано два наибольших значения – $109,27 \text{ Е}_{\text{пНА}} / \text{мл} \times 10^{-3}$ и $271,7 \text{ Е}_{\text{пНА}} / \text{мл} \times 10^{-3}$, достигнутых на 4 и 9 сутки, соответственно.

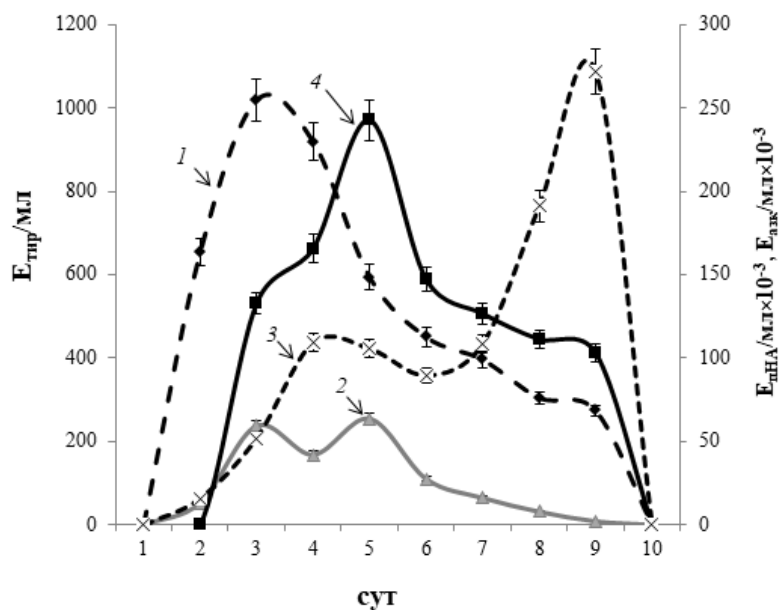


Рис. 5. Динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 в условиях ТФК с вермикулитом в качестве носителя. 1 - казеинолитическая, 2 - фибринолитическая, 3 – эластинолитическая, 4 - коллагенолитическая активность.

Интересно отметить, что максимумы накопления протеиназ, активных в отношении фибриллярных белков, и максимум накопления казеинолитической протеиназы разнесены во времени. Такую особенность можно рассматривать как потенциальное технологическое преимущество для направленного получения ферментов, высокоактивных в отношении фибриллярных белков.

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что наиболее подходящими условиями культивирования микромицета *A. ustus* 1 для образования протеолитических ферментов, высокоактивных в отношении фибриллярных белков, является использование системы твердофазного культивирования с вермикулитом в качестве инертного носителя, и ферментационной средой №1 с pH 7, при температуре 28°C.

Изучение свойств протеиназы *A. ustus* 1

Для дальнейшего изучения высокоактивных в отношении фибриллярных белков протеиназ, образуемых микромицетом *A. ustus* 1, были получены комплексные препараты внеклеточных белков *A. ustus* 1, выращенного в условиях глубинного и твердофазного культивирования. В процессе получения комплексного препарата внеклеточных белков микромицета, выращенного в условиях глубинного культивирования, было утрачено 23,8%

общего белка, однако протеолитическая активность сохранялась. Процент сохранившихся белков после получения комплексного препарата внеклеточных белков *A. ustus* 1, выращенного в условиях твердофазного культивирования, составил 75%. Важно отметить, что удельная общая протеолитическая активность препарата протеиназ, полученного при ТФК, оказалась в 6 раз, а удельная коллагенолитическая активность – в 1,7 раз выше соответствующих типов активности, выявленных для препарата, полученного при глубинном культивировании.

В результате изоэлектрофокусирования (ИЭФ) препарата белков, полученного после глубинного культивирования (рис. 6А), было обнаружено, что наиболее активные фракции сходили с колонки единым пиком и имели рІ 4,5-4,7.

