

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Попова Елизавета Андреевна

**ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПРОТЕИНАЗЫ *ASPERGILLUS USTUS*,
ВЫСОКОАКТИВНОЙ В ОТНОШЕНИИ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ**

Специальность 03.02.03 – микробиология

Специальность 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.б.н., профессор Котова И.Б.

к.б.н., доцент Осмоловский А.А.

Москва – 2020

Оглавление

Часть 1: ВВЕДЕНИЕ	5
Часть 2: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
Глава 1. Фибриллярные белки: коллаген, фибрин и эластин.....	11
1.1. Коллаген.	11
1.2. Фибриноген и фибрин.	14
1.3. Эластин.	16
Глава 2. Протеолитические ферменты.	18
2.1. Протеолитические ферменты микроорганизмов.....	20
2.2. Коллагенолитические протеиназы	21
2.3. Фибринолитические протеиназы.....	24
2.4. Эластинолитические протеиназы	25
2.5. Протеиназы микромицетов	26
Глава 3. Твердофазное культивирование микромицетов	33
3.1. Принципиальные аспекты процесса твердофазного культивирования.	34
3.2. Модель роста мицелиальных микроорганизмов в условиях твердофазного культивирования	38
3.3. Молекулярно-физиологические особенности роста микромицетов в условиях ТФК	41
3.4. Биохимические особенности продуктов, получаемых в условиях твердофазного культивирования.	42
Часть 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	45
Глава 4. Материалы и методы	45
4.1. Микроорганизмы, использованные в работе.....	45
4.2. Определение энзиматических индексов микромицетов	45
4.3. Определение общей протеолитической активности	45

4.4. Определение коллагенолитической активности	46
4.5. Определение фибринолитической активности.....	47
4.6. Глубинное культивирование.....	47
4.7. Получение комплексного препарата внеклеточных белков.....	48
4.8. Изоэлектрофокусирование.....	49
4.9. Нативный электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	49
4.10. Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	49
4.11. Ингибиторный анализ	49
4.12. Определение активности с хромогенными пептидными субстратами.	50
4.13. Определение углеводного компонента в составе протеиназы	51
4.14. Определение рН-оптимума действия и рН-стабильности протеиназы	52
4.15. Определение температурного оптимума активности и термостабильности протеиназы	52
4.16. Твердофазное культивирование	52
4.17. Обработка результатов	53
Глава 5. Результаты и обсуждение	54
5.1. Выявление способности протеиназ <i>A. ustus</i> 1 к расщеплению фибриллярных белков	54
5.2. Подбор оптимальных условий культивирования микромицета <i>A. ustus</i> 1	59
5.3. Динамика накопления протеолитических ферментов <i>A. ustus</i> 1 с коллагенолитической, фибринолитической и эластинолитической активностью в условиях твердофазного культивирования	76
5.4. Получение и разделение препаратов внеклеточных белков <i>A.ustus</i> 1, полученных в условиях глубинного и твердофазного культивирования.....	79
5.5. Изучение свойств протеиназы <i>A. ustus</i> 1.....	85

5.5.1. Электрофоретический анализ протеиназы <i>A. ustus</i> 1	85
5.5.2 Влияние ингибиторов протеолитических ферментов на активность протеиназы <i>A. ustus</i> 1	87
5.5.3. Изучение физико-химических свойств протеиназы, образуемой микромицетом <i>A. ustus</i> 1	88
5.5.4. Субстратная специфичность протеиназы, образуемой микромицетом <i>A.ustus</i> 1	92
5.5.5. Сравнение коллагенолитической активности протеиназы, образуемой микромицетом <i>A.ustus</i> 1, с коллагенолитической активностью коммерческого препарата «Террилитин»	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ВЫВОДЫ	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	101

Часть 1: ВВЕДЕНИЕ

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 микробиот *A. ustus* 1 показал себя в качестве перспективного продуцента протеолитических ферментов, высокоактивных в отношении фибриллярных белков. Образованная 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. Микробиот *A. ustus* 1 является перспективным продуцентом новых протеиназ, активных по отношению к фибриллярным белкам.
2. Для образования ферментов с искомыми активностями микробиотом *A. ustus* 1 наиболее подходящим является сочетание источников аминного и минерального азота в составе ферментационной среды. Секретция 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.

Степень достоверности результатов.

Достоверность результатов обусловлена воспроизводимостью результатов, применением современных биохимических и микробиологических подходов, а также обработкой полученных данных с помощью статистических методов.

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.

Публикации

По теме работы опубликовано 13 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, включенных в базы Scopus и/или Web of Science, 3 статьи в прочих журналах, и 7 публикаций в материалах конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и выводов, изложенных на 100 страницах, включая 10 таблиц, 35 рисунков и 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.

Часть 2: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Фибриллярные белки: коллаген, фибрин и эластин.

Фибриллярные белки – это белки, обладающие вытянутой нитевидной структурой. Фибриллярные белки животного происхождения можно разделить на внутриклеточные и внеклеточные. Внутриклеточные фибриллярные белки представлены белками цитоскелета, такими как актин, миозин, тубулин, и кератин. К внеклеточным относят эластин, коллаген, фибрин, фибриллин, фибронектин, флагеллин и ламинин. Как внутриклеточные, так и внеклеточные фибриллярные белки выполняют, как правило, структурную функцию (Raaij & Mitraki, 2013). Ввиду особенностей строения, обеспечивающих их свойства, такие как прочность и эластичность, фибриллярные белки представляют интерес для биотехнологии в качестве биоматериалов широкого спектра применения, а также как референсные модели для синтеза искусственных полимеров с похожими свойствами (Machado et al., 2013). В то же время такие структурные особенности фибриллярных белков усложняют процесс их деградации, который является актуальной задачей для медицины и различных отраслей промышленности.

1.1. Коллаген.

Коллаген - фибриллярный белок, являющийся основным компонентом внеклеточного матрикса соединительной ткани (Sweeney et al., 2008). Он считается самым распространенным белком у млекопитающих и составляет более 30% от общего состава белков в организме (Di Lullo et al., 2002, Muller, 2003; Pati et al., 2010). В основном он локализован в связках, коже и сухожилиях, также представлен в роговице, кровеносных сосудах, костях, хрящах, межпозвоночных дисках и кишечнике. В организме млекопитающих коллаген синтезируется в фибробластах и фиброцитах, также синтез коллагена в небольших количествах происходит в клетках гладкой мускулатуры (Shoulders & Raines., 2009, Gordon & Hahn., 2010).

В 1955 году Рамачандран и Карта (Ramachandran & Kartha, 1955) на основании дифракционной картины волокон сухожилия, выделенного из хвоста кенгуру, впервые показали трехмерную структуру коллагена (модель Мадраса). Позже, в том же году, Рич и Крик (Rich & Crick, 1955) определили такую же тройную спиральную структуру с более строгими стереохимическими критериями. Обе модели утверждают, что конформация суперспирали образована тремя полипептидными цепями. Тройная спираль - уникальная третичная структура, являющаяся наиболее характерной чертой молекулы коллагена, образована тремя идентичными или неидентичными полипептидными цепями. Каждая цепь состоит из около 1000 аминокислот (иногда более в некоторых типах коллагена), три таких левозакрученных α -цепи составляют протяженную правозакрученную спираль, называемую тропоколлагеном. Тесная упаковка α -цепей в тропоколлагене требует, чтобы каждая третья аминокислота представляла собой глицин, что приводит к повторяющейся последовательности XaaYaaGly, где Xaa и Yaa могут быть любой аминокислотой (Shoulders & Raines., 2009). Такая структура (рис. 1) характерна для всех типов коллагена, хотя она может быть нарушена в определенных местах внутри тройной спирали нефибриллярных коллагенов (Brazel et al. 1987). Аминокислоты в положениях Xaa и Yaa часто представляют собой пролин (Pro, 28%) и 4-гидроксипролин (Hyp, 38%) соответственно. ProHypGly является наиболее распространенным триплетом (10,5%) в коллагене (Ramshaw et al, 1998).

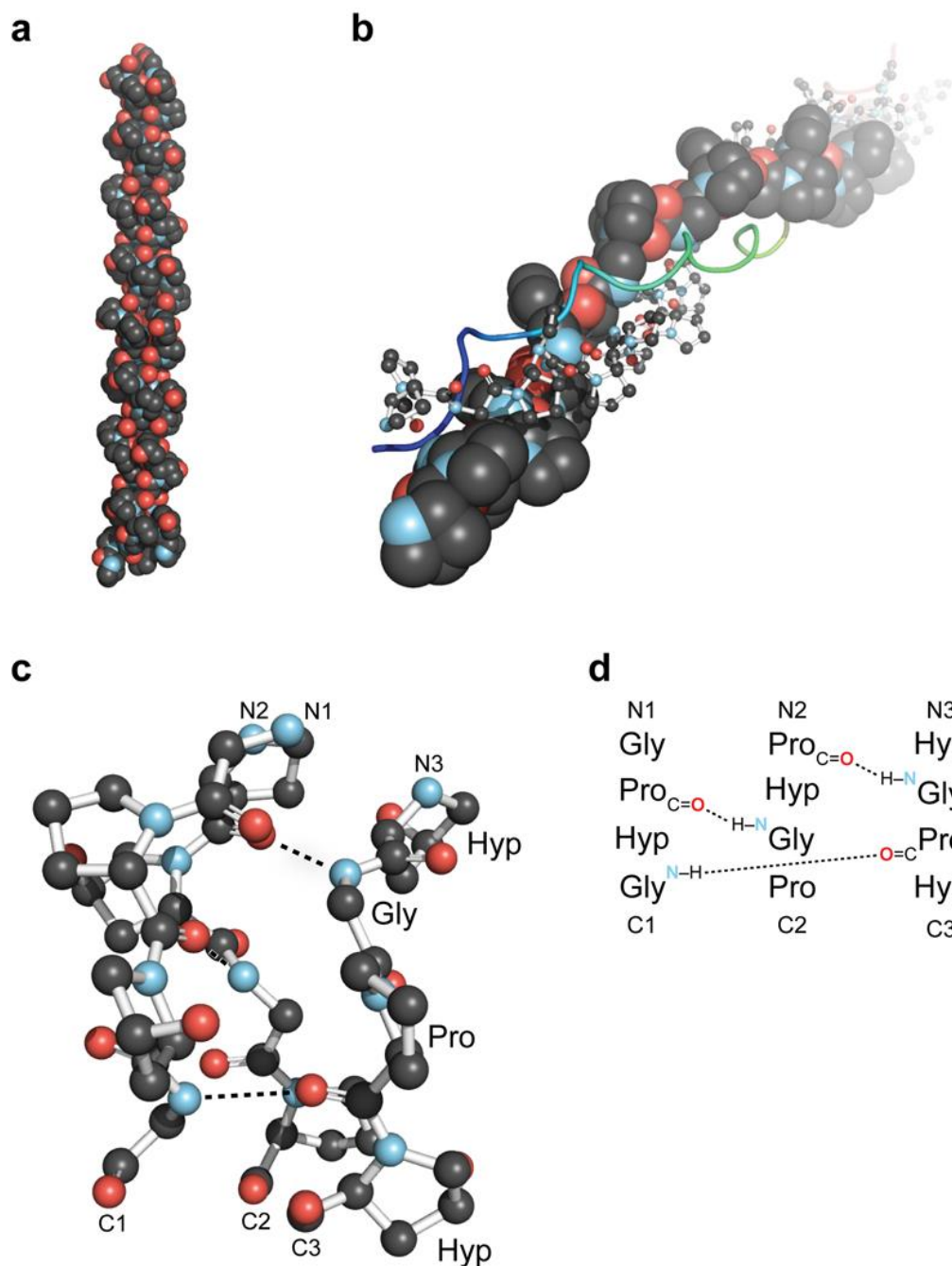


Рис. 1. Структура коллагена. (а) первая кристаллическая структура тропоколлагена с высоким разрешением [Protein Data Bank (PDB), запись 1cag (Bella et al., 1994)] (b) вид снизу по оси тройной спирали (ProProGly) [PDB, запись 1k6f (Berisio et al., 2002)] с тремя α -цепями, представленными в трех типах пространственных моделей: шариковая, шарнирная и ленточная. (с) шарнирная (шаростержневая) модель тройной спирали коллагена [PDB, запись 1cag (Bella et al., 1994)] (d) водородные связи между аминокислотами тропоколлагена (Shoulders & Raines, 2009).

На данный момент известно 29 типов коллагена (Shekhter et al., 2019). Для обозначения каждого вида коллагена пользуются определённой формулой, в которой тип коллагена записывается римской цифрой в скобках, а для обозначения α -цепей используют арабские цифры (Северин, 2003).

Уникальная структура коллагена обеспечивает данную молекулу удивительной прочностью, что существенно усложняет процесс ее гидролиза протеолитическими ферментами (Suzuki et al., 2006).

1.2. Фибриноген и фибрин.

Фибриноген (рис. 2) был впервые классифицирован как фибриллярный белок в одно время с кератином, миозином и эпидермином, на основании его рентгенограммы (Bailey et al., 1943). Это гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа, обычно присутствующий в плазме крови человека в концентрации около 1,5–4 г/л, который является одним из ключевых факторов гемостаза. Фибриноген - растворимая макромолекула, образующая нерастворимый сгусток/гель при превращении в фибрин под действием сериновой протеиназы тромбина, активированной каскадом ферментативных реакций, запускаемых повреждением стенки сосуда. Механически стабильный сгусток необходим для предотвращения потери крови и для инициации процесса заживления ран. Сгустки фибрина растворяются ферментами фибринолитической системы.

Превращение фибриногена в фибрин происходит в два основных этапа: ферментативный и неферментативный. На ферментативной стадии происходит катализируемое тромбином расщепление фибринопептидов фибриногена с образованием мономера фибрина. На неферментативной стадии мономерный фибрин самопроизвольно собирается в олигомеры фибрина, которые удлиняются, образуя двухцепочечные протофибриллы. Протофибриллы агрегируют как в поперечном, так и в продольном направлении, образуя волокна, которые разветвляются, образуя

трехмерную гелеобразную сеть, называемую сгустком. Наконец, фибриновый полимер стабилизируется посредством ковалентного сшивания плазменной трансклутаминазой - фактором XIIIa, с образованием механически и химически более стабильного сгустка зрелого фибрина.

В структуре фибриногена (рис. 2) присутствуют три глобулярных структуры: β - и γ -узелки по концам молекулы и маленькая глобула в середине - центральный узелок. Центральная и периферические глобулы соединены двумя суперспиральными коннекторами, каждый из которых образован тремя α -спиралями, скрученными наподобие каната (Weisel & Litvinov, 2013). Таким образом, фибриноген представляет из себя белок вытянутой формы примерно 45 нм в длину и 3-6 нм в поперечнике.

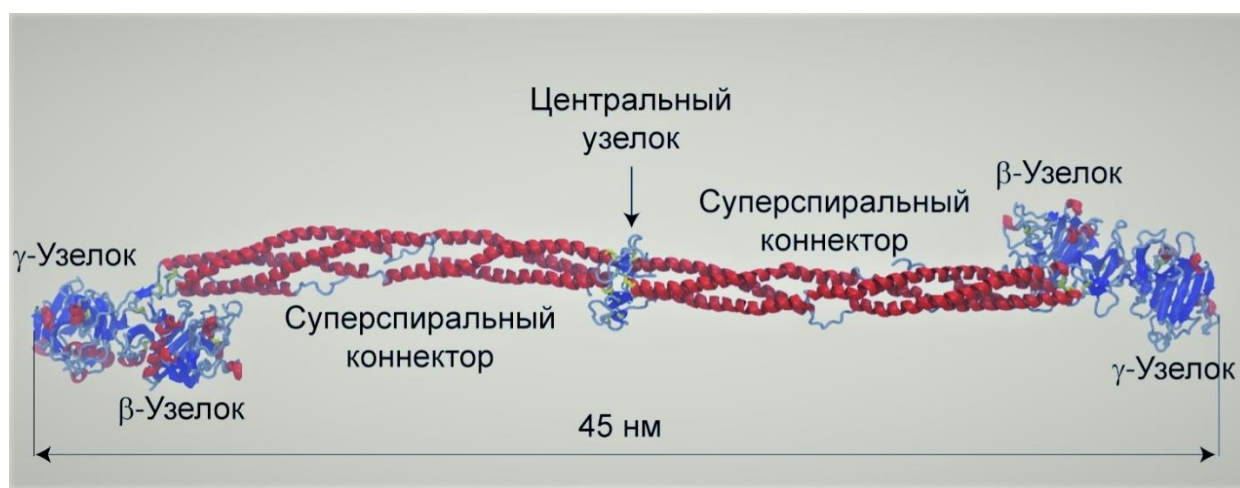


Рис. 2. Молекула фибриногена (Weisel & Litvinov, 2013)

Спонтанная полимеризация фибрина происходит за счет взаимодействий между участками, называемыми «выступы» и «впадины» (рис. 3). Таких участков на каждой молекуле фибриногена находится по 4 пары, а выступ А комплементарен впадине а. (Weisel & Litvinov, 2017).

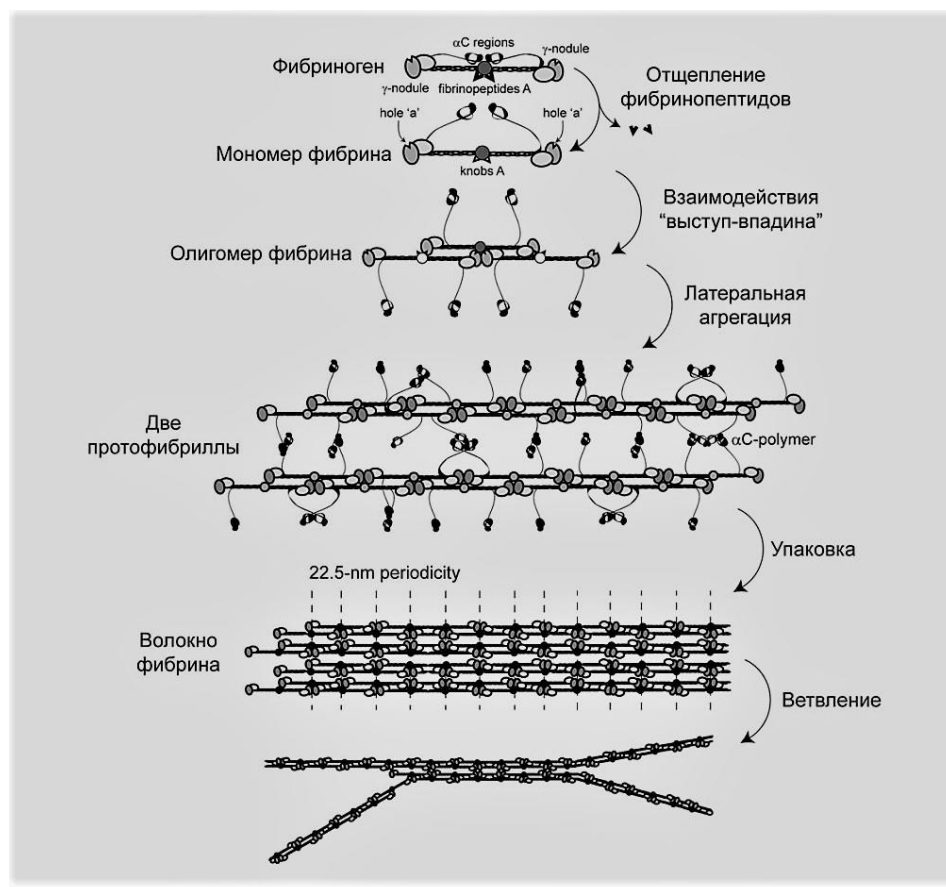


Рис. 3. Схема полимеризации фибрина (Weisel & Litvinov, 2017).

1.3. Эластин.

Эластин – фибриллярный структурный белок, за счет которого обеспечивается эластичность кожи, легких, магистральных артерий и других тканей позвоночных животных. Сети из эластичных волокон образуются во внеклеточном матриксе соединительной ткани из мономерного предшественника - тропоэластина. Эластичные волокна подвержены минимальным изменениям в течение всей жизни и очень долговечны в условиях повторяющихся механических нагрузок (Shapiro et al., 1991; Davis, 1993). Например, эластичные волокна в артериальной стенке позволяют ткани проходить более двух миллиардов циклов растяжения и расслабления с минимальными механическими повреждениями.

Удивительная долговечность и функциональная упругость эластиновых волокон обусловлены внутренними особенностями мономера. Тропоэластин

является модульным белком с молекулярной массой 60 кДа, состоящим из чередующихся гидрофобных и сшивающих доменов (Muiznieks et al., 2010). Самосборка эластиновых мономеров в нерастворимые волокна включает два этапа - самоассоциацию мономеров через гидрофобные домены в процессе, известном как коацервация (Vrhovski et al., 1997; Cirulis et al. 2008), и сшивание остатков лизина (Kagan & Sullivan 1982; Liu et al., 2004; Noblesse et al. 2004). Эластичность тропозластина обусловлена деформацией поперечных связей между молекулами за счет формирования аминокислоты десмозина из 4 молекул лизина (рис. 4), которая создает взаимосвязанную сеть фибрилл. Десмозиновые поперечные связи катализируются лизилоксидазой, тем же ферментом, который образует поперечные связи в коллагене.

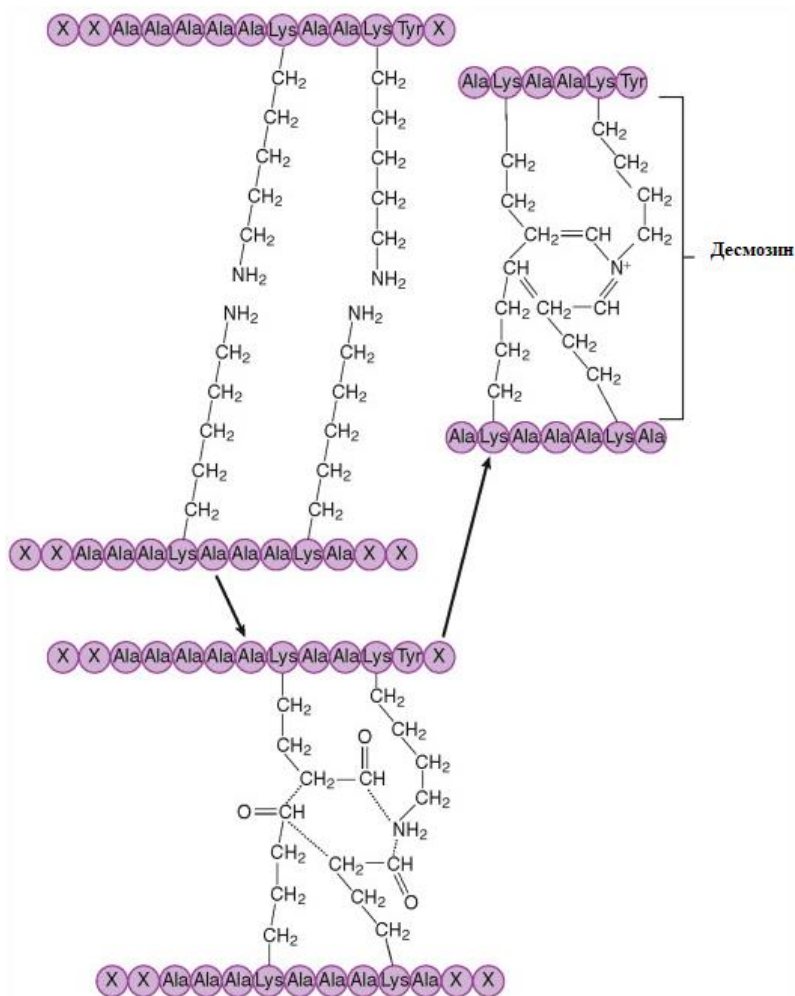


Рис. 4. Структура тропозластина и десмозина (Pelley, 2011).

Глава 2. Протеолитические ферменты.

Протеолитические ферменты – это ферменты, расщепляющие пептидную связь в молекулах белков и пептидов. Они интересуют ученых на протяжении более 100 лет, с тех пор как впервые была опубликована работа П. Левена, посвященная протеиназам в первом выпуске «*Journal of Biological Chemistry*» от 1 октября 1905 г. (Levene, 1905). В силу своей широкой распространенности и большого спектра функций, протеолитические ферменты и в настоящее время остаются актуальной темой для изучения как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Протеиназы, вероятно, возникли на самых ранних этапах эволюции белка в виде простых ферментов, необходимых для катаболизма белка и генерации аминокислот в примитивных организмах. В течение многих лет исследования протеиназ были сосредоточены на их первоначальной роли, связанной с деградацией белковых субстратов. Однако на этом их функции в метаболизме живых организмов не ограничиваются: протеиназы регулируют локализацию и активность многих белков, оказывают влияние на межбелковые взаимодействия и создают новые биоактивные молекулы. Известно, что протеиназы влияют на репликацию и транскрипцию ДНК, пролиферацию и дифференцировку клеток, морфогенез тканей, ангиогенез, нейрогенез, овуляцию, оплодотворение, заживление ран, мобилизацию стволовых клеток, гемостаз, воспаление, иммунитет, аутофагию, старение, некроз и апоптоз. Учитывая все вышеописанные процессы, в которые так или иначе вовлечены протеиназы, самые незначительные изменения в функционировании протеолитических систем часто оказываются причиной множества патологических состояний, таких как рак, нейродегенеративные нарушения, воспалительные и сердечно-сосудистые заболевания. В связи с этим, многие протеиназы интересны фармацевтической промышленности как потенциальные лекарственные мишени или как диагностические и прогностические биомаркеры (Turk, 2006). Также, многие

патогенные микроорганизмы нуждаются в протеиназах для репликации или используют протеиназы в качестве факторов вирулентности, что облегчает разработку целенаправленной протеиназной терапии заболеваний, таких как СПИД (Turk, 2006). Наконец, протеиназы являются важными инструментами биотехнологической промышленности из-за возможности их использования в качестве биохимических реагентов или для производства многочисленных продуктов (Saeki et al., 2007).

Протеолитические ферменты относятся к классу гидролаз, и первоначально были классифицированы на эндопептидазы, которые нацелены на внутренние пептидные связи, и экзопептидазы (аминопептидазы и карбоксипептидазы), действие которых направлено на $-NH_2$ - и $-COOH$ концы их соответствующих субстратов (Beunon & Bond, 2001). Однако появление структурной информации об этих ферментах обуславливало новые схемы классификации. Так, на основании механизма катализа, протеиназы можно разделить на шесть различных классов: аспарагиновые, глутаминовые и металлопротеиназы, цистеиновые, сериновые и треониновые протеиназы. Первые три класса используют активированную молекулу воды в качестве нуклеофила для атаки пептидной связи субстрата (рис. 5), тогда как в остальных ферментах нуклеофил представляет собой аминокислотный остаток (Cys, Ser или Thr, соответственно), расположенный в активном центре (рис. 6), исходя из строения которого, и были сформированы наименования классов (Beunon & Bond, 2001). Протеиназы разных классов могут быть далее сгруппированы в семейства на основе сравнения аминокислотных последовательностей, и семейства могут быть собраны в кланы на основе сходства их трехмерных структур.

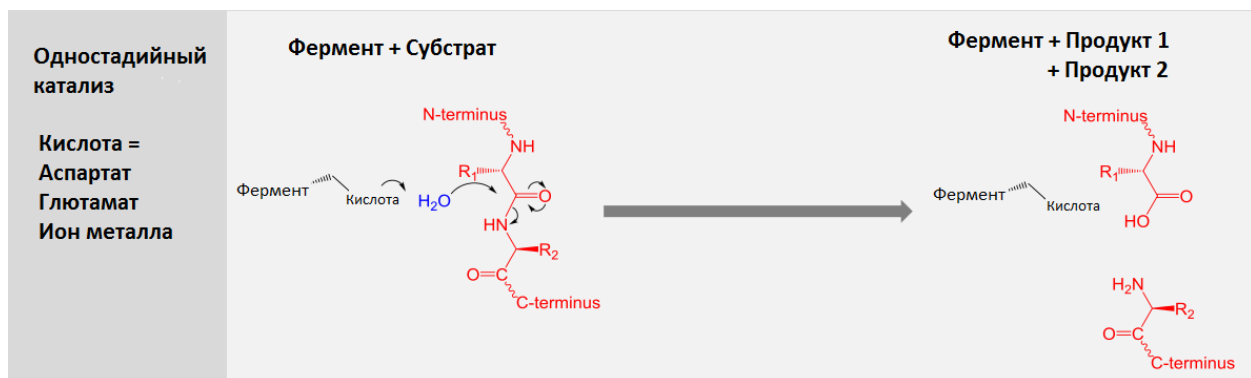


Рис. 5. Схема действия аспарагиновых, глутаминовых и металлопротеиназ (Shafee, 2014).

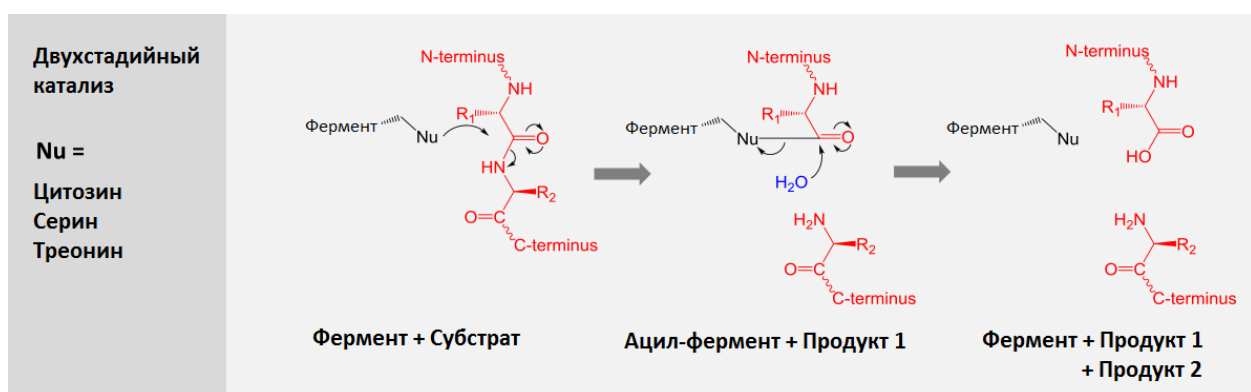


Рис. 6. Схема действия цистеиновых, сериновых и треониновых протеиназ (Shafee, 2014).

2.1. Протеолитические ферменты микроорганизмов

Протеиназы успешно выделяют из разных микробных источников. С помощью микроорганизмов получают две трети коммерческих протеиназ по всему миру (Beg & Gupta, 2003). Благодаря высокому выходу, скорости образования продукта и экономической эффективности протеолитические ферменты микробного происхождения более востребованы по сравнению с протеиназами растений и животных (Palsaniya et al., 2012; Sathishkumar et al., 2015) и на данный момент, являются одними из самых широко используемых ферментов в промышленности (Rao et al., 1998; Sandhya et al., 2005; Younes & Rinaudo, 2015).

Как биотехнологический продукт, протеиназы разделяют по оптимуму pH работы на кислые, нейтральные и щелочные. Кислые протеиназы имеют оптимум от 2 до 5, выделяют два вида таких протеиназ: пепсин-подобные (продуценты – грибы рода *Aspergillus*) и реннин-подобные (продуценты – некоторые виды грибов рода *Mucor*). Оптимум pH работы нейтральных протеиназ - от 6,8 до 7,2, они широко распространены. Щелочные протеиназы имеют оптимум pH от 8 до 11. Основной продуцент – бактерии рода *Bacillus* и микромицеты рода *Aspergillus* (Razzaq et al., 2019).

2.2. Коллагенолитические протеиназы

Коллагеназы микробного происхождения представлены, в основном, сериновыми и металлопротеиназами. Коллагенолитические металлопротеиназы работают при нейтральных значениях pH и способны гидролизовать как нативную, так и растворимую формы коллагена по X-Gly связи в последовательности Gly-Pro-X-Gly-Pro-X, так что глицин всегда остается концевой аминокислотой (Adhikari et al. 2012; Baehaki et al. 2012; Pal & Suresh, 2016). Таким образом, в гидролизате присутствуют пептиды, состоящие из трех-шести аминокислотных остатков. Полярные участки молекулы коллагена при этом не затрагиваются (Демина и Лысенко, 1996).

Первой и наиболее изученной на данный момент коллагенолитической металлопротеиназой является коллагеназа, секретируемая *Clostridium histolyticum*. Многие из того, что в настоящее время известно о характеристиках клостридиальной коллагеназы, получено в результате новаторских исследований, проведенных в 1950-х годах Мандлом, Сейфтером, Харпером и их сотрудниками (Mandl et al., 1953, Mandl et al., 1958, Seifter et al., 1959). Клостридиальные коллагеназы делятся на два типа (I и II), причем тип I кодируется геном *colG*, а тип II - *colH*. Геном бактерии *C. histolyticum* содержит оба гена, коллагеназа ColG секретируется в виде белка из 1000 аминокислот, а ColH секретируется в виде белка из 981 аминокислоты

(Yoshida & Noda, 1965; Bond & Van Wart, 1984; Matsushita et al., 1999), оба фермента содержат консервативный цинк-связывающий мотив (HEYTH), который функционирует в качестве каталитического домена (Eckhard et al., 2009). Также известны другие коллагеназы, образуемые бактериями рода *Clostridium*, например: ColA, выделенная из *C. perfringens* (Matsushita et al., 1994) и ColT, секретируемая *C. tetani* (Brüggemann et al., 2003). В настоящее время именно представители рода *Clostridium*, в основном, используются для промышленного производства коллагеназ, однако патогенность данных анаэробных микроорганизмов ограничивает применение образуемых ими ферментов, что делает поиск альтернативных продуцентов коллагеназ по-прежнему актуальной задачей (Bhagwat & Dandge, 2018). Помимо клостридий, коллагенолитические металлопротеиназы, содержащие ионы цинка в активном центре, образуют также бактерии рода *Vibrio*, например *V. alginolyticus* (Shinoda et al., 2011). Вышеописанные металлопротеиназы относятся к семейству M9 в соответствии с базой данных MEROPS (Rawlings et al., 2010).

Другая широкая группа коллагенолитических ферментов относится к сериновым протеиназам из семейств S1, S8 и S53. Такие коллагеназы характеризуются низкой молекулярной массой и так же, как и металлопротеиназы, способны к расщеплению нативного и денатурированного коллагена. Протеиназы семейства S1 имеют His-Asp-Ser в качестве каталитического домена, тогда как семейство S8 характеризуется каталитической триадой Asp-His-Ser (Rawlings & Barrett, 1994), а члены семейства S53 имеют уникальную каталитическую триаду – Glu-Asp-Ser (Tsuruoka et al., 2003).

Коллагенолитические протеиназы семейства S1 образуют стрептомицеты, например *S. otiyaensis* (SOT) и *S. griseus* (SGT) (Uesugi et al., 2008). SOT и SGT имеют сходные оптимальные значения pH и температуры, а также спектры субстратной специфичности. Как SOT, так и SGT гидролизуют

коллаген I типа, проявляя при этом гораздо более высокую активность, чем коммерческая коллагеназа, образуемая *C.histolyticum* (ColG). Однако, в отличие от SGT, SOT также обладает высокой активностью по отношению к коллагену IV типа (Uesugi et al., 2008).

Термостабильная протеиназа из *Geobacillus collagenovorans* MO-1 была первой из зарегистрированных коллагенолитических протеиназ семейства S8. Этот фермент имеет С-концевой коллаген-связывающий домен, а его сайты расщепления на молекуле коллагена разнообразны, но специфичны (Itoi et al., 2006). В 2014 году, субтилизин-подобная протеиназа мироиколзин, выделенная из глубоководной бактерии *Myroides profundus* D25, была также охарактеризована как коллагенолитическая протеаза (Ran et al., 2014).

Протеиназы семейства S53 или семейства седолизинов были обнаружены у самых разных организмов (Wlodawer et al., 2003). Эти ферменты обычно проявляют максимальную активность при низких значениях pH и высокой температуре. Для некоторых представителей данного семейства известна кристаллическая структура, она напоминает структуру субтилизина, однако ферменты семейства S53 имеют уникальную каталитическую триаду Glu-Asp-Ser (Tsuruoka et al., 2003). Единственной известной коллагеназой в семействе седолизинов является кумамолизин-As, образуемый термоацидофильной почвенной бактерией *Alicyclobacillus sendaiensis* (Tsuruoka et al., 2003).

Микробные коллагеназы имеют широкое промышленное применение, их используют для удаления некротической ткани при терапии ожогов и ран (Erdeve et al., 2007), для лечения радикулита в грыжах межпозвонковых дисков (Chu, 1987), для получения интактных клеток млекопитающих (Kim et al., 2007), в комплексной терапии случаев задержки отделения плаценты из полости матки (Eiler & Hopkins, 1993), в доклинических терапевтических исследованиях различных типов деструктивного фиброза, таких как цирроз

печени (Jin et al. 2005), для лечения контрактуры Дюпюитрена (Chen et al., 2011) и болезни Пейрони (Jordan, 2008). Коллагеназам также находят применение в различных других областях, таких как легкая промышленность (мягчение кож и обработка шкур), и пищевая промышленность (переработка рыбы, пивоварение, осветление и стабилизация пива и обработка мяса) (Bhagwat & Dandge, 2016; Pal & Suresh, 2016).