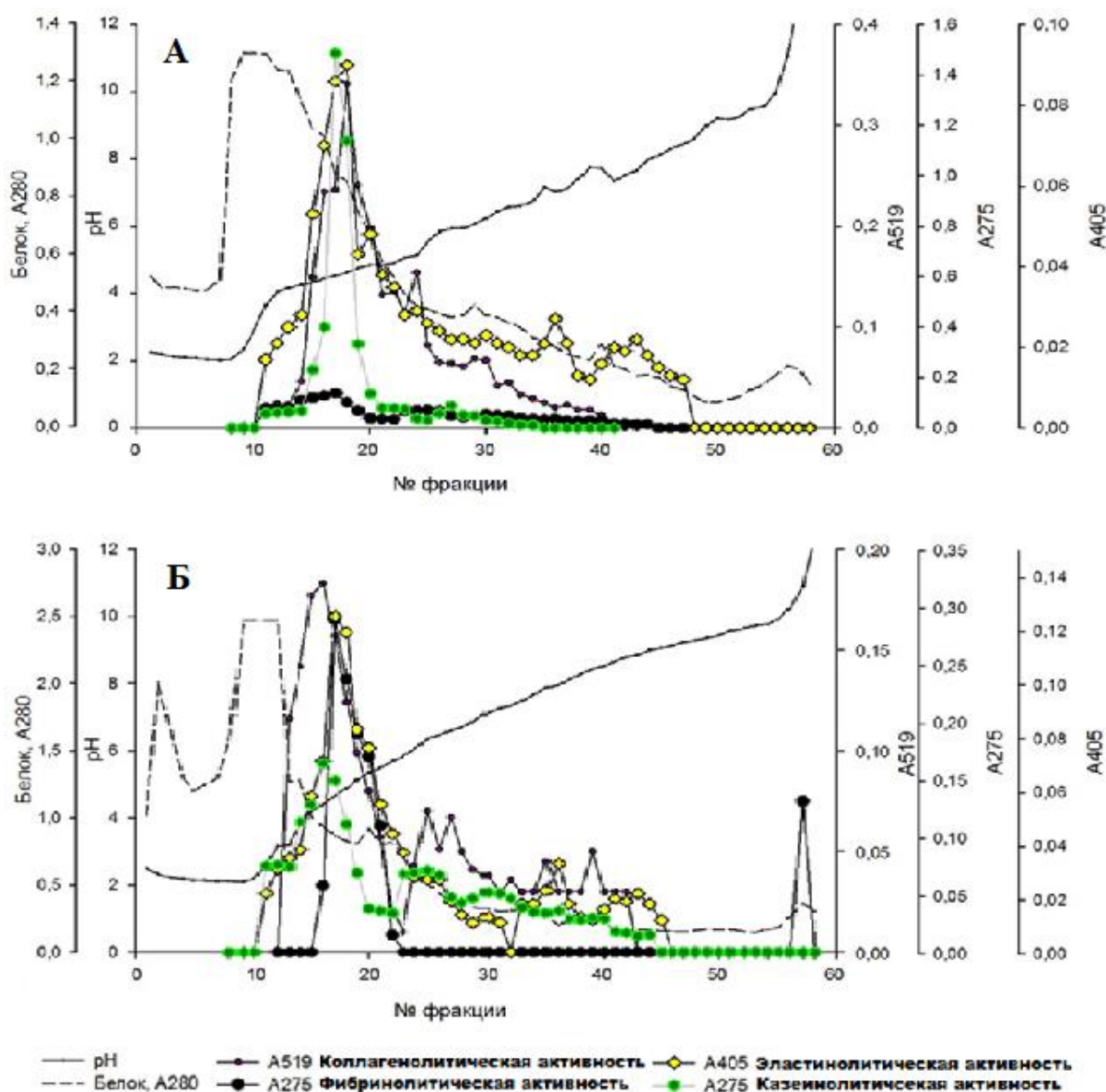


Рис. 6. Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных белков культуральной жидкости *A. ustus* 1, выращенного в условиях: А – глубинного культивирования, Б – твердофазного культивирования.

Аналогичным образом фракции, обладающие максимальными значениями искомых типов активности – фибринолитической, коллагенолитической, казеинолитической и эластинолитической, сходят и при ИЭФ препарата, полученного после ТФК (рис. 6Б), что говорит об образовании микромицетом *A. ustus* 1 протеиназ с соответствующей изоэлектрической точкой (pI 4,5-4,7).