2.3. Фибринолитические протеиназы

Фибринолитические протеиназы можно разделить на два типа по механизму действия. Протеиназы первого типа действуют на фибрин опосредованно путем активации плазминогена в плазмин, который, в свою очередь расщепляет молекулу фибрина. К ним относятся такие ферменты как активатор плазминогена тканевого типа (t-PA) (Collen & Lijnen, 2004), стрептокиназа и урокиназа (Duffy, 2002). Второй тип представлен плазмин-подобными фибринолитическими ферментами, которые непосредственно разлагают фибрин, тем самым быстро и полностью растворяя тромбы.

Микроорганизмы способны к синтезу обоих типов фибринолитических протеиназ, которые представлены сериновыми и металлопротеиназами. Как правило, фибринолитические металлопротеиназы, образуемые микроорганизмами, обладают более узкой по сравнению с сериновыми протеиназами субстратной специфичностью. Наиболее известными фибринолитическими протеиназами микробного происхождения являются стрептокиназа, выделенная из *Streptococcus hemolyticus*, и стафилокиназа из *Streptococcus aureus*, данные ферменты зарекомендовали себя эффективными при тромболитической терапии (Collen & Lijnen, 1994). Также фибринолитические ферменты получают из бактерий рода *Bacillus*, например, субтилизины из различных штаммов *Bacillus subtilis* (Wang et al., 2008; Agrebi et al., 2009), наттокиназа, образуемая *Bacillus natto*, субтилизин DFE и субтилизин DJ-4, образуемые *Bacillus amyloliquefaciens* (Kim & Choi, 2000;

Peng & Zhang, 2002). Недавно были обнаружены новые высокоэффективные фибринолитические протеиназы, образуемые штаммом *Bacillus subtilis* DC27, отобранным из “*douchi*”, традиционной китайской ферментированной соевой пищи (Hu et al., 2019), а также штаммом *Bacillus subtilis* WR350 (Wu et al., 2019).

Мицелиальные грибы также показали себя перспективными продуцентами протеиназ, обладающих высокой фибринолитической активностью, среди них такие, как *Aspergillus ochraceus* 513 (Батомункева и Егоров, 2001), *Fusarium oxysporum* (Tao et al., 1998), *Penicillium chrysogenum* (El-Aassar et al., 1990), *Rhizopus chinensis* 12 (Xiao-Lan et al., 2005), *Aspergillus terreus* 2 (Звонарева и др., 2018), *Aspergillus flavipes* A17, *Aspergillus fumigatus* D1, *Aspergillus sydowii* 1 (Осмоловский и др., 2017) и т.д.

2.4. Эластинолитические протеиназы

Эластазы – протеиназы, которые характеризуются способностью гидролизовать эластин. Впервые эластаза была выделена из поджелудочной железы в 1950 году учеными Бало и Банга (Balo & Banga, 1950), а впоследствии обнаружена и у микроорганизмов, причем, как у бактерий *Pseudomonas aeruginosa* (Moriyama & Tsuzuki, 1977), так и у микровицетов *Aspergillus fumigatus* (Frosco et al., 1992). Показано, что многие микроорганизмы выделяют эластазу, однако она либо обладает низкой активностью, либо образована потенциально опасными патогенными штаммами, что снижает ее медицинскую или промышленную ценность (Ozaki & Shiio, 1975; Clark et al., 2000; Janda & Abbott, 1999). Образование эластаз рассматривают как один из факторов вирулентности патогенных микроорганизмов, необходимый им для проникновения и гидролиза тканей организма - хозяина (Wilson et al., 2011). Одними из наиболее изученных являются эластазы LasA и LasB *Pseudomonas aeruginosa*. Эластаза A (LasA) представляет собой металлопротеиназу с молекулярной массой

приблизительно 22 кДа, относящуюся к семейству Zn-металлопротеиназ. LasA обладает высокой эластинолитической активностью, гидролизует Gly-Gly пептидные связи (Peters & Galloway, 1990; Toder et al., 1991; Kessler et al., 1997). Эластаза В является металлопротеиназой с молекулярной массой 33-кДа, принадлежащей к семейству термолизинов (пептидаза М4) (Moriyama et al., 1965). Эластаза В участвует в патогенезе, деградируя иммунные клетки человека. Доказано, что LasB разрушает компоненты системы комплемента (Schultz & Miller, 1974), цитокины (Parmely et al., 1990), иммуноглобулины IgA и IgG (Buret & Cripps, 1993; Maeda & Yamamoto, 1996), лизоцим дыхательных путей человека (Jacquot et al., 1985), активируемые протеиназой рецепторы (Dulon et al., 2005) и сурфактантные белки А и D (Mariencheck et al., 2003).

Для мицелиальных грибов эластазы также рассматривают как фактор вирулентности, так как наиболее частые микозы, как правило, ассоциированы с поражением легочных тканей, которые, в основном, состоят из субстрата эластазы – эластина (Starcher, 2000). Высокоактивную эластазу образует микромицет *Aspergillus fumigatus*, один из наиболее часто встречающихся возбудителей микомикозов легких (Zohri et al., 2017; Asano et al., 2018).

С другой стороны, эластаза - востребованный биотехнологический продукт, она широко применяется для лечения гиперлипидемии и атеросклероза (Saulnier et al., 1989), для производства растворимого эластина, который можно использовать в косметике (Robert et al., 1998), и в качестве смягчителя мяса в пищевой промышленности (Mehta & Sehgal, 2019; Xu et al., 2005). Таким образом, поиск новых непатогенных продуцентов таких ферментов представляется актуальным.

2.5. Протеиназы микромицетов

Среди микроорганизмов – продуцентов протеолитических ферментов можно выделить микромицеты, как одну из наиболее биотехнологически

интересных групп. Известно, что комплекс секретируемых ими протеиназ состоит из 5-12 различных ферментов, обладающих широкой субстратной специфичностью, что выгодно отличает микромицетов от бактерий, для которых характерен синтез небольшого числа (1-3) индивидуальных протеиназ (Ландау и др., 1998). Данная особенность позволяет микромицетам эффективно использовать разнообразные белковые субстраты, встречающиеся в почве (Павлюкова и др., 1998).

На данный момент, среди микромицетов обнаружено множество продуцентов протеолитических ферментов, обладающих различными свойствами (табл. 1).

Таблица 1.

Характеристики некоторых протеиназ, образуемых микромицетами (Martínez-Medina et al., 2019).

Микро- организм	Способ культиви- рования	Субстрат для культиви- рования	Время культи- вирования, ч.	Активность протеиназы	Оптимум		Стабильность		Источники литературы
					pH	T (°C)	pH	T (°C)	
<i>Aspergillus oryzae</i>	ГК	Смесь пшеничных отрубей и соевого шрота	80	≈18 Е/л	НД	НД	НД	НД	Wang et al., 2005a
<i>Aspergillus oryzae</i>	ГК	Пшеничные отруби	72	8,7 Е/г	НД	НД	НД	НД	Sandhya et al., 2005
<i>Aspergillus oryzae</i>	ГК	Обезжиренная соя, лактоза и казеин	72	14,100 Е/мл	8–9	45	НД	НД	Samarntarn et al., 1999
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ГК	2% пудра из панцирей креветок и лобстеров	144	1 Е/мл	8	40	6-10	50	Wang et al., 2005b
<i>Aspergillus tamaraii</i>	ГК	1% соевая мука	144	160 Е/мл	≈7,5	45	6–9.5	30–50	Boer & Peralta, 2000
<i>Aspergillus flavus</i>	ГК	НД	НД	НД	8	45	5–9	35–60	Hossain et al., 2006
<i>Aspergillus niger</i>	ГК	Рисовый дистиллят и 4% соевое масло	192	200 Е/мл	НД	НД	НД	НД	Yang and Lin, 1998

<i>Aspergillus brasiliensis</i> AUMC 9735	ГК	2 % соевая мука	144	190 Е/мл	8	30	6-11	30-55	Kotb at al., 2015
<i>Penicillium sp.</i> LPB-5	ТФК	Обезжиренная соя	48	НД	6,5	45	6–9	35–45	Germano et al., 2003
<i>Aspergillus niger</i>	ТФК	Пшеничные отруби	42	5,27 Е/мл	НД	НД	НД	НД	Couri et al., 2000
<i>Aspergillus niger</i>	ТФК	Пшеничные отруби	36	74,3 Е/г	НД	НД	НД	НД	Villegas et al., 1993
<i>Rhizopus oryzae</i>	ТФК	Пшеничные отруби	144	341 Е/г	НД	НД	НД	НД	Tunga et al., 1998
<i>Rhizopus oligosporus</i>	ТФК	Рисовые отруби	72	$3,9 \times 10^5$ Е/г	НД	НД	НД	НД	Ikasari & Mitchell, 1994
<i>Mucor bacilliformis</i>	ТФК	Пшеничные отруби	72–96	700 Е/г	НД	НД	НД	НД	Fernández-Lahore et al., 1998
<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus sojae</i>	ТФК	Люпин и соя	144	1500 Е/г, 1800 Е/г, 1900 Е/г, 1700 Е/г	НД	НД	НД	НД	Sardjono et al., 1998
<i>Aspergillus oryzae</i>	ТФК	Пшеничные отруби	72	31,2 Е/г	НД	НД	НД	НД	Sandhya et al., 2005
<i>Aspergillus oryzae</i>	ТФК	Рисовая шелуха и рисовые отруби (7: 3)	72–96	1946 Е/г	НД	НД	НД	НД	Battaglino et al., 1991
<i>Aspergillus flavus</i>	ТФК	Пшеничные отруби	48	6,54 Е/мл	7,5	НД	3–8	НД	Malathi & Chakraborty, 1991

Примечание: НД – нет данных, ГК – глубинное культивирование, ТФК – твердофазное культивирование.

Многие протеиназы, образуемые грибами рода *Aspergillus*, детально изучены, микромицеты данного рода известны своей способностью секретировать высокоактивные ферменты при росте на разных питательных средах. Некоторые из этих секретируемых ферментов, получаемых в глубинных условиях, десятилетиями используются в пищевой промышленности, в том числе, при производстве напитков (Wu et al., 2006). Значимыми представителями рода *Aspergillus*, способными к образованию высокоактивных протеиназ, можно назвать *Aspergillus flavus* (Malathi and Chakraborty, 1991; Macchione et al., 2008; Kranthi et al., 2012), *Aspergillus niger* (Yang & Lin, 1998; O'Donnell et al., 2001), *Aspergillus oryzae* (Ogawa et al., 1995; Vishwanatha et al., 2009; Vishwanatha et al., 2010). История использования некоторых представителей, например, *A. oryzae*, в производстве пищевых продуктов насчитывает более 1000 лет (Vishwanatha, et al., 2009).

Микромицеты рода *Penicillium* обладают огромным биотехнологическим потенциалом для производства протеиназ и других ферментов. К ним относятся такие известные представители, как *P. camemberti*, *P. citrinum*, *P. griseoroseum*, *P. restrictum* и *P. roqueforti* (Mikhailova, 2011). Грибы рода *Penicillium* привлекли внимание к производству щелочных протеаз в условиях ТФК (Agrawal et al., 2004).

Термофильные грибы продуцируют гидролазы с важными характеристиками, такими как более высокая термостабильность, оптимальная активность при более высоких температурах и высокие скорости гидролиза. Термостабильные протеиназы, которые действуют в диапазоне температур 65–85 °C для гидролиза белков до пептидов и аминокислот, успешно применяются в выпечке, пивоварении, моющих средствах и кожевенной промышленности (Haki & Rakshit, 2003; Merheb et al., 2010). Способность к образованию термостабильных кислых протеиназ была обнаружена у *Thermoascus aurantiacus* и *Thermomyces lanuginosus*. Так,

микровицет *T. aurantiacus* в условиях ТФК секретировал протеиназу, стабильную при 60°C (Merheb-Dini et al., 2007).

Было показано, что экспрессия внеклеточных протеиназ микровицетов в значительной мере зависит от условий окружающей среды. Важными факторами регуляции секреции протеолитических ферментов являются температура культивирования, аэрация, pH, уровень активного фермента в среде, изменение транспорта индуктора через мембрану (Егоров и др., 1979). На образование и секрецию внеклеточных протеиназ микровицетов влияют источники углерода, азота, фосфора, серы, а также витамины, аминокислоты и микроэлементы (Ландау и Егоров, 1965; Отрошко и др., 1979; Аль-Нури и др., 1981). Исследования Ярай и Бакстона показали, что экспрессия генов, кодирующих образование внеклеточных кислых протеиназ у *Aspergillus niger*, строго регулируется такими факторами как pH, источники азота и углерода (Jarai & Buxton, 1994). Так, при наличии в среде аммония и глюкозы, экспрессия генов кислых протеиназ – *perA* и *perB* обратимо репрессировалась, восстанавливаясь при истощении в среде соответствующих источников азота и углерода. Таким образом, продукция кислых протеиназ в данном случае зависела от N- и C-катаболитной репрессии в большей степени, нежели от индукции соответствующим субстратом. Кроме того, большую роль в регуляции экспрессии генов *perA* и *perB* играли значения pH среды - синтез кислых протеиназ полностью прекращался при культивировании *A. niger* в щелочных условиях (Jarai & Buxton, 1994).

Другие исследования показали похожую форму регуляции у *A. fumigatus* (Hensel et al., 1995). При добавлении в среду, содержащую эластин и глюкозу, солей аммония, образование сериновой протеиназы почти полностью прекращалось, что является еще одним подтверждением зависимости регуляции синтеза протеолитических ферментов от N-катаболитной репрессии у микровицетов (Hensel et al., 1995). Однако важность наличия в среде белковых субстратов нельзя недооценивать ввиду индуцибельного характера

синтеза некоторых внеклеточных протеиназ. На примере *Alternaria alternata* и *Fusarium oxysporum* было показано, что только при наличии органического источника азота (казеин) выявлялась протеолитическая активность, уровень которой возрастал параллельно с увеличением вносимого в среду казеина (Дунаевский и др., 1995).

Несмотря на большое количество выделенных и изученных протеиназ микробного, и в том числе и грибного происхождения, их поиск остается актуальным, поскольку критерии, предъявляемые к характеристикам той или иной протеиназы, варьируют в зависимости от сферы ее потенциального применения. И если тенденции к уменьшению стоимости получения и увеличению активности протеолитических ферментов можно считать универсальными, то такие свойства как рН и температурный оптимум работы, спектр гидролизуемых субстратов, а также природа активного центра специфичны для каждой из множества групп задач, с которыми сталкиваются современные медицина и промышленность.

Глава 3. Твердофазное культивирование микромицетов

Твердофазное культивирование (ТФК, англ. solid-state fermentation) представляет собой один из способов культивирования микроорганизмов, который нашел в последнее время достаточно широкое применение во многих странах и представляет значительный интерес для науки и промышленности. Твердофазное культивирование определяют как культивирование на твердых увлажненных частицах различной природы в отсутствие свободной воды (Pandey, 2003).

Важно отметить, что условия твердофазного культивирования приближены к почвенным условиям, естественным для микромицетов. Ключевые особенности этого способа заключаются в том, что в системе "микроорганизм-субстрат" вода находится исключительно в капельной форме, что позволяет свободно развиваться гифам грибов.

Впервые о подобном способе культивирования микроорганизмов было упомянуто еще в античные времена, но в современном виде метод твердофазного культивирования сформировался в 1965-70 годы, когда появилось множество работ о применении ТФК для обогащения белками кормов для животных, получения различных микотоксинов и антибиотиков. Стоит упомянуть, что такой метод использовался и ранее, но, в силу достаточно узкой направленности науки в период между 1940-1950 г.г., обусловленной Второй мировой войной, он не получил должного развития. Большая часть работ того времени была направлена на получение, выделение и очистку антибиотиков с использованием классических методов культивирования, таких как глубинное культивирование (ГК) и поверхностное - на матрасах с агаром.

В 1997 году был обнаружен фермент глюкоамилаза (и соответствующий ген - *glbA*), продуцируемый микромицетом *Aspergillus oryzae* исключительно в условиях твердофазного культивирования (Hata et al.,

1997). В 1998 году эта работа была продолжена, в результате чего были уточнены механизмы регуляции гена *glaB* и выяснены соответствующие условия среды, на них влияющие (Hata et al., 1998; Ishida et al., 1998). В 2009 году были изучены продуценты статинов в условиях твердофазного культивирования (Banos et al., 2009). В данный момент по всему миру ведется множество работ, направленных как на изучение регуляции генов у микроорганизмов в условиях твердофазного культивирования, так и на поиск новых продуцентов, позволяющих расширить спектр получаемых веществ или увеличить выход уже известного продукта (Zhao et al., 2019; Teles et al., 2019; Arana-Cuenca et al., 2019).

Твердофазное культивирование считается достаточно легким в использовании методом, применяемым как в лабораторных условиях, так и в промышленности. Как правило, его использование и в том, и в другом случае направлено на получение различных внеклеточных метаболитов, продуцируемых микроорганизмами, таких как ферменты, антибиотики и токсины (Raghavarao et al., 2003)

3.1. Принципиальные аспекты процесса твердофазного культивирования

Систему твердофазного культивирования условно можно разделить на несколько составляющих: субстрат, продуцент и жидкая фаза; наличие последней обусловлено природой субстрата.

Субстрат (или носитель) в сочетании с жидкой фазой представляет собой сыпучую среду, определяющим для которой является максимальное отношение площади суммарной поверхности к объему. Подобный критерий должен позволять культивируемому микроорганизму занимать как можно больше площади в системе. Носители можно разделить на две группы: натуральные субстраты (как правило, это различные отходы аграрной промышленности, такие как отруби, остатки производства круп и овощей), и

синтетические (это инертные носители, выполняющие в системе исключительно поддерживающую функцию для растущих микроорганизмов) (Costa et al., 2018). Культивирование на натуральных субстратах не предполагает внесения дополнительных источников углерода и энергии, что не позволяет, однако, подробно изучить метаболизм соответствующего микроорганизма. Использование инертных носителей дает такую возможность, но и требует внесения в систему дополнительных источников питательных веществ. Типичными примерами синтетических носителей являются пенополиуретан, перлит, амберлит, силикагель. Как правило, натуральные субстраты используются в промышленности, в частности, для накопления биомассы (Suryanaryan, 2003; Thomas et al., 2013)

При росте мицелиальных форм в системе твердофазного культивирования происходит некоторая дифференцировка гиф: часть гиф проникает глубоко в субстрат и образует конгломерат заякоренных гиф, другая часть остается на поверхности, образуя воздушные гифы, способные к спороношению (Barrios – Gonzales, 2012).