Данные фракции, полученные в результате изоэлектрофокусирования комплексных препаратов белков, образуемых *A. ustus* 1 в условиях глубинного и твердофазного культивирования, были изучены с помощью денатурирующего SDS – электрофореза по Лэммли и нативного электрофореза в ПААГ по Дэвису. SDS – электрофорез показал, что наиболее активная фракция после ИЭФ комплексного препарата, полученного в условиях глубинного культивирования, так же как и в условиях ТФК, содержит один белок с молекулярной массой примерно 33 кДа. В результате нативного электрофореза данные фракции также давали по одной белковой полосе, а выделение белка из геля позволило подтвердить наличие у него казеинолитической, коллагенолитической, фибринолитической и эластинолитической активности.

Таким образом, было установлено, что наиболее активная из образуемых микромицетом *A. ustus* 1 как в условиях глубинного, так и в условиях твердофазного культивирования протеиназ обладает широкой субстратной специфичностью и молекулярной массой 33 кДа. Поскольку pI и молекулярные массы данных протеиназ совпали, а протеиназа, образуемая в условиях ТФК, обладала большими значениями всех целевых типов активности, дальнейшие исследования проводили с активной фракцией после ИЭФ комплексного препарата протеиназ, образуемых *A. ustus* 1 в условиях ТФК, используя значения коллагенолитической активности как наиболее значимой в контексте поставленных задач.

С целью изучения природы активного центра протеиназы, образуемой микромицетом *A. ustus* 1, был проведен ингибиторный анализ с такими общеизвестными ингибиторами протеиназ как ЭДТА, *n*-ХМБ, *o*-фенантролин, PMSF. Было показано, что коллагенолитическая активность изученной протеиназы практически полностью ингибируется PMSF, тогда как остальные ингибиторы никак не влияют на остаточную активность протеиназы. Таким образом, можно сделать вывод, что протеиназа, образуемая микромицетом *A. ustus* 1, принадлежит к группе сериновых протеиназ.

Было изучено влияние температуры реакции в диапазоне от 20 до 55°C на коллагенолитическую активность, проявляемую протеиназой *A. ustus* 1. Температурный оптимум данной протеиназы был выявлен при 41°C. Интересно, что более 80% коллагенолитической активности сохраняется в достаточно широком диапазоне

температур – от 39 до 55°C. Также было показано, что протеиназа сохраняет 100% коллагенолитической активности при выдерживании в течение 2 часов при температуре от 24 до 45°C.

Изучение pH оптимума активности протеназы *A. ustus* 1 показало, что при pH реакционной смеси 6,0 протеиназа проявляет наибольшие значения коллагенолитической активности. Более 75% активности протеиназа сохраняет при pH 5,5 и 6,5. Также была изучена стабильность активности данной протеиназы в диапазоне pH от 4 до 10. Так, фермент сохраняет 100% активности при pH от 5 до 8, теряет 26,6% процентов активности при pH 9, а при pH 4 и 10 активность составляет менее 30% от максимальной.

Для протеиназы *A. ustus* 1 проводили определение гликопротеинов с ШИК – реактивом методом дот-блоттинга. Было показано, что протеиназа, образуемая *A. ustus* 1, не гликозилирована.

Была изучена субстратная специфичность протеиназы, образуемой *A. ustus* 1, с хромогенными пептидными субстратами. Показано, что протеиназа *A. ustus* 1 обладает широкой субстратной специфичностью и проявляет активность по отношению к хромогенным пептидным субстратам протеина C, тромбина, плазмينا, тканевого активатора пламиногена, урокиназы, Ха фактора, трипсина. Наибольшие значения были получены в отношении субстрата тромбина – $29,9 E_{pNA}/мл \times 10^{-3}$. Значения, полученные для хромогенных пептидных субстратов химотрипсина и трипсина, были пренебрежимо низкими (менее $2 E_{pNA}/мл \times 10^{-3}$). Интересно отметить, что наибольшую активность протеиназа проявляет к тем хромогенным субстратам, в составе которых имеются аминокислоты Gly и Arg.