Как правило, среди микромицетов, наиболее часто используемых при твердофазном культивировании, больше всего представителей аскомицетов (*Ascomycota*), таких как, например, аспергиллы или пенициллы (Barrios – Gonzales, 2012).

Способ твердофазного культивирования представляет интерес, прежде всего, в связи с высоким количественным выходом различных продуктов. Экспериментальные данные показывают, что в случае твердофазного культивирования выход целевого продукта в несколько раз (от 2 до 14) выше, чем в случае глубинного культивирования того же микроорганизма (Pandey, 2003).

Также есть ряд практических преимуществ использования метода ТФК, указанных в табл. 2 (Holker et al., 2004).

Таким образом, способ твердофазного культивирования является одним из наиболее выгодных способов получения различных продуктов, таких как ферменты (Sivaramakrishnan, 2007), антибиотики, статины, некоторые микотоксины (Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017). Кроме того, некоторые из этих продуктов могут быть получены только с помощью твердофазного культивирования.

Таблица 2.

Биотехнологические преимущества твердофазного культивирования над глубинным (Holker et al., 2004).

Преимущества	Следствия	Проблемы, требующие решения
Биологические преимущества		
Меньшее потребление воды	Меньшее количество жидких отходов	Построение градиента влажности
Отсутствие или низкая катаболитная репрессия	Культивирование в присутствии глюкозы	
Условия, близкие к естественным (для грибов)	Высокая продуктивность культивируемых микроорганизмов.	
Культивирование на водонерастворимых твердых субстратах		Построение градиента использования субстрата
Экономические преимущества процесса культивирования		
Большая продуктивность	Меньший объем биореактора	

Меньшие затраты энергии на подогрев	Экономия денежных средств	Построение температурного градиента
Легкая аэрация		Построение кислородного градиента
Утилизация неиспользуемых источников углерода (отходов)	Обильные и дешевые источники углерода.	
Отсутствие необходимости в пеногасителях	Отсутствие потерь среди микроорганизмов в процессе культивирования	

Ввиду того, что ТФК имитирует естественные условия, рост микроорганизмов в условиях твердофазного культивирования можно рассматривать как модель их роста в почве.

В 2011-2012 году профессором Хавьером Барриоз-Гонсалесом было введено понятие, буквально переводящееся с английского языка как "физиология твердой среды", под которым подразумеваются физиологические особенности роста микроорганизмов в условиях твердофазного культивирования (Barrios – Gonzales, 2012).

Х.Барриоз-Гонсалес обозначил основные положения, определяющие некоторые биотехнологические особенности роста микроорганизмов в условиях ТФК:

1. Все биотехнологические преимущества ТФК над другими способами культивирования обусловлены, прежде всего, отличиями в физиологии грибов в различных условиях культивирования;

2. Увеличение выхода конечных метаболитов в условиях ТФК связано с увеличением уровня транскрипции генов, кодирующих их биосинтез;

3. Существуют специфические продукты, образуемые микроорганизмом исключительно в условиях твердофазного культивирования, что связано с ТФК-специфичными генами и особенностями их экспрессии.

Имеется множество физиологических различий между глубинным и твердофазным культивированием микроорганизмов, проявляющихся в различном выходе и активности продуктов, экспрессии различных генов. Например, некоторые ферменты в условиях ТФК являются внутриклеточными, а в условиях глубинного культивирования внеклеточными (Barrios – Gonzales, 2012).

Наиболее важный фактор, влияющий на различия в росте микроорганизмов в условиях ТФК - активность воды. В отличие от глубинного культивирования, в условиях ТФК активность воды невелика. Было показано, что в случае твердофазного культивирования клетки гриба *A. oryzae* накапливали глицерин и эритрин, а в случае глубинного культивирования только маннитол. Это объясняется наличием в системе ТФК осмотического стресса, индуцирующего выработку глицерин – и эритрин – дегидрогеназ (Barrios – Gonzales, 2012).

3.2. Модель роста мицелиальных микроорганизмов в условиях твердофазного культивирования

Мицелий, образованный грибом при ТФК, можно разделить на несколько типов - воздушный мицелий над поверхностью субстрата, поверхностный (влажный) субстратный мицелий и внутренний, заякоренный в субстрат (Mitchell & Krieger, 2019). Каждый тип грифа выполняет свою функцию в системе твердофазного культивирования. Воздушный слой отвечает за поступление и транспорт кислорода. В поверхностном мицелии осуществляется запас всех питательных веществ, транспортированных от

внутреннего мицелия, активно гидролизующего субстрат. Данная система является более сбалансированной, чем система глубинного культивирования (рис. 7), (Barrios – Gonzales, 2012).

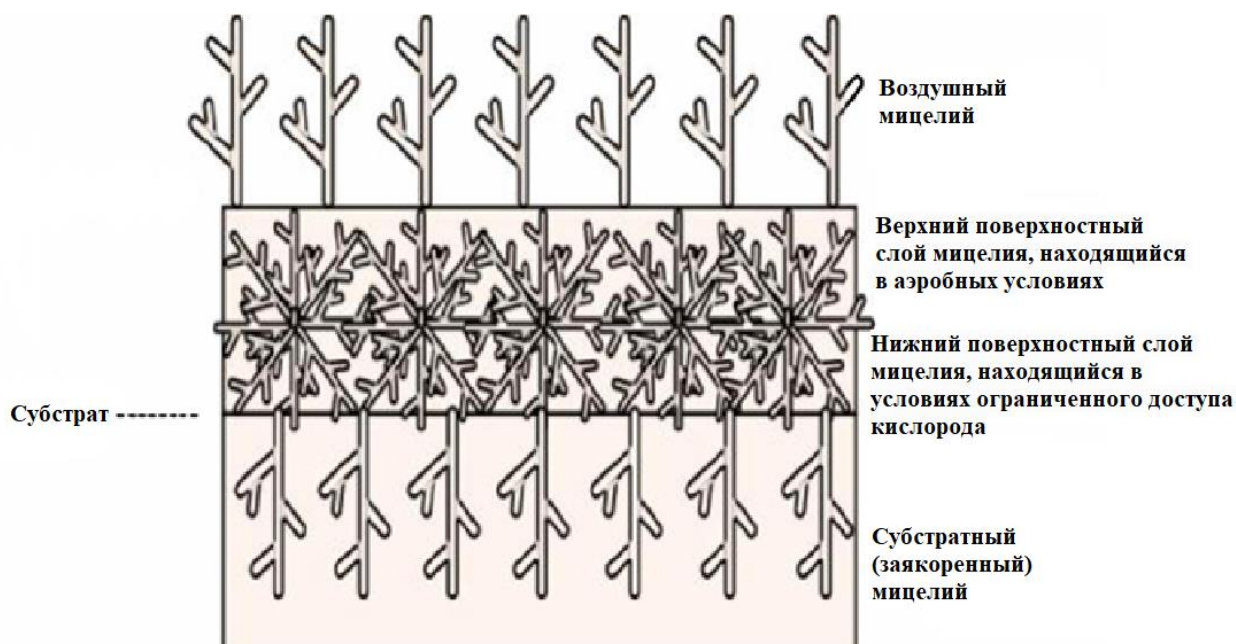


Рис. 7. Схема роста мицелиального микроорганизма в ТФК (Barrios – Gonzales, 2012).

При подробном рассмотрении воздушный слой гиф представляет собой плотные спорообразующие структуры над поверхностью субстрата, потребляющие кислород и осуществляющие его транспорт к другим слоям гиф: между гифами в этом слое мицелия находится воздух. Японскими учеными была проведена серия экспериментов, доказывающих важность воздушного слоя гиф для обеспечения микроорганизма кислородом, а также для образования амилаз. В частности, группа ученого Оостры использовала микроэлектроды для измерения градиента концентрации кислорода в поверхностном (влажном) слое гиф. Полученные результаты показали, что 80-100 мм этого слоя обеспечивались достаточным количеством кислорода для интенсивного роста (Oostra et al., 2001).

Поверхностный слой представляет собой структуру более плотную, по сравнению с воздушным мицелием. В пространстве между гифами этого слоя,

в большинстве случаев, находится жидкость. Структура поверхностного слоя напоминает поверхностный рост на агаризованной среде, но в данной модели она выполняет определенную функцию, а именно - накопление различных питательных веществ, транспорт кислорода к внутреннему слою гиф и питание воздушного мицелия. Как правило, в поверхностном мицелии накапливаются различные полиолы и сахароспирты (Barrios – Gonzales, 2012).

Наиболее глубокий слой гиф - внутренний, заякоренный в носитель, осуществляет гидролиз окружающего субстрата, часто труднодоступного, как, например, в случае натуральных носителей, богатых целлюлозой. В области апикальных гиф микромицет выделяет в окружающую среду комплекс соответствующих ферментов, гидролизуя таким образом субстрат до доступных ему мономеров (рис. 8, Holker et al., 2005; Gomes et al, 2018).

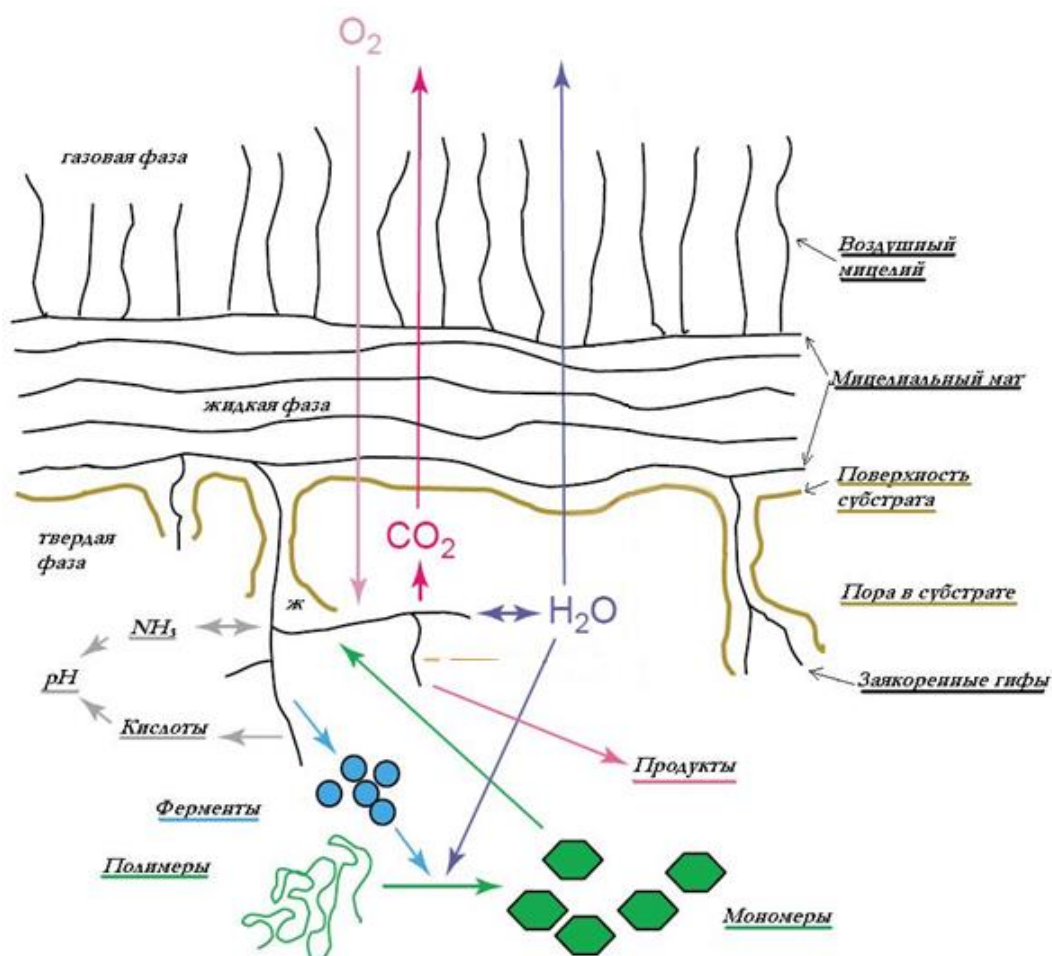


Рис. 8. Физиологические взаимодействия в системе ТФК (Holker et al., 2005).

3.3. Молекулярно-физиологические особенности роста микромицетов в условиях ТФК

Причины увеличения выхода биологически активных веществ в условиях твердофазного культивирования в ряде случаев зависят от экспрессии генов. Существуют гены, экспрессируемые в условиях ТФК и молчащие в условиях глубинного культивирования, и наоборот. Исследование этого вопроса началось с обнаружения существенно меньшей продуктивности глюкоамилазы в случае глубинного культивирования по сравнению с твердофазным. Японский микробиолог Хата в своих исследованиях показал, что у гриба *A. oryzae* существуют два глюкоамилаз-кодирующих гена - *glaA* и *glaB*, соответственно. Экспрессия гена *glaB* в ТФК была достаточно высокой, в то время как в условиях глубинного культивирования она отсутствовала совсем. Экспрессия гена *glaA* имела место и в том, и в другом случае, но в твердофазном варианте проявлялась меньше (Hata et al., 1997). Эксперименты Ишиды с коллегами (Ishida et al., 1998) были посвящены изучению регуляции транскрипции каждого из этих генов в различных условиях культивирования микроорганизма *A. oryzae*, которые показали, что экспрессия гена *glaB* индуцируется крахмалом и мальто-олигосахаридами подобно гену *glaA*, но при этом существенное влияние оказывают другие физические факторы. Так, экспрессия гена *glaB* может быть индуцирована такими факторами, как низкая активность воды, высокая температура и физические барьеры на пути роста гриба, представленные структурой частиц твердой фазы. Таким образом, синтез глюкоамилазы у *A. oryzae* регулируется на транскрипционном уровне.

Дальнейший делеционный анализ промотора *glaB* (1128 п.н.) показал, что существует короткий участок между -350 п.н и -324 п.н., делеции в котором приводят к полной потере активности промотора в случае ТФК. Этот участок был назван регион А (region A). Он состоит из двух мотивов теплового шока: первого - HSE (5' - AGAAN - 3') и второго - GC бокс (-335 до -324). Замена первого шокового мотива приводит к уменьшению экспрессии

гена *glaB*, но при этом сохраняется его регуляция факторами окружающей среды, замена же второго элемента также приводит к уменьшению экспрессии, но при этом полностью теряется ответ на такие индуцирующие факторы как температура, активность воды и плотность субстрата. Из этого следует, что два этих мотива крайне важны для экспрессии соответствующего гена. Двойная замена мотивов приводит к полной депрессии гена в 99% случаев. Таким образом, участок в 27 пар нуклеотидов (регион А) принципиально важен для полной экспрессии гена *glaB* в ТФК (Barrios – Gonzales, 2012).

3.4. Биохимические особенности продуктов, получаемых в условиях твердофазного культивирования.

В 1995 году мексиканскими учеными была проведена работа, направленная на получение трех пектинолитических ферментов - экзопектиназы, эндопектиназы и пектинлиазы. В качестве продуцента использовался штамм гриба *Aspergillus niger*, который культивировали двумя способами - в условиях ТФК и в глубинных условиях культивирования. Был проведен подробный сравнительный анализ таких характеристик ферментов как оптимум температуры и рН активности и степень сродства к субстрату (константа Михаэлиса) (Acuna-Arguelles et al., 1995).

В результате этой работы было показано, что оптимальные значения температур для работы ферментов в разных условиях культивирования существенно отличаются: оптимальная температура для активности эндопектиназы в случае твердофазного культивирования колебалась от 57°C до 60°C, при глубинном культивирования оптимум температур был на 15°C ниже - около 45°C. Для экзопектиназ в обоих случаях он был равен 45°C, но при этом ферменты, полученные при глубинном культивировании, были более термочувствительны и при увеличении температуры необратимо теряли активность. Пектинлиаза, полученная при ТФК, была стабильна и имела

максимальную активность при температуре около 60°C, в отличие от фермента, полученного при глубинном культивировании, максимум активности которого приходился на 25°C. Такие соотношения прежде всего связаны с температурой в процессе культивирования. При глубинном культивировании температура постоянна и легко поддается контролю. В ТФК температура неоднородна и в месте работы фермента (в глубине субстрата) существенно выше за счет физиологической активности микромицета и отсутствия перемешивания.

Существенные различия полученных продуктов были также показаны в константах Михаэлиса, количественно отражающих сродство к субстрату. Значения этих констант обозначены в табл. 3.

Таблица 3.

Количественные значения K_m ферментов, полученных при твердофазном и глубинном культивировании (Acuna-Arguelles et al., 1995)

Фермент	K_m (мг/мл)	
	ТФК	Глубинное культивирование
Экзопектиназы	2,05	5,42
Эндопектиназы	270,4	69,4
Пектинлиазы	12,8	2,28

Также интересным является влияние pH на активность и стабильность полученных ферментов. Максимальную активность эндопектиназа в условиях ТФК показывала при pH от 5,5 до 6,0, когда при глубинном культивировании тот же фермент имел максимальную активность в более низкой области pH -

между 4,5 – 5,5. Максимальный выход эндопектиназы при ТФК наблюдался при pH между 2,6 и 6,0. Максимумы активности, полученные для экзопектиназы, находились в одной и той же широкой области pH - между 3,5 – 5,0. Оптимумы pH для пектинлиазы в обоих случаях также были одинаковы – 7,0 – 7,5, но в условиях экстремальных значений pH активность пектинлиазы, полученной при ТФК, была выше (Acuna-Arguelles et al., 1995).

Так, для экзопектиназы константа Михаэлиса при ТФК меньше, чем при глубинном, но для эндопектиназы и пектинлиазы сродство к субстрату при ТФК существенно выше, чем в случае глубинного культивирования.

Электрофорез внеклеточных белков, выделяемых микромицетом *A. niger* в условиях твердофазного и глубинного культивирования, показал некоторые различия в локализации полос на геле. Так, при ТФК в геле были обнаружены четыре пектиназы с молекулярной массой в 68, 46,5, 45 и 36 кДа каждая; при глубинном культивировании после электрофореза внеклеточных белков было обнаружено также четыре пектиназы, из которых по молекулярной массе с пектиназами, полученными при ТФК, совпало только три (Acuna-Arguelles et al., 1995).

Несмотря на активное изучение и использование ТФК, до сих пор нет рекомендаций по его применению, которые были бы универсальны для любого продуцента, поэтому изучение поведения конкретного микроорганизма в условиях ТФК и приемы, повышающие уровень синтеза продукта, являются актуальными.

Таким образом, для получения новых ферментных продуктов с желаемыми свойствами, в том числе в условиях импортозамещения, необходимо проводить скрининг микромицетов на способность эффективно образовывать протеиназы, разрушающие фибриллярные белки, а также изучать физиологию их образования в различных условиях культивирования как научную основу биотехнологического процесса.

Часть 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 4. Материалы и методы

4.1. Микроорганизмы, использованные в работе

Микромицеты, использованные в работе, были отобраны после предварительных экспериментов по скринингу продуцентов протеиназ, обладающих фибринолитической и коллагенолитической активностью (Шаркова и др., 2015) из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ: *Tolypocladium inflatum* k1, *Beauveria bassiana* 2 и *Paecilomyces lilacinus* k1 - энтомопатогенные грибы, *Aspergillus ustus* 1 и *Cladosporium cladosporoides* 2 – сапротрофы, выделенные из почвы.

4.2. Определение энзиматических индексов микромицетов

Для оценки протеолитического потенциала культур микромицетов проводили их поверхностное культивирование в чашках Петри на агаризованных средах следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,25, пептон – 5,0, белковый субстрат (казеинат натрия, желатин, фибрин, эластин) – 10,0, агар – 15,0. Посев производили уколом в центр чашки. Определение энзиматических индексов (EI) осуществляли путем измерения диаметров зон гидролиза и колоний микромицетов через 7 суток и расчета значений по следующей формуле: $\text{EI}=(D+d)/D$, где D – диаметр колонии в мм, а d – диаметр зоны гидролиза в мм.

4.3. Определение общей протеолитической активности

Общую протеолитическую активность экзопротеаз микромицетов определяли спектрофотометрически модифицированным методом Ансона-Хагихары (Anson, 1935; Hagihara et al., 1958) по количеству тирозина в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктах протеолиза после инкубации смеси 400 мкл 1%-ного раствора казеина по Гаммерстену в 0,1 М Трис-HCl буфере (pH 8,0–8,2) и 200 мкл пробы при 37°C в течение 10 минут в

термошейкере при 600 об/мин. Реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 14000 об/мин, после чего в надосадочной жидкости измеряли поглощение при длине волны 275 нм.

Для определения количества тирозина в пробе строили калибровочную кривую по тирозину. За единицу активности принимали количество мкмоль тирозина, отщепившегося за минуту в 1 мл исследуемой пробы.

4.4. Определение коллагенолитической активности

4.4.1. Определение коллагенолитической активности с азоколлом

Коллагенолитическую активность определяли колориметрически с использованием суспензии азоколла (2 мг/мл) в 0,05М Трис-НСl-буфере, рН 8,2. Реакцию проводили согласно общепринятой методике с незначительными изменениями (Chavira et al., 1984). Для проведения реакции к 200 мкл пробы добавляли 400 мкл суспензии азоколла и инкубировали при 37°C в течение 20 минут в термошейкере при 600 об/мин, после чего реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10%-ной ТХУ. Далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 14000 об/мин, после чего в надосадочной жидкости измеряли поглощение при длине волны 519 нм.

Для расчета коллагенолитической активности строили калибровочную кривую по азоколлу, гидролизуя проназой Е точные навески азоколла до их полного растворения.

За единицу активности принимали количество мг расщепившегося азоколла за 1 мин (E_{Azk}).

4.4.2. Определение коллагенолитической активности с нативным коллагеном и нингидрином

Нативный коллаген (бычий из ахиллового сухожилия) использовали в концентрации 3 мг/мл. Реакцию проводили согласно общепринятой методике (Zhang Y. et al., 2013). Для проведения реакции 7 мкл фермента, в

концентрации 1 мг/мл, добавляли к 343 мкл суспензии коллагена, инкубировали при 37°C в течение 3 и 5 часов. Затем останавливали реакцию равным объемом буфера, содержащего 12% PEG 6000 и 25 мкМ ЭДТА, после добавляли 500 мкл нингидринового реагента и нагревали до 80°C в течение 10 минут. Охладив, добавляли 500 мкл бидистиллированной воды. Окрашенные пробы измеряли при длине волны 570 нм.

Для расчета коллагенолитической активности строили калибровочную кривую по L-лейцину. Активность выражали в CDU. Одна единица расщепления коллагена (CDU) высвобождает пептиды из коллагена (бычий нативный из ахиллового сухожилия) в эквиваленте 1,0 мкмоль L-лейцина за 5 часов, при pH 7,4 при 37 ° C (по окраске нингидрина).

4.5. Определение фибринолитической активности

Способность фермента расщеплять фибрин также оценивали по количеству высвобожденного тирозина. К 200 мкл пробы добавляли 400 мкл 1% раствора фибрина в 0,1М Трис-HCl буфере (pH 8,2). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин в термошейкере при 600 об/мин. Реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10% ТХУ, далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 14000 об/мин, после чего в надосадочной жидкости измеряли поглощение при длине волны 275 нм.

Для определения количества тирозина в пробе использовали калибровочную кривую по тирозину.

За единицу активности, как и в случае с определением казеинолитической активности, принимали количество мкмоль тирозина, отщепившегося за минуту в 1 мл исследуемой пробы.

4.6. Глубинное культивирование

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, NaNO_3 – 0,2, KH_2PO_4 – 0,05, MgSO_4 – 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.

4.7. Получение комплексного препарата внеклеточных белков

Препарат внеклеточных белков микромицета получали осаждением всех белков фильтрата культуральной жидкости сульфатом аммония из расчета 608 грамм $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 1 литр фильтрата. Высоленные белки осаждали центрифугированием с охлаждением при 15 000 об/мин в течение 20 минут при 4°C. Полученный осадок растворяли в 0,01 М Трис-HCl-буфере pH 8,2 и диализовали в диализных мешочках против ацетатного буфера при 4°C в течение 12 ч. Отдиализованный препарат замораживали жидким азотом и лиофильно высушили.

4.8. Изоэлектрофокусирование

Изоэлектрофокусирование комплексного препарата проводили по методу Вестерберга в градиенте рН 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 рН, поглощение белка при 280 нм и общую протеолитическую активность (Vesterberg, 1971).

4.9. Нативный электрофорез белков в полиакриламидном геле

Нативный электрофорез в ПААГ проводили по методу Дэвиса в Трис-глициновом буфере (Davis, 1964). Нижний гель готовили в буфере с рН 8,8 и концентрацией акриламида 7,5% , а верхний с рН 6,8 и концентрацией 6%. Разделение белков проводили при силе тока 50 мА. Покраску осуществляли 0,08% раствором Кумасси бриллиантового голубого G-250 в 3,5% хлорной кислоте в течение 40 минут, после чего отмывали гель 7% уксусной кислотой.

4.10. Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле

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). Перед покраской гель инкубировали в фиксирующем растворе (изопропанол, уксусная кислота и вода в соотношении 3:1:6 по объему) в течение 30 минут. Покраску осуществляли 0,1% раствором Кумасси R-250 в смеси изопропанола, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 5:1:4 по объему в течение 40 минут, после чего отмывали гель 7% уксусной кислотой.

4.11. Ингибиторный анализ

Ингибиторный анализ проводили с ингибиторами различных классов протеиназ (таблица 4).

Таблица 4.

Ингибиторы, использованные в работе

Ингибитор	Концентрация, мг/мл	Группа ингибируемых протеаз
ЭДТА	1,1	Металлопротеиназы
о-фенотропин	0,5	
<i>n</i> -ХМБ (<i>пара</i> -хлормеркурибензоат)	0,5	Цистеиновые протеиназы
PMSF (фенилметилсульфонил фторид)	0,3	Сериновые протеиназы

Действие ингибиторов 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.

4.12. Определение активности с хромогенными пептидными субстратами

Хромогенные пептидные субстраты (ХПС) – олигопептидные молекулы с *пара*-нитроанилином на N-конце (pNA), применение которых позволяет изучить специфичность ферментов по отношению к определенным аминокислотным последовательностям. Если фермент расщепляет данный

ХПС, pNA выделяется в раствор, окрашивая его в желтый цвет (максимум поглощения 405 нм).

Эластинолитическую активность определяли с хромогенным пептидным субстратом эластазы Suc-Ala-Ala-pNA.

Для проведения реакции к 100 мкл образца добавляли 25 мкл буфера (0,05 М Трис-HCl, pH 8,2) и 50 мкл 0,05% хромогенного пептидного субстрата, полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 5 минут в термошейкере (600 об/мин). Для остановки реакции добавляли 100 мкл 50% уксусной кислоты. Далее измеряли оптическую плотность полученной смеси при 405 нм на спектрофотометре. Концентрацию выделившегося *пара*-нитроанилина определяли, используя калибровочную кривую с линейным участком в диапазоне от 0,01 до 0,2 мкМ/мл.

За единицу активности принимали количество мкмоль *пара*-нитроанилина, отщепившегося за минуту.

4.13. Определение углеводного компонента в составе протеиназы

Для выявления содержания углеводного компонента выделенной протеиназы проводили качественную реакцию на определение гликопротеинов с помощью периодной кислоты и реактива Шиффа (фуксинсернистой кислоты) методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах (Thronton et al., 1996). Для приготовления реактива Шиффа 0,05 г основного фуксина растворяли в 50 мл горячей дистиллированной воды, добавляли 0,5 г сульфита натрия и 0,5 мл концентрированной соляной кислоты. Через 30 мин, после осветления раствора, к нему добавляли 0,5 г порошкового активированного угля, перемешивали и фильтровали на стеклянном фильтре. Реакционноспособность полученной фуксинсернистой кислоты проверяли по формальдегиду.

В качестве положительного контроля на реакцию использовали раствор внеклеточной дрожжевой инвертазы, в качестве отрицательного – БСА, в концентрациях 0,5 мг/мл.

4.14. Определение рН-оптимума действия и рН-стабильности протеиназы

рН-оптимум активности протеиназы определяли в 0,4 М универсальном (натрий-ацетат-фосфат-боратном) буфере с рН от 4,0 до 7,0. Активность определяли с азоколлом. К 150 мкл буфера с соответствующим значением рН добавляли 100 мкл раствора фермента и 100 мкл раствора субстрата.

Для определения рН-стабильности фермента проводили инкубацию протеиназы в растворах буфера с разными значениями рН (от 4,0 до 10,0) при 37°C в течение 2 ч, после чего определяли коллагенолитическую активность. Полученные результаты выражали в % остаточной активности.

4.15. Определение температурного оптимума активности и термостабильности протеиназы

Температурный оптимум действия протеиназы определяли в 0,05М Трис-HCl-буфере, рН 8,2 по коллагенолитической активности в диапазоне от 20 до 55°C.

Термостабильность фермента изучали при инкубации протеиназы при заданных температурах (от 24 до 65°C) в течение 2 ч и выражали в % остаточной активности.

4.16. Твердофазное культивирование

Твердофазное культивирование проводили в культуральных флаконах Т-75 («Eppendorf», Германия) в статических условиях при 28°C. В качестве субстратов или 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 дополнительно изучали образование протеиназ без добавления дополнительных питательных веществ, заменяя ферментационную среду дистиллированной водой. Инокулирование осуществляли 1 мл суспензии спор культуры дистиллированной водой с Твин-80. По истечении времени культивирования в культуральные флаконы добавляли 0,05 М Na-ацетатный буфер (pH 5,5), после чего 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 субстрата или носителя фильтрованием через фильтровальную бумагу («ФС», Россия). В фильтрате проводили определение активности протеиназ.

4.17. Обработка результатов

Все эксперименты проводили в трех-пяти повторностях, данные в таблицах представлены средним арифметическим значением с учетом стандартного отклонения. Гистограммы и графики построены с учетом пределов погрешностей полученных значений. Обработку данных проводили в программах Excel и STATISTICA.

Глава 5. Результаты и обсуждение¹

5.1. Выявление способности протеиназ *A. ustus* 1 к расщеплению фибриллярных белков

Для оценки протеолитического потенциала отобранных штаммов были рассчитаны значения энзиматических индексов на 4 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 $EI_{\text{Каз}}$ к $EI_{\text{Жел}}$, $EI_{\text{Фиб}}$ и $EI_{\text{Эл}}$. Данные соотношения позволяли выявить продуцентов более специфичных к расщеплению фибриллярных белков протеиназ.

Полученные результаты представлены в табл. 5. Как видно из таблицы, 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. cladosporoides* 2. 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

¹ Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора:

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.
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.
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.

активностью к фибриллярным белкам. Также перспективными для дальнейшего изучения показали себя *T. inflatum* k1 и *B. bassiana* 2: при достаточно высоких значениях EI_{Жел}, EI_{Фиб} и EI_{Эл}, соотношения EI_{Каз} / EI_{Жел} составляют 1,07 и 1,08, соответственно. Значения энзиматических индексов, рассчитанные для микромицетов *P. lilacinus* k1 и *C. cladosporioides* 2, были низкими, что позволяет исключить данные штаммы из работы.

Таблица 5.

Энзиматические индексы микромицетов на средах с различными белковыми субстратами

Микромицет	На среде с казеин- ом (EI _{Каз})	На среде с жела- тином (EI _{Жел})	На среде с фибри- ном (EI _{Фиб})	На среде с эласти- ном (EI _{Эл})	EI _{Каз} / EI _{Жел}	EI _{Каз} / EI _{Фиб}	EI _{Каз} / EI _{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

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. Как видно на рис. 9, максимальное значение коллагенолитической активности было показано для микромицета *A. ustus* 1 ($110,6 \text{ E}_{\text{АзК}}/\text{мл} \times 10^{-3}$), 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.

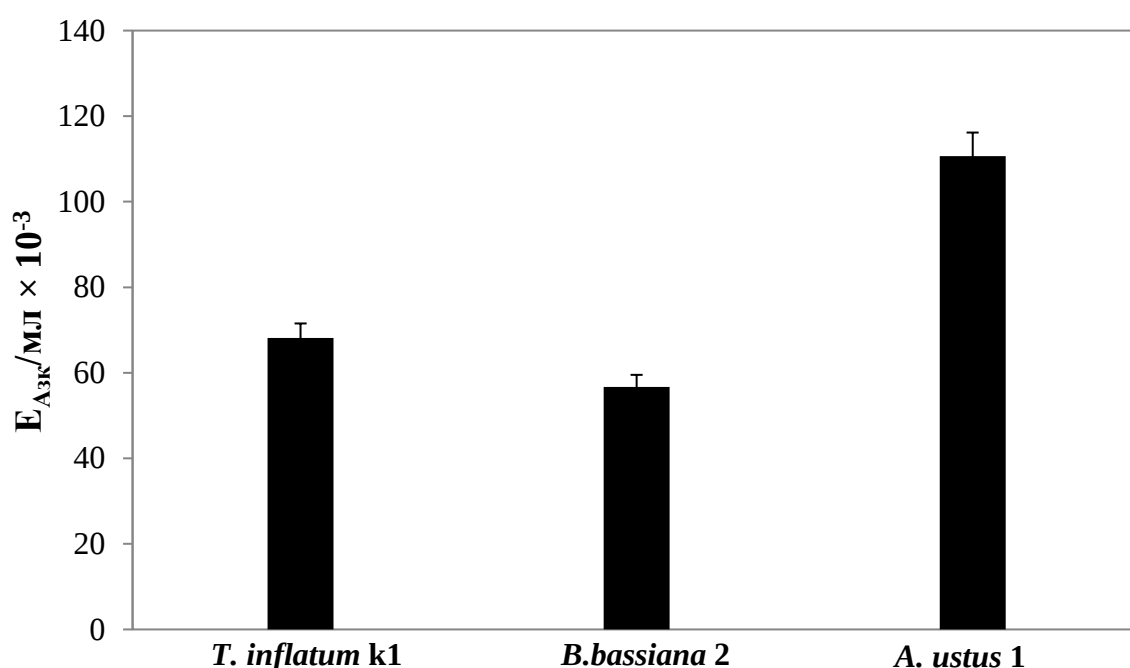


Рис 9. Коллагенолитическая активность протеиназ, образуемых микромицетами *T. inflatum* k1, *B. bassiana* 2 и *A. ustus* 1 на среде с соевой мукой.

На рис. 10 показаны значения общей протеолитической активности (ОПА) протеиназ, образуемых микромицетами *A. ustus* 1, *T. inflatum* k1 и *B. bassiana* 2. Максимальное значение данной активности было выявлено у протеиназ, образуемых *T. inflatum* k1, оно составило – $69,2 \text{ E}_{\text{Тир}}/\text{мл}$, а активность, полученная для *B. bassiana* 2 оказалась на 18% меньше – $56,8 \text{ E}_{\text{Тир}}/\text{мл}$. Важно отметить, что минимальное значение ОПА было показано для микромицета *A. ustus* 1 – $29,8 \text{ E}_{\text{Тир}}/\text{мл}$, 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.

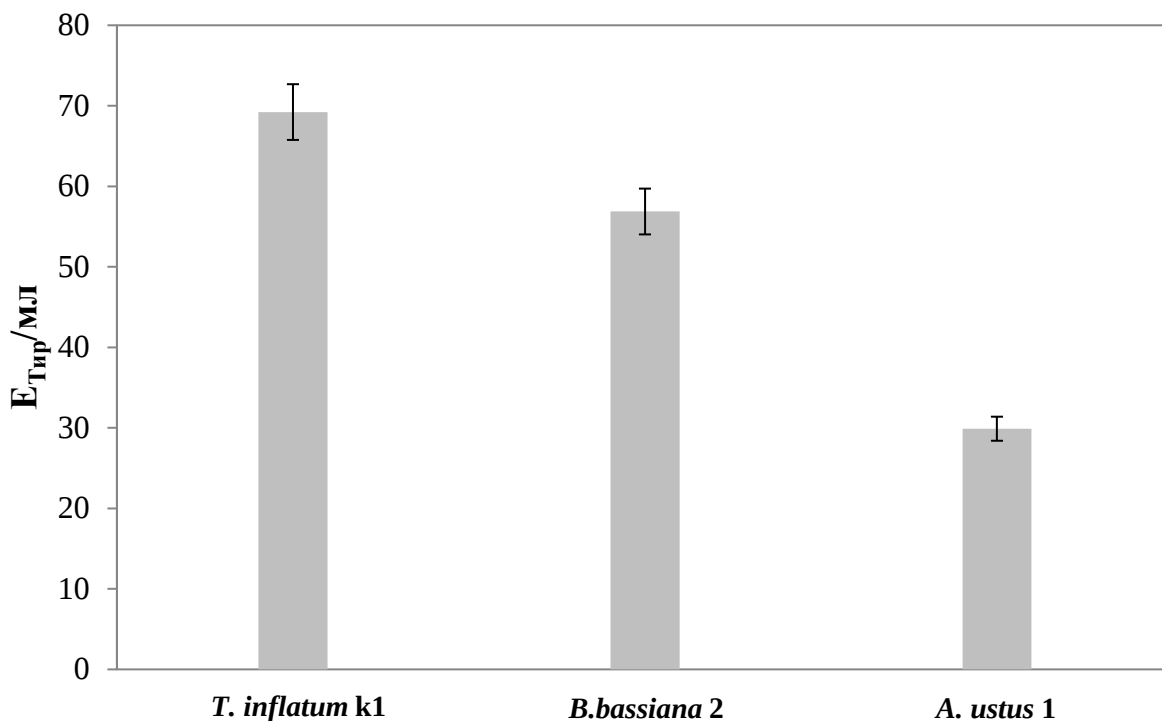


Рис 10. Общая протеолитическая активность протеиназ, образуемых микромицетами *T. inflatum*, *B. bassiana* и *A. ustus* на среде с соевой мукой.