Сравнение коллагенолитической активности протеиназы, образуемой микромицетом *A. ustus* 1, с коллагенолитической активностью коммерческого препарата «Террилитин»

Для сравнения коллагенолитической активности протеиназы, выделенной из комплексного препарата белков, образуемых микромицетом *A. ustus* 1, и протеиназы, образуемой микромицетом *A. terricola*, входящей в состав коммерческого коллагенолитического противоожогового препарата аналогичного действия «Террилитин» (Санкт-Петербургский НИВВС и предприятие по производству бактериальных препаратов ФГУП ФМБА, Россия), был проведен 5-часовой гидролиз нативного бычьего коллагена. Результаты данного эксперимента представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Сравнение коллагенолитической активности протеиназы, образуемой микромицетом *A. ustus* 1, с коллагенолитической активностью некоторых коммерческих препаратов.

Фермент Активность	Протеиназа, образуемая микромицетом <i>A. ustus</i> 1	«Террилитин»	Коммерческая коллагеназа, образуемая <i>Clostridium</i> <i>histolyticum</i> (Sigma- Aldrich, № C2674)
CDU/мг	129,10	88,42	≥125

Как видно из табл. 10 коллагенолитическая активность фермента, образуемого микромицетом *A. ustus* 1, не только в 1,46 раз выше соответствующей активности протеиназы, составляющей действующее вещество препарата «Террилитин», но и сопоставима по активности с коллагеназой *Clostridium histolyticum*, реализуемой компанией «Sigma-Aldrich». Такое высокое значение коллагенолитической активности позволяет рассматривать протеиназу *A. ustus* 1 в качестве основы для разработки более активных и простых в получении ферментных препаратов, способных стать полноценной альтернативой уже имеющимся препаратам аналогичного действия на рынке.

Заключение

По результатам данной работы удалось выявить нового перспективного продуцента протеолитических ферментов, высокоактивных в отношении фибриллярных белков — мицелиальный гриб *A. ustus* 1. Была доказана его способность к образованию протеиназ, обладающих фибринолитической, коллагенолитической и эластинолитической активностью.

Протеолитические ферменты, обладающие искомыми активностями, синтезируются микромицетом *A. ustus* 1 на среде, содержащей в своем составе гидролизат рыбной муки (0,5%) и NaNO_3 (0,2%) в качестве источников азота, при начальном pH среды 7,0 и 28°C, а максимальная их секреция происходит в конце логарифмической фазы роста. Максимальная линейная скорость роста была показана также при температуре 28°C на агаризованной ферментационной среде, содержащей как аминный, так и минеральный источники азота, она была на 29,1% выше, чем на сусло-агаре. Таким образом, установлено, что наличие в среде гидролизатов белков является предпочтительным для роста микромицета.

Наиболее подходящим носителем для твердофазного культивирования микромицета *A. ustus* 1 был признан вермикулит, а значения всех изученных активностей в условиях ТФК с использованием данного носителя превышали соответствующие значения для ГК в несколько раз. Такой результат, вероятно, обусловлен максимально подходящей для роста и развития мицелия плотностью и пористостью данного материала, а также особенностями синтеза внеклеточных ферментов микромицетами в условиях ТФК, в целом. Однако перспективным для дальнейшего изучения кажется также расширение спектра натуральных носителей-субстратов, характерных для локальной аграрной промышленности. Развитие данной тематики в подобном направлении позволит приблизиться к реализации способа оптимального практического применения выделенного активного штамма микромицета в контексте задач, актуальных для утилизации отходов аграрного комплекса Российской Федерации.