Были изучены динамики накопления протеиназ, образуемых *T. inflatum* k1 и *A. ustus* 1 (рис. 11, рис. 12). Максимальные значения общей протеолитической активности для *T. inflatum* k1 были выявлены на 3 и 5 сутки культивирования, и составили 70,3 и 64,4 E_{Тир}/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 E_{Тир}/мл. Пик образования коллагенолитических протеиназ микромицетом *T. inflatum* k1 (69,76 E_{АЗК}/мл × 10⁻³) был выявлен на 5 сутки культивирования, тогда как для *A. ustus* 1 максимальные значения (122,6 E_{АЗК}/мл × 10⁻³) данной активности наблюдали на сутки раньше. 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.

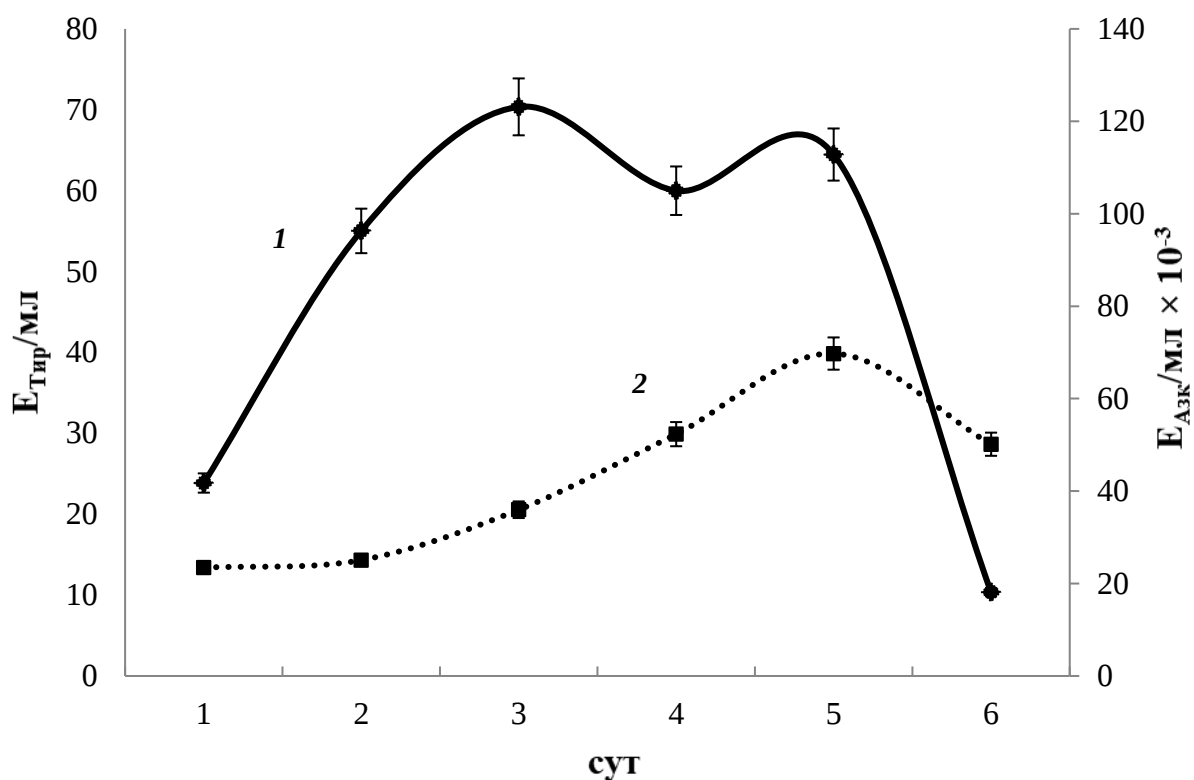


Рис. 11. Динамика накопления протеолитических ферментов микромицетом *T. inflatum* k1 на среде с соевой мукой. 1 – общая протеолитическая активность, 2 – коллагенолитическая активность.

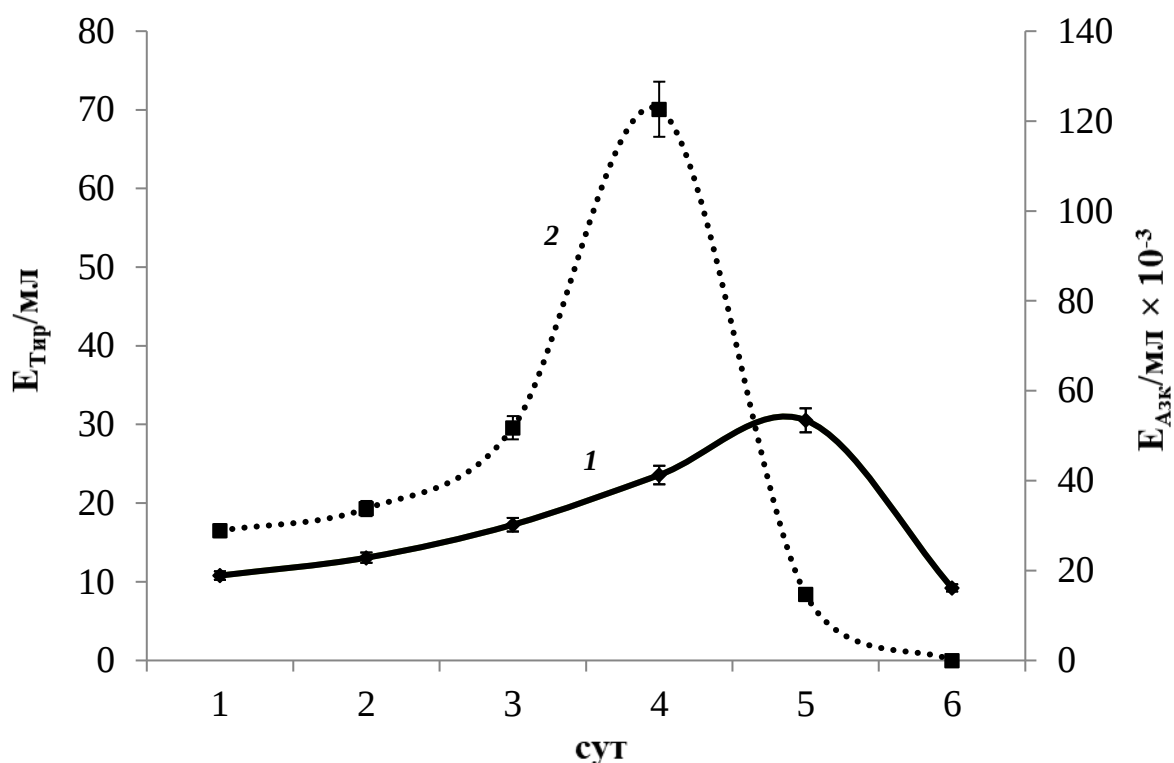


Рис. 12. Динамика накопления протеолитических ферментов микромицетом *A. ustus* 1 на среде с соевой мукой. 1 – общая протеолитическая активность, 2 – коллагенолитическая активность.

5.2. 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. 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. Эксперименты проводили в условиях глубинного культивирования.

На рис 13. 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.

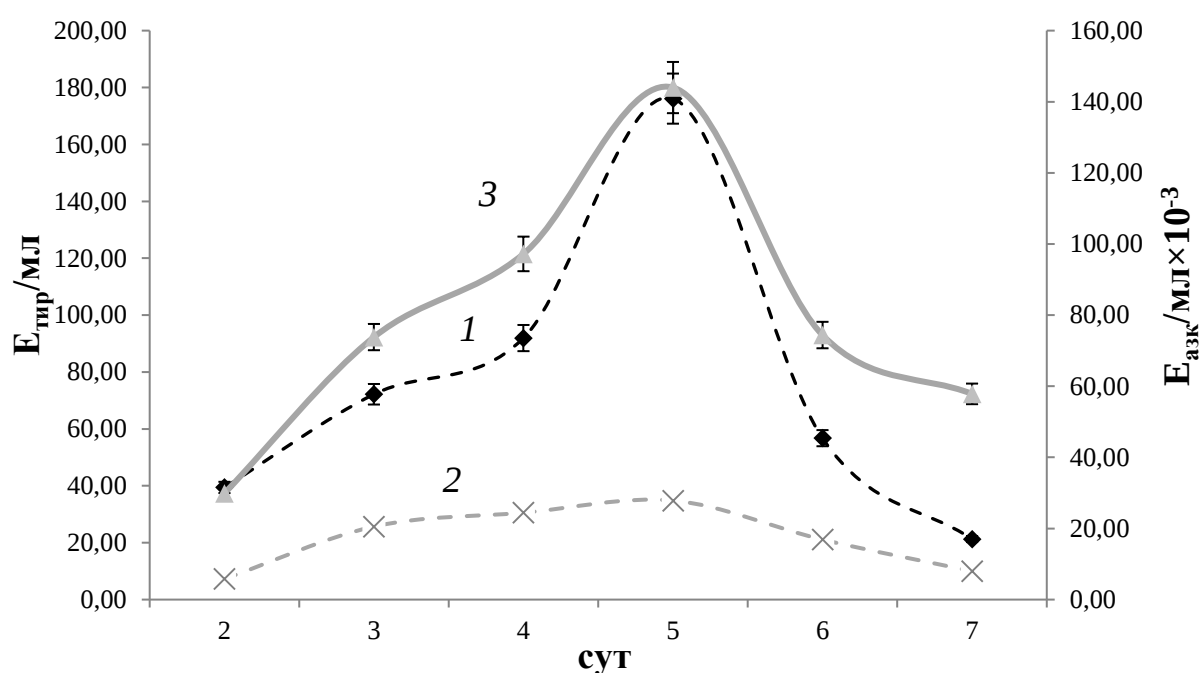


Рис. 13. Динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 на среде №1, содержащей гидролизат рыбной муки (0,5%), NaNO_3 (0,2%) в качестве источников азота. 1 — казеинолитическая, 2 — фибринолитическая, 3 — коллагенолитическая активность.

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. 14). 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 Е_{тир}/мл) активности при культивировании на среде № 2 приходился на 3 сутки культивирования, его значение превысило значение, полученное на среде №1, на 10 %.

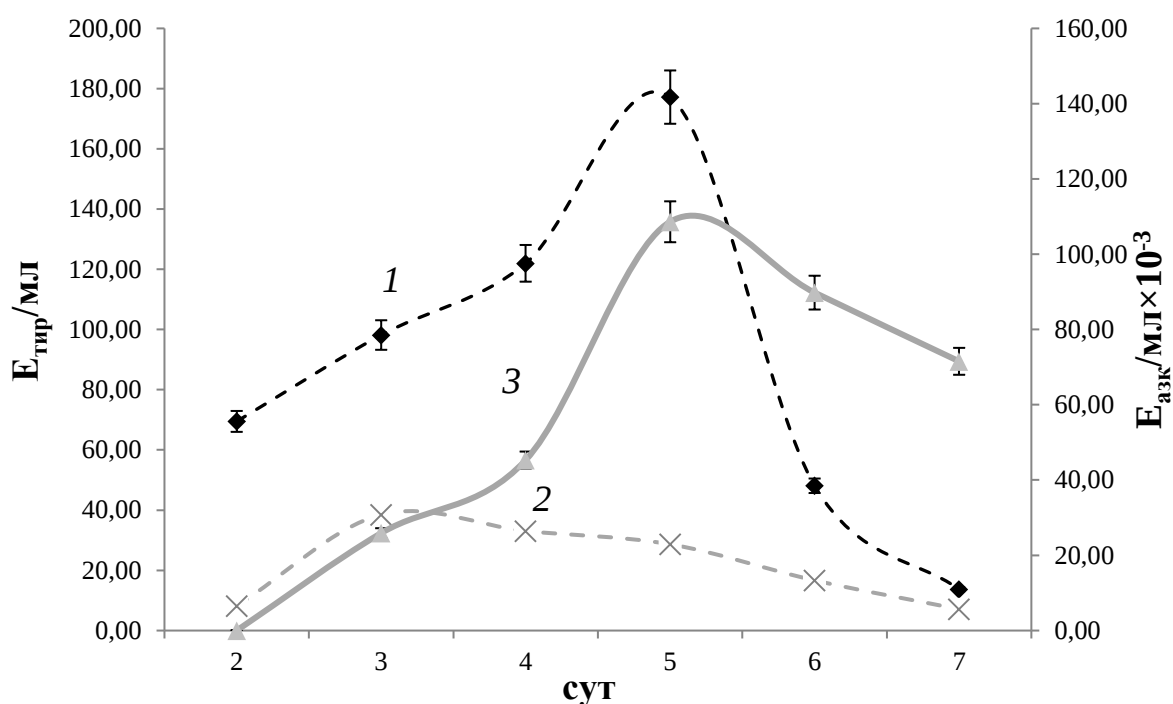


Рис. 14. Динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 на среде № 2, содержащей гидролизат рыбной муки (0,5%), пептон (0,5%) в качестве источников азота. 1 – казеинолитическая, 2 – фибринолитическая, 3 – коллагенолитическая активность.

При культивировании на среде № 3, содержащей только один минеральный источник азота (в %) - $NaNO_3$ - 0,5, значения всех типов активности были низкими (рис. 15). Максимумы общей протеолитической

(13,45 $E_{\text{Тир}}/\text{мл}$) и коллагенолитической ($24,19 E_{\text{Азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) активности были достигнуты на 5 сутки культивирования, а фибринолитическая активность не была выявлена вовсе. Очевидно, в данном случае можно наблюдать явление азотной катаболитной репрессии.

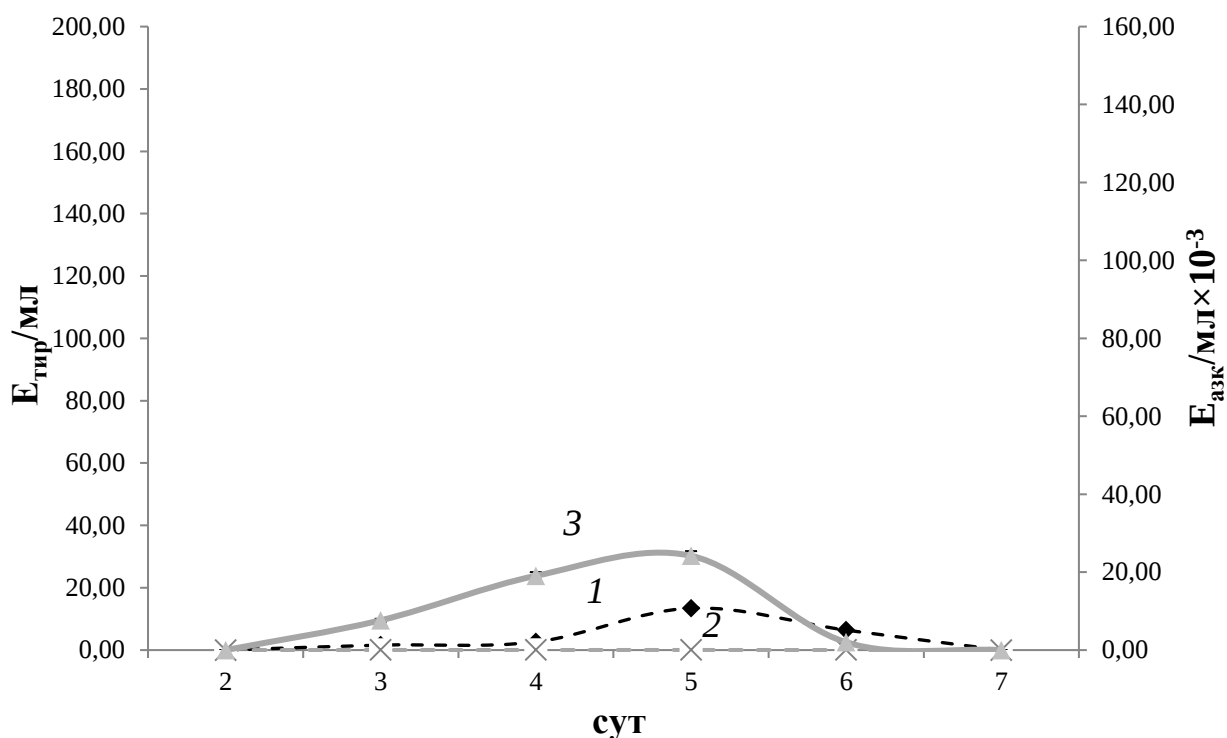


Рис. 15. Динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 на среде №3, содержащей NaNO_3 (0,5%) в качестве источника азота. 1 – казеинолитическая, 2 – фибринолитическая, 3 – коллагенолитическая активность.

На рис. 16 представлена динамика накопления протеиназ на среде № 4, также содержащей только один минеральный источник азота (в %) - NH_4NO_3 - 0,5. В данном случае, максимальные значения всех изученных типов активности были разнесены во времени. Так, максимум общей протеолитической активности ($136,04 E_{\text{Тир}}/\text{мл}$) был выявлен на 5 сутки культивирования, коллагенолитической ($26,47 E_{\text{Азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) - на 4, а фибринолитической ($80,26 E_{\text{Тир}}/\text{мл}$) на 3 сутки культивирования. В данном случае, также можно говорить о проявлении азотной катаболитной репрессии.