В результате разделения комплексных препаратов белков, образуемых микромицетом *A. ustus* 1 в условиях глубинного и твердофазного культивирования, с помощью изоэлектрофокусирования была выделена наиболее активная протеиназа, обладающая фибринолитической, коллагенолитической и эластинолитической активностью с изоэлектрической точкой pI 4,5-4,7. С помощью нативного электрофореза в ПААГ и денатурирующего SDS – электрофореза активных фракций, полученных после ИЭФ, было показано, что наиболее активная протеиназа, образуемая микромицетом *A. ustus* 1 как в условиях глубинного, так и в условиях твердофазного культивирования обладает молекулярной массой ~ 33 кДа. Следует отметить, что были изучены только наиболее активные протеиназы, выявленные в комплексном препарате белков, образуемых данным микромицетом. Менее активные протеиназы, которые можно увидеть на профиле ИЭФ препаратов, также могут представлять интерес для изучения, однако, очевидно, что условия их оптимального образования микромицетом *A. ustus* 1 отличаются. Задача по выделению и изучению таких протеиназ также представляется перспективной.

Были определены pH -оптимум (6,0) и стабильность работы данной протеиназы, она сохраняет 100% активности при pH от 5,0 до 8,0. Определены также температурный оптимум (41°C) и температурная стабильность работы протеиназы, образуемой *A. ustus* 1 (от 24 до 45°C).

В результате ингибиторного анализа установлено, что данная протеиназа *A. ustus* 1 принадлежит к группе сериновых протеолитических ферментов. Показано, что она обладает широкой субстратной специфичностью и не имеет в своем составе углеводного компонента.

По значениям коллагенолитической активности протеиназа, образуемая *A. ustus* 1, показала себя конкурентноспособной по сравнению с известными коммерческими препаратами.

Таким образом, для микромицета *A. ustus* 1 разработан способ получения фибринолитических, коллагенолитических и эластинолитических протеиназ как в условиях глубинного, так и в условиях твердофазного культивирования. Доступность использованных субстратов и компонентов сред, высокие значения всех типов изученной активности выделенной протеиназы, а также ее широкая субстратная специфичность и оптимум активности при нейтральных значениях pH делают микромицет *A. ustus* 1 перспективным продуцентом ферментов, высокоактивных в отношении фибриллярных белков, необходимых для решения задач современной биотехнологии.

Выводы

1. Впервые показана способность микромицета *A. ustus* 1 секретировать протеиназы, обладающие фибринолитической, коллагенолитической и эластинолитической активностью.
2. Оптимальными условиями культивирования микромицета *A. ustus* 1 для образования протеиназ, активных в отношении фибриллярных белков, в глубинных условиях культивирования является использование ферментационной среды №1, содержащей в своем составе гидролизат рыбной муки (0,5%) и NaNO₃ (0,2%), при начальном pH среды 7,0 и 28°C.
3. Оптимальным способом культивирования микромицета *A. ustus* 1, позволившим достичь увеличения значений фибринолитической и коллагенолитической активности протеиназ более чем в 9 и 2 раза, соответственно, является твердофазное культивирование с использованием вермикулита в качестве носителя.
4. Выделен наиболее активный по отношению к фибриллярным белкам фермент, образуемый микромицетом *A. ustus* 1, который является негликозилированной сериновой нейтральной протеиназой с широкой субстратной специфичностью, молекулярной массой ~ 33 кДа и pI 4,5-4,7, с оптимумом активности при 41°C.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Список публикаций в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и RSCI:

1. Осмоловский А. А., Попова Е. А., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. С. Фибринолитическая и коллагенолитическая активность внеклеточных

- протеиназ штаммов микромицетов *Aspergillus ochraceus* l-1 и *Aspergillus ustus* 1 // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2016. № 1. С. 71–75. [Osmolovskiy A. A., Popova E. A., Kreyer V. G., Baranova N. A., Egorov, N. S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* l-1 and *Aspergillus ustus* 1// Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2016. V. 71, №. 1. P. 62–66.] DOI: 10.3103/S0096392516010053. Импакт фактор РИНЦ: 0,792. Импакт фактор SJR: 0,228.
2. **Попова Е. А.**, Бедненко Д. М., Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Котова И. Б., Егоров Н. С. Секреция микромицетами внеклеточных протеиназ, активных по отношению к фибриллярным белкам // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2017. Т. 72, № 4. С. 241–245. [Popova E. A. Bednenko D. M., Osmolovskiy A. A., Kreyer V. G., Kotova I. B., Egorov N. S. Secretion of Extracellular Proteinases Active against Fibrillar Proteins by Micromycetes //Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2017. V. 72. №. 4. P. 206–210.] DOI: 10.3103/S0096392517040101. Импакт фактор РИНЦ: 0,792. Импакт фактор SJR: 0,228.
3. **Попова Е. А.**, Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Котова И.Б., Егоров Н.С. Продукция штаммом *Aspergillus ustus* протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53, № 4. С. 229–235. DOI: 10.1134/S0026364819040111. Импакт фактор РИНЦ: 0,685.