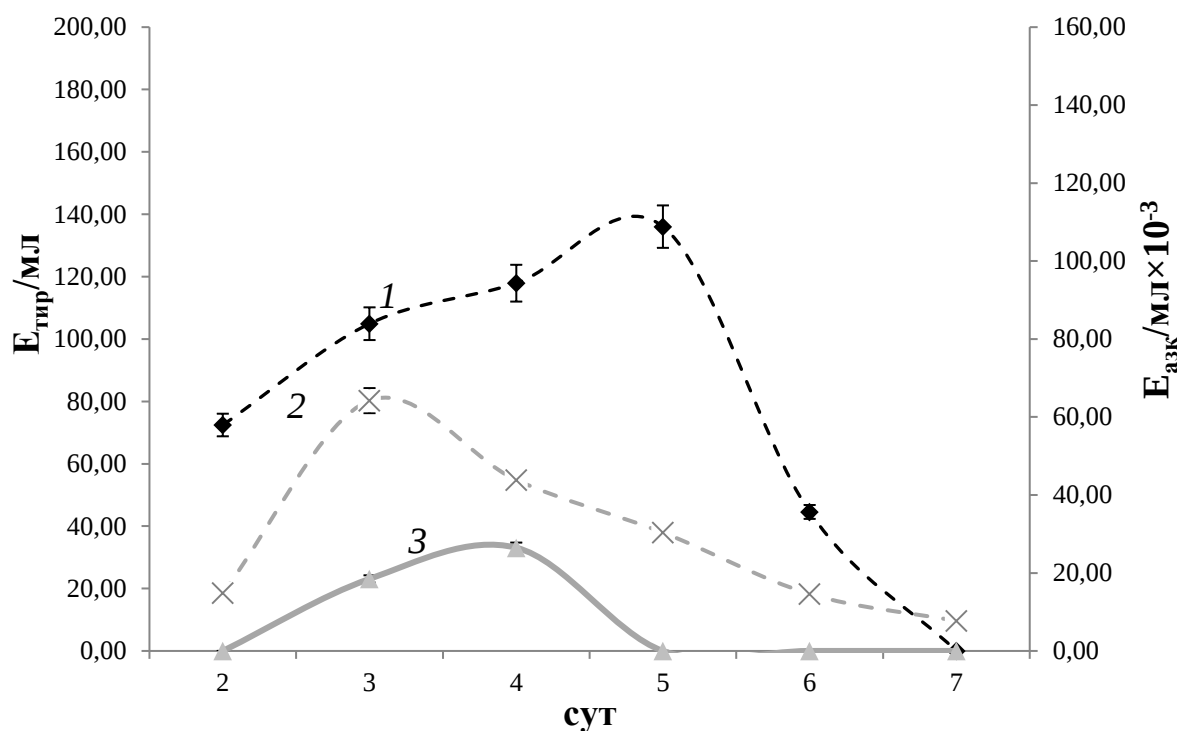


Рис. 16. Динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 на среде № 4, содержащей NH_4NO_3 (0,5%) в качестве источника азота. 1 – казеинолитическая, 2 – фибринолитическая, 3 – коллагенолитическая активность

Результаты, полученные при культивировании на среде № 5, содержащей единственный источник аминного азота (в %) - пептон - 1,0, представлены на рис. 17. Значения протеолитической активности, выявленные на среде № 5, оказались достаточно низкими. Стоит отметить, что максимум накопления протеиназ, обладающих коллагенолитической ($23,6 E_{\text{Азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) и общей протеолитической ($15,8 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) активностью был обнаружен на 4 сутки культивирования, а максимум накопления фибринолитических ($17,11 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) протеиназ – на 3 сутки.

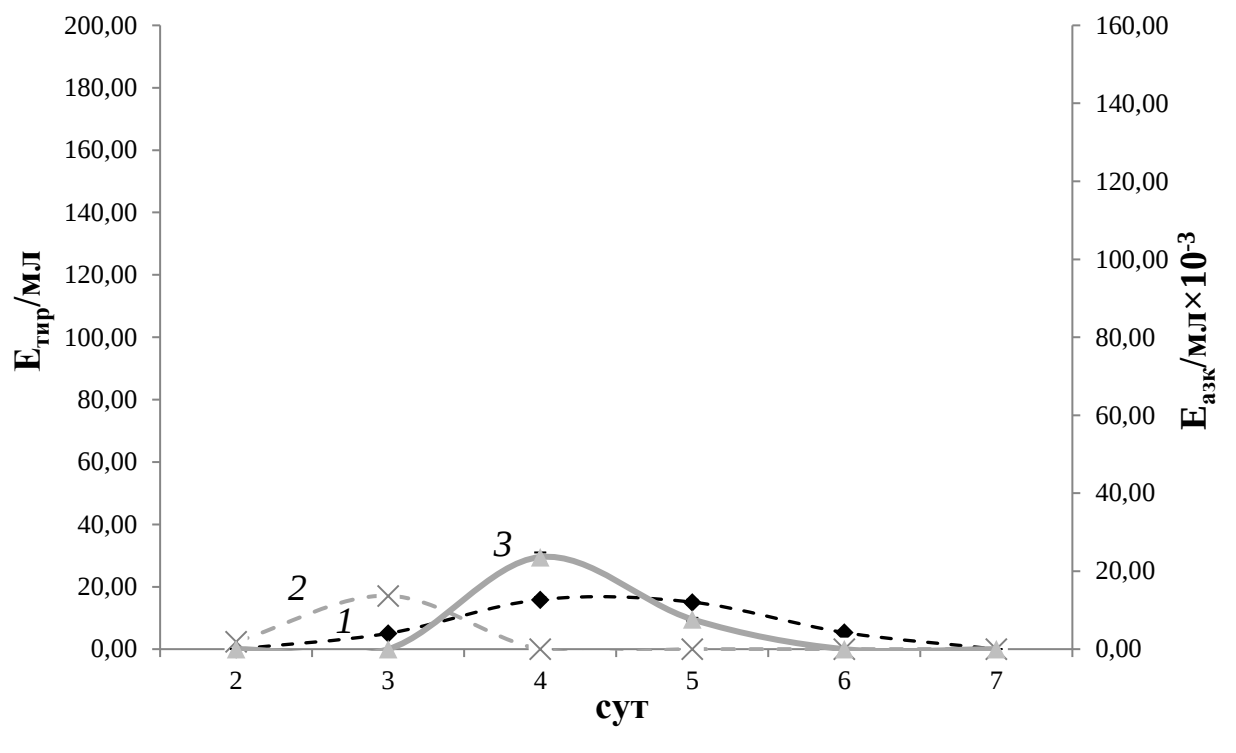


Рис. 17. Динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 на среде №5, содержащей пептон (1,0%) в качестве источника азота. 1 – казеинолитическая, 2 – фибринолитическая, 3 – коллагенолитическая активность

В табл. 6 приведены удельные значения всех изученных типов активности на биомассу продуцента на 5 сутки культивирования. В соответствии с полученными результатами (табл. 6), наибольшее значение удельной коллагенолитической активности ($5,38 E_{\text{азк}}/\text{мг} \times 10^{-3}$) было показано при культивировании *A. ustus* 1 на ферментационной среде №1, содержащей как аминные источники азота, так и минеральные. При росте на средах №3 и №4, содержащих только минеральные источники азота, значения всех активностей, кроме фибринолитической ($1,7 E_{\text{тир}}/\text{мг}$), были близки, или активности отсутствовали вовсе, вне зависимости от природы содержащегося в среде источника азота, однако, интересно отметить, что на среде №3 при незначительных значениях активностей отмечали максимальное количество биомассы микромицета *A.ustus* 1 (26,7 мг/мл). При росте на среде № 2,

содержащей только аминные формы азота (гидролизат рыбной муки в сочетании с пептоном), удельная коллагенолитическая активность составила $3,65 \text{ E}_{\text{азк}} / \text{мг} \times 10^{-3}$ и была меньше, чем при росте на среде №1, в 1,5 раза, а значение удельной фибринолитической активности составило $1,9 \text{ E}_{\text{тир}} / \text{мг}$. Значение же удельной общей протеолитической активности, напротив, оказалось на 12% выше, чем при росте на среде №1. Среда № 5, в состав которой в качестве источника азота входил только пептон, также оказалась неэффективной для повышения продуктивности образования протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков (табл. 6).

Таблица 6.

Влияние источников азота в составе ферментационной среды на образование протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 на 5 сут. культивирования

№ среды	Источник азота, %	Общая протеолитическая активность, $\text{E}_{\text{тир}} / \text{мг}$ биомассы	Коллагенолитическая активность, $\text{E}_{\text{азк}} / \text{мг}$ биомассы $\times 10^{-3}$	Фибринолитическая активность, $\text{E}_{\text{тир}} / \text{мг}$ биомассы
1	Гидролизат рыбной муки - 0,5, NaNO_3 - 0,2	6,48	5,38	2,14
2	Гидролизат рыбной муки - 0,5, пептон - 0,5	7,35	3,65	1,9
3	NaNO_3 - 0,5	0,19	0	0
4	NH_4NO_3 - 0,5	0,37	0	1,7
5	Пептон - 1,0	4,54	0	0

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

Широко известно, что существуют различные механизмы, регулирующие синтез и секрецию внеклеточных протеиназ микромицетами. Как правило, грибы образуют большие количества протеолитических ферментов на более сложных белковых источниках азота, чем на низкомолекулярных или неорганических источниках азота (Kusera, 1981), также для микромицетов закономерно, что синтез ферментов подавляется быстро метаболизируемыми источниками азота, такими как аминокислоты или ионы аммония в ферментационной среде (Kumar and Takagi, 1999). Однако, внеклеточные ферменты могут секретироваться конститутивно, при относительно низких концентрациях источников как аминного, так и минерального азота (Geisseler and Horwath, 2008), что и происходит в данном случае.

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 (рис. 18). Таким образом, можно сделать вывод, что наличие в среде гидролизатов белков индуцирует рост микромицета.

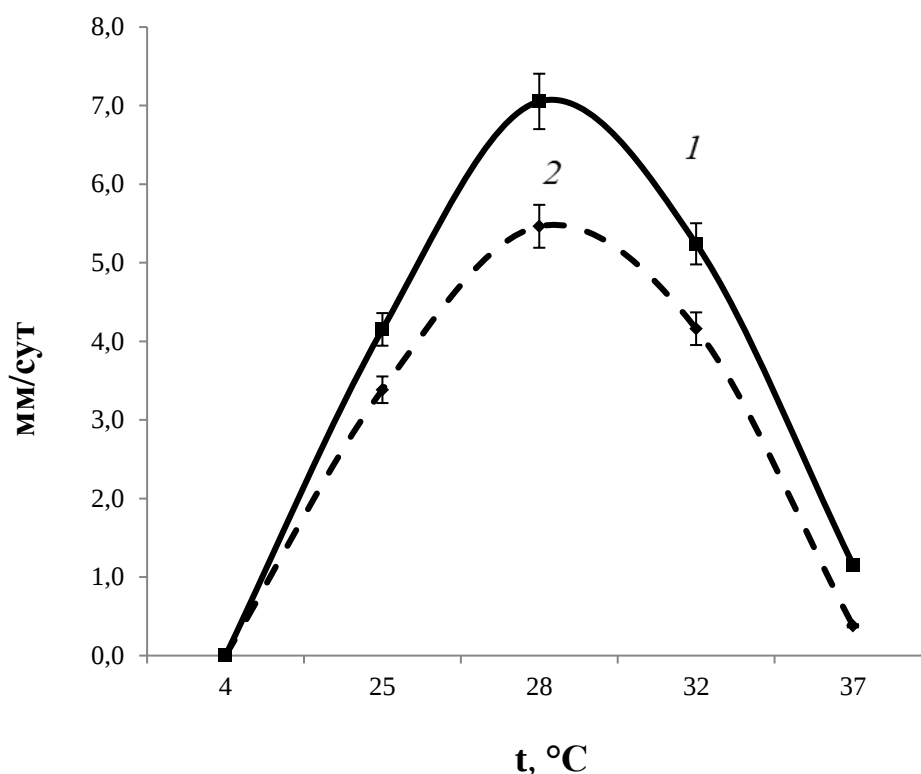


Рис. 18 Линейная скорость роста *A. ustus* 1 на ферментационной агаризованной среде № 1 (1) и на сусло-агаре (2).

На рис. 19 показана 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 $134,86 \text{ Е}_{\text{азк}} / \text{мл} \times 10^{-3}$, значение удельной активности на биомассу – $5,39 \text{ Е}_{\text{азк}} / \text{мг} \times 10^{-3}$.

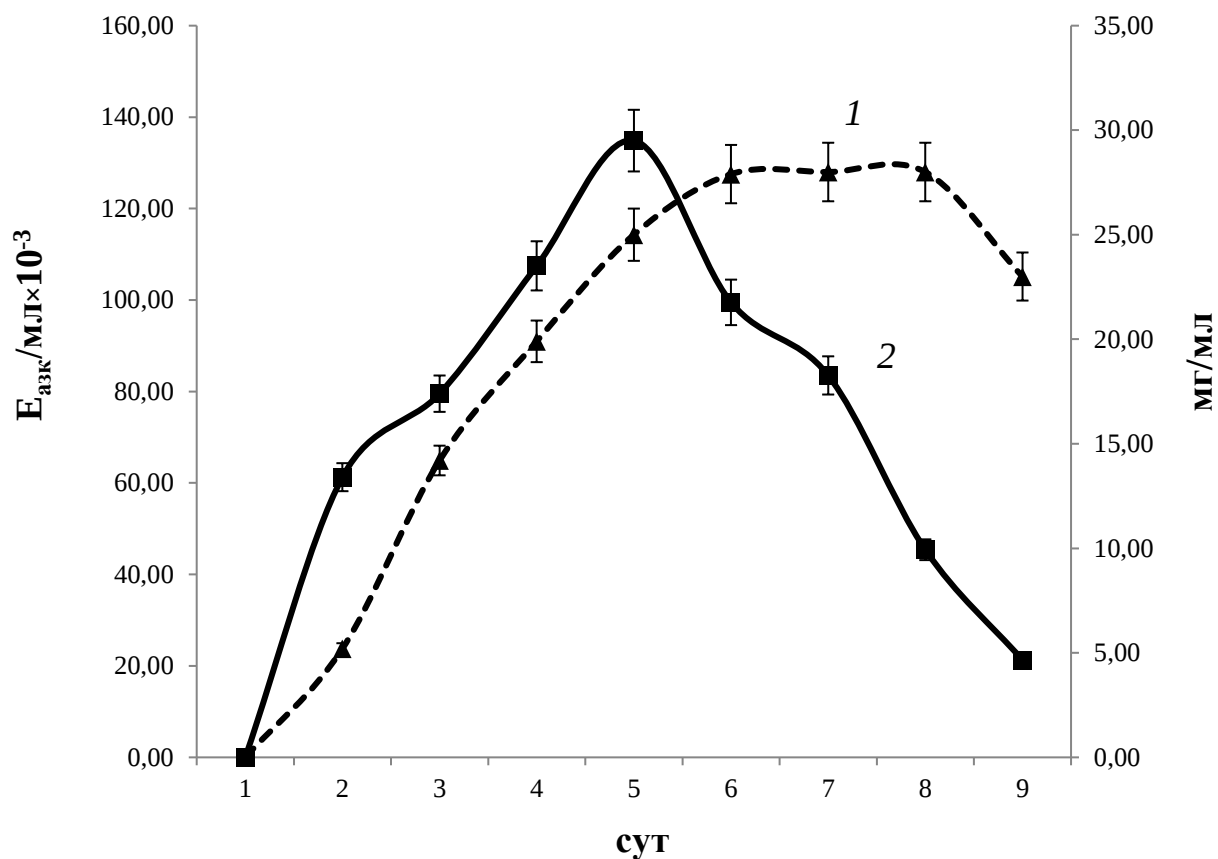


Рис. 19. Динамика роста (1) и накопления протеолитических ферментов (2) микромицетом *A. ustus* 1.

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 (рис. 20).

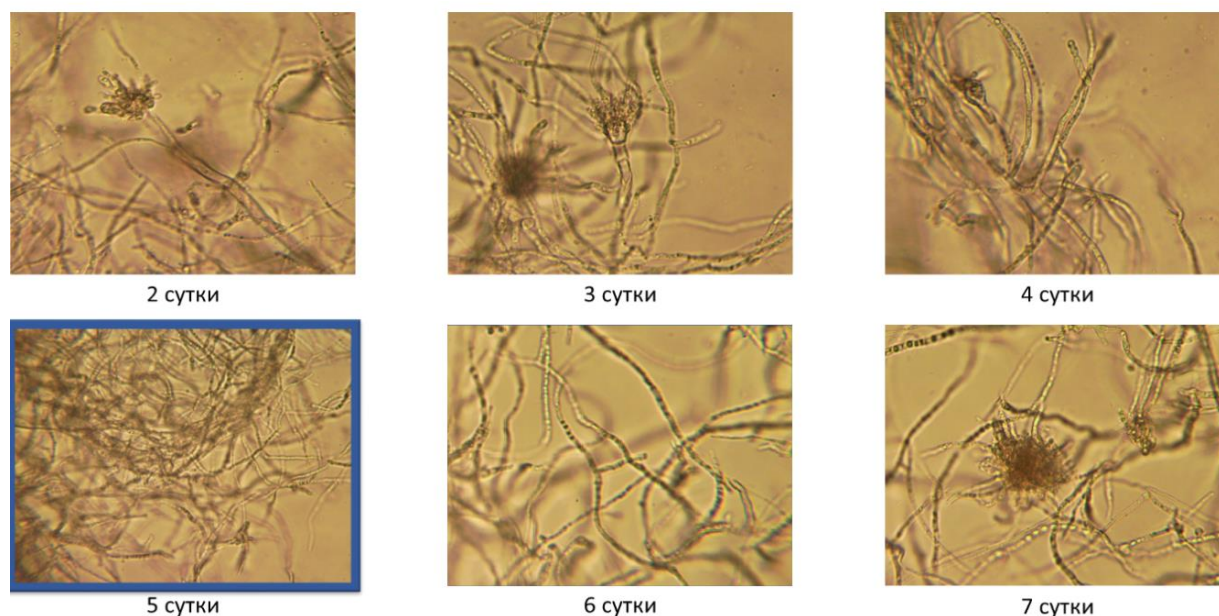


Рис. 20. Световая микроскопия мицелия (x40) *A. ustus* 1 при росте на ферментационной среде № 1 в глубинных условия культивирования.

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 °С (рис. 21). Максимальные значения всех изученных типов активности были выявлены при температуре культивирования 28 °С: значение казеинолитической активности составило 65,2 Е_{тир}/мл, фибринолитической – 25,8 Е_{тир}/мл, а коллагенолитической – 121,31 Е_{азк}/мл×10⁻³. Интересно отметить, что при этом синтез коллагенолитических протеиназ падал почти в два раза при изменении температуры культивирования на 2 °С (до 30 °С), при относительно незначительных потерях для казеинолитической и фибринолитической активностей: их значения составили на 6,5 % и 12,1 % меньше, чем при культивировании на 28 °С. Культивирование при других изученных температурах показало существенно более низкие значения активности по сравнению с полученными при 28 °С. Так, при 25 °С значение казеинолитической активности составило лишь 22,5 % от максимального (при

28 °C), коллагенолитической – 45,6%, а фибринолитической – 22%. При культивировании микромицета *A. ustus* 1 при 32 °C зафиксированные значения казеинолитической и коллагенолитической активности были ниже максимальных в 2,18 раз и в 2,5 раза, соответственно, а фибринолитических протеиназ совсем не было обнаружено.