Прочие публикации (статьи в сборниках и тезисы конференций):

1. **Попова Е.А.**, Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Егоров Н.С. Получение препарата коллагенолитической протеиназы, образуемой *Aspergillus ustus* в условиях глубинного и твердофазного культивирования // Успехи медицинской микологии. 2014. Т. 12. С. 333–335.
2. **Попова Е.А.**, Звонарева Е.С., Осмоловский А.А, Крейер В.Г., Егоров Н.С. Образование протеиназ с коллагенолитической и фибринолитической активностью микромицетами *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus* и *Aspergillus ustus* в условиях твердофазного культивирования // Современная микология в России. Национальная академия микологии, Москва. 2015. Т. 5. С. 339–340.
3. **Попова Е. А.**, Осмоловский А.А. Фибринолитическая и коллагенолитическая активность внеклеточных протеиназ микромицетов *Aspergillus ustus* и *Aspergillus ochraceus* // Сборник тезисов X молодежной школы-конференции с международным участием Актуальные аспекты современной микробиологии, Москва. 2015. Т. 10. С. 130-133.

4. **Попова Е. А.**, Осмоловский А. А. Протеиназы микромицетов *Aspergillus ustus* и *Aspergillus ochraceus*, расщепляющие фибриллярные белки // Автотрофные микроорганизмы: 5 Всероссийский симпозиум с международным участием. Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, 21-24 декабря 2015 г.: Материалы. МАКС Пресс Москва. 2015. С. 142.
5. Бедненко Д. М., **Попова Е. А.**, Осмоловский А. А. Биотехнологический потенциал *Aspergillus fumigatus* o-1, *Aspergillus ustus* 1 и *Cladosporium cladosporoides* 1 – продуцентов внеклеточных протеиназ // Современная микология в России / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Воронина, Ю. Т. Дьяков и др. Национальная академия микологии, Москва. 2017. Т. 7. С. 299–300.
6. Osmolovskiy A.A., Zonareva E.S., Orehova A.V, Rukavitsyna E. D., Bednenko D.M., **Popova E.A.** Micromycetes from the genus *Aspergillus* as perspective producers of proteases effecting on human haemostasis proteins // Journal of Biotechnology. 2017. V. 256, №. S. P. S94–S94.
7. Bednenko D.M., Rukavitsyna E. D., **Popova E.A.**, Osmolovskiy A.A. High potential fibrinolytic enzymes produced by micromycetes *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus ustus* // ISCOMS 2017 Book of Abstracts. MCUG, Groningen, Netherlands. 2017. P. 512–512.
8. Бедненко Д. М., **Попова Е. А.**, Осмоловский А. А. Высокоактивные продуценты протеиназ с выраженной активностью к фибриллярным белкам // Материалы IX Международного конгресса Биотехнология: состояние и перспективы развития 20-22 февраля, Москва. 2017. Т. 1. С. 198–200.
9. Rukavitsyna E. D., Bednenko D.M., **Popova E.A.**, Timorshina S.N., Osmolovskiy A.A. Biotechnological potential of highly specific proteolytic enzymes produced by micromycetes of *Aspergillus* genus// New Biotechnology. 2018. №. 44S. P. S115–S115.
10. **Попова Е.А.**, Крейер В.Г., Баранова Н.А., Осмоловский А.А., Котова И. Б. Выделение и изучение свойств протеиназы микромицета *Aspergillus ustus* 1, высокоактивной в отношении фибриллярных белков// Микроорганизмы: Вопросы экологии, физиологии, биотехнологии: Всероссийская конференция с международным участием. Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 23-24 декабря 2019 г.: Материалы. ООО "МАКС Пресс" Москва, 2019. С. 95–95.