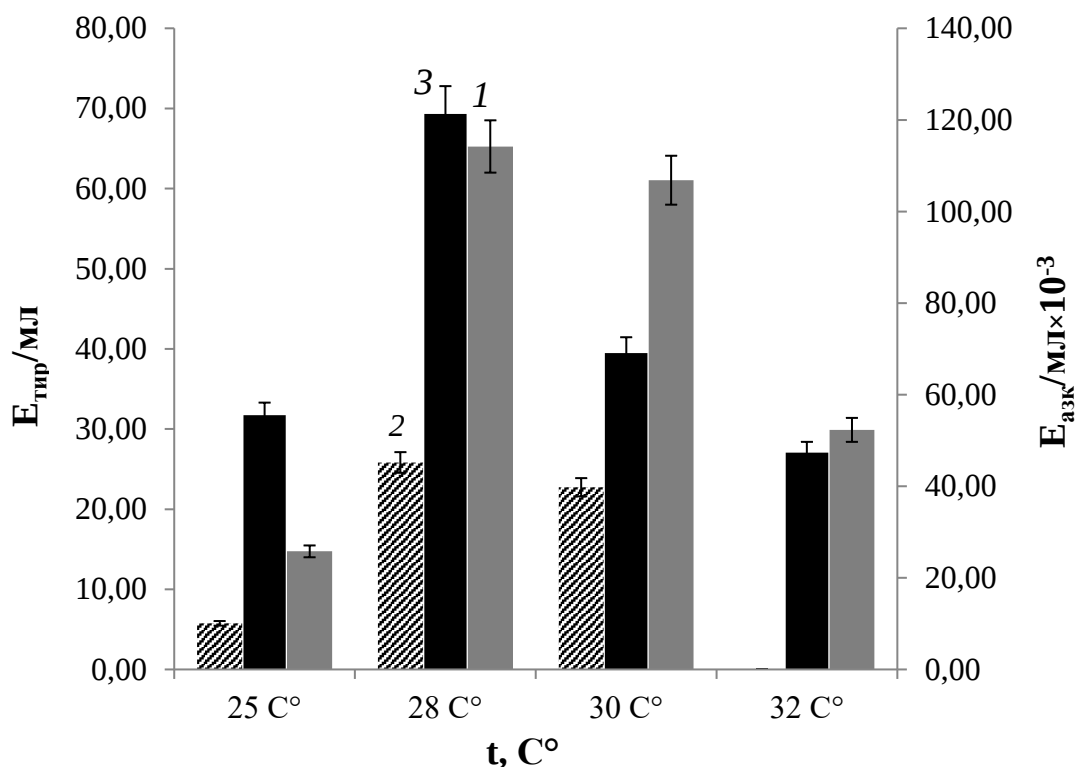


Рис. 21. Влияние температуры культивирования на продукцию протеиназ микромицетом *A. ustus* 1. 1 – казеинолитическая, 2 – фибринолитическая, 3 – коллагенолитическая активность.

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 (рис. 22). 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 $E_{\text{тир}}/\text{мл}$, фибринолитической – 19,3 $E_{\text{тир}}/\text{мл}$, а коллагенолитической – 127,3 $E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$. Интересно, что изменение pH среды оказывает незначительное влияние на уровень фибринолитической активности протеиназ, образуемых *A. ustus* 1 – различия составляют не более 21% от максимальных значений данной активности, полученных при pH 7. Для коллагенолитической и казеинолитической активности такой закономерности не наблюдали.

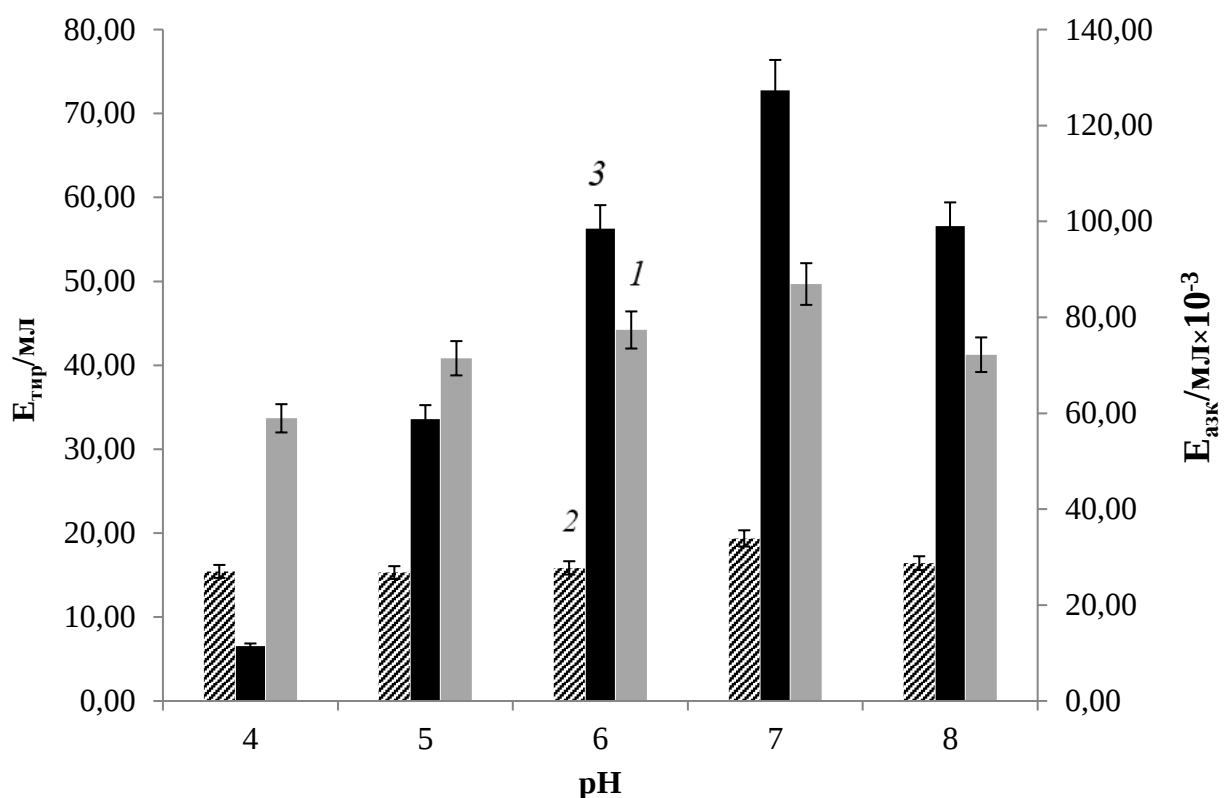


Рис. 22. Влияние начального значения pH среды на продукцию протеиназ микромицетом *A. ustus* 1. 1 – казеинолитическая, 2 – фибринолитическая, 3 – коллагенолитическая активность.

По литературным данным известно, что микромицеты рода *Aspergillus* способны к образованию протеолитических ферментов в широком диапазоне температур и pH (Martínez-Medina et al., 2019), однако синтез таких ферментов при температуре культивирования 27-28 °C и нейтральных

начальных значениях pH ферментативной среды является наиболее распространенным среди представителей данного вида.

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 (субстрата) 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. Ранее нами было показано, что данная среда оказывала позитивное влияние на скорость роста микромицета (рис. 18). Данную среду использовали в качестве жидкой фазы в системе ТФК, при температуре 28 С° и pH 7 (рис. 23). Для проведения данного эксперимента были выбраны четыре инертных носителя и один носитель-субстрат (рис. 24а) – 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 Е_{тип}/мл) и фибринолитической (114,79 Е_{тип}/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, не было обнаружено активности по отношению к фибриллярным белкам вовсе, однако казеинолитическая активность была достаточно высокой и составила 634,78 Е_{тип}/мл. При использовании кокосового волокна удалось выявить казеинолитическую (150,3 Е_{тип}/мл), коллагенолитическую (105,43 Е_{азк}/мл×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 (рис. 24б), 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.

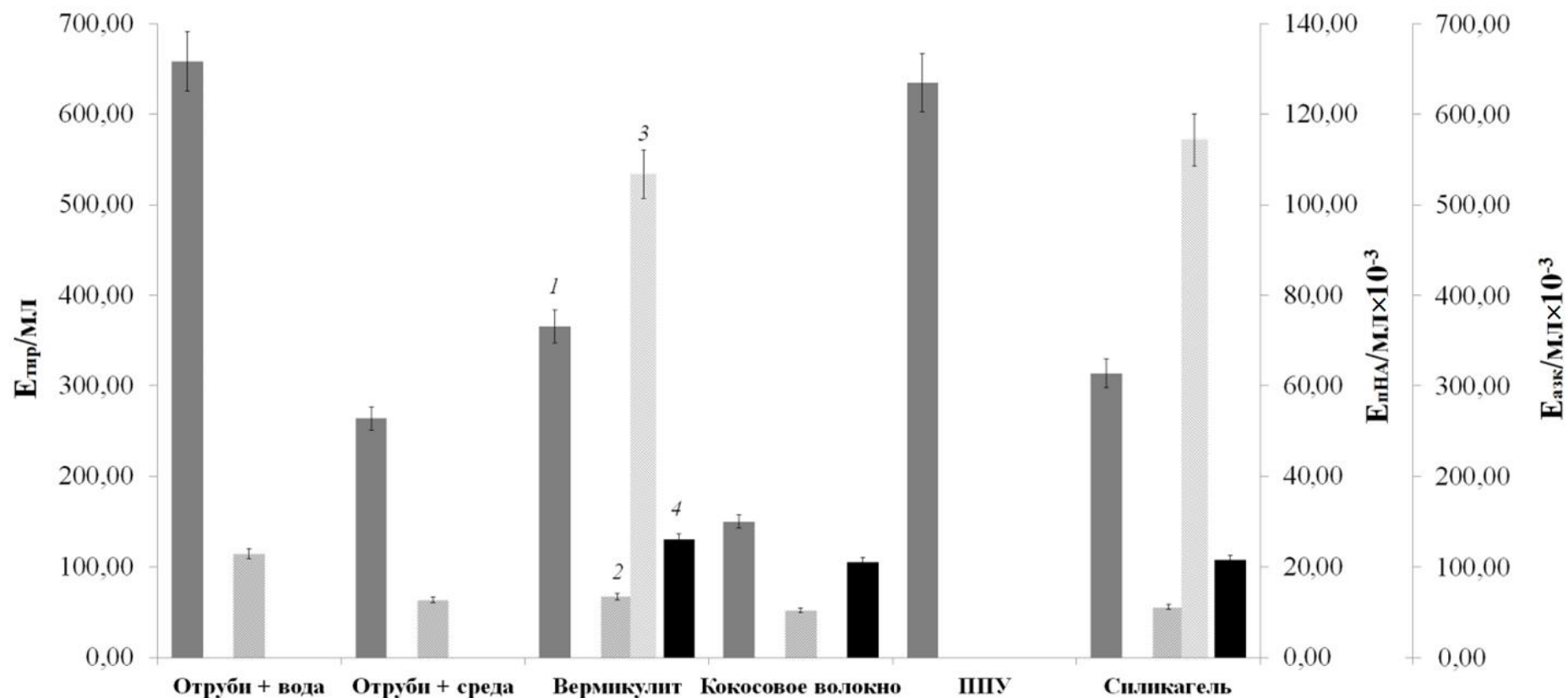
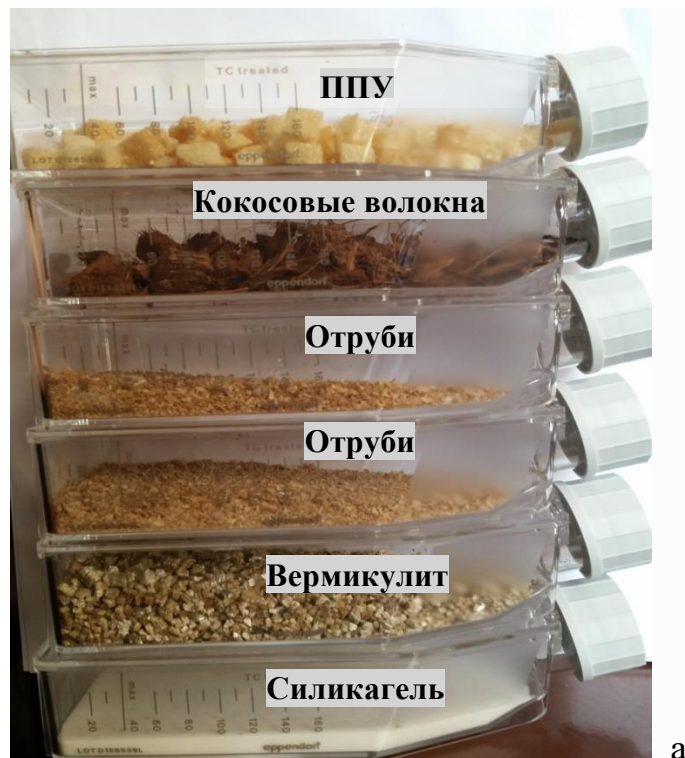


Рис. 23. Влияние природы носителя (субстрата) в условиях твердофазного культивирования на образование протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 на 7 сутки культивирования. 1 - казеинолитическая, 2 - фибринолитическая, 3 – эластинолитическая, 4 - коллагенолитическая активность.



а



б

Рис. 24. а - носители/субстраты в культуральных флаконах Eppendorf (Германия), б - рост микромицета *A. ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования с вермикулитом.

5.3 Динамика накопления протеолитических ферментов *A. ustus* 1 с коллагенолитической, фибринолитической и эластинолитической активностью в условиях твердофазного культивирования

По результатам предыдущего эксперимента были отобраны два наиболее интересных варианта носителей в системе ТФК: силикагель и вермикулит. С использованием данных носителей были изучены динамики накопления протеиназ, образуемых микромицетом *A. ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования. В качестве жидкой фазы использовали ферментационную среду №1.

При использовании вермикулита в качестве носителя (рис. 25), максимальное значение казеинолитической активности ($1018,9 \text{ Е}_{\text{тир}}/\text{мл}$) 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 $\text{Е}_{\text{тир}}/\text{мл}$ на 3 и на 5 сутки, соответственно. Эти значения оказались выше полученных в условиях глубинного культивирования более, чем в 9 раз ($25,82 \text{ Е}_{\text{тир}}/\text{мл}$). Наибольшее значение коллагенолитической активности ($242,7 \text{ Е}_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) 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.

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.

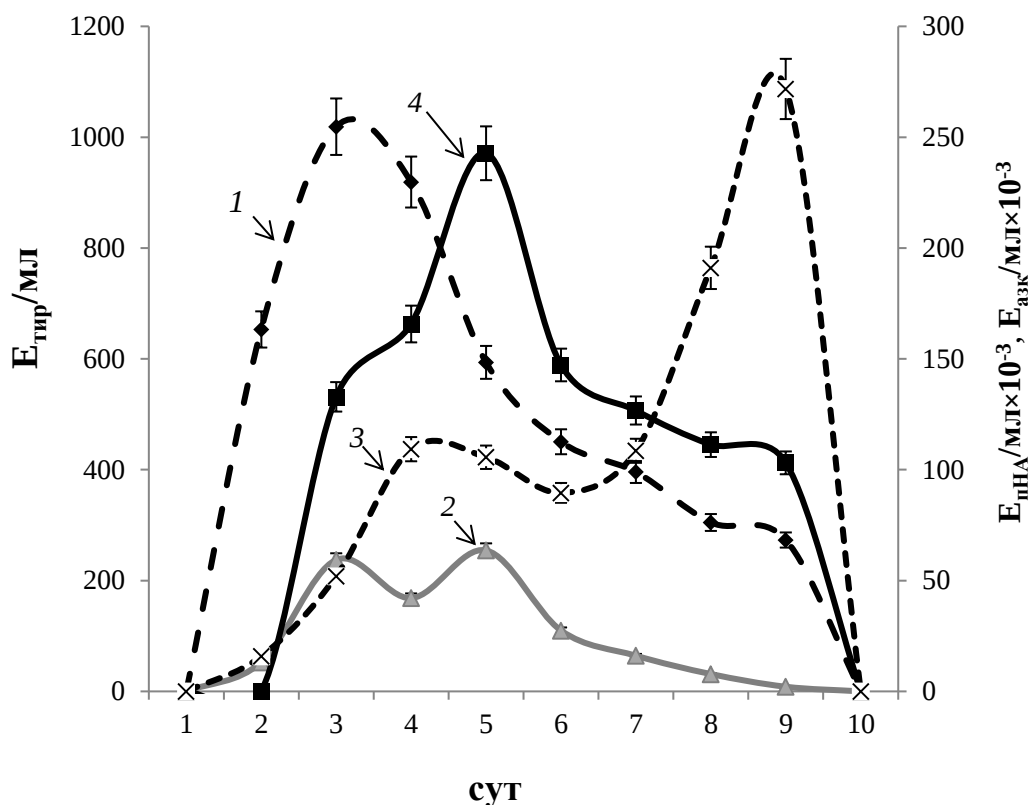


Рис. 25. Динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 в условиях ТФК с вермикулитом в качестве носителя. 1 - казеинолитическая, 2 - фибринолитическая, 3 - эластинолитическая, 4 - коллагенолитическая активность.

На рис. 26 показана динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 в условиях ТФК с силикагелем в качестве носителя. На профиле общей протеолитической активности можно видеть три точки, соответствующие наибольшим значениям для данной активности – на 3 (259,09 Е_{тир}/мл), 5 (111,3 Е_{тир}/мл) и 9 (293,7 Е_{тир}/мл) сутки, соответственно. Для фибринолитической активности было показано два максимальных значения – на 3 (76,9 Е_{тир}/мл) и

на 5 ($241,5 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) сутки, они совпадали по времени с пиками казеинолитической активности в обеих точках. Наибольшее из полученных значений фибринолитической активности сопоставимо, но все же ниже такового, выявленного в условиях ТФК с вермикулитом, на 5 %. Максимальные значения коллагенолитической активности наблюдали на 6 ($43,8 E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) и 9 ($58,6 E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) сутки, однако, они составили лишь 18 и 24,1 % от значения коллагенолитической активности, полученного в системе с вермикулитом. Максимум накопления эластинолитических протеиназ наблюдали на 7 и 9 сутки, значения данной активности составили $116,9$ и $121,3 E_{\text{пНА}}/\text{мл} \times 10^{-3}$, что также оказалось ниже максимального значения эластинолитической активности, выявленного в условиях твердофазного культивирования с использованием вермикулита на 9 сутки, более чем в 2 раза.

Предположительно, заметно более низкие результаты, полученные в системе с силикагелем, обусловлены его плотностью, влагоемкостью и слишком маленьким размером пор, что ограничивает мицелий в процессе его развития. Рост микромицета в данных условиях можно было назвать в большей степени поверхностным, чем твердофазным, поскольку слои поверхностного и воздушного мицелия значительно превышали по объему слой субстратного мицелия, ответственного за синтез внеклеточных ферментов.

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, ферментационной средой №1 с рН 7, при температуре $28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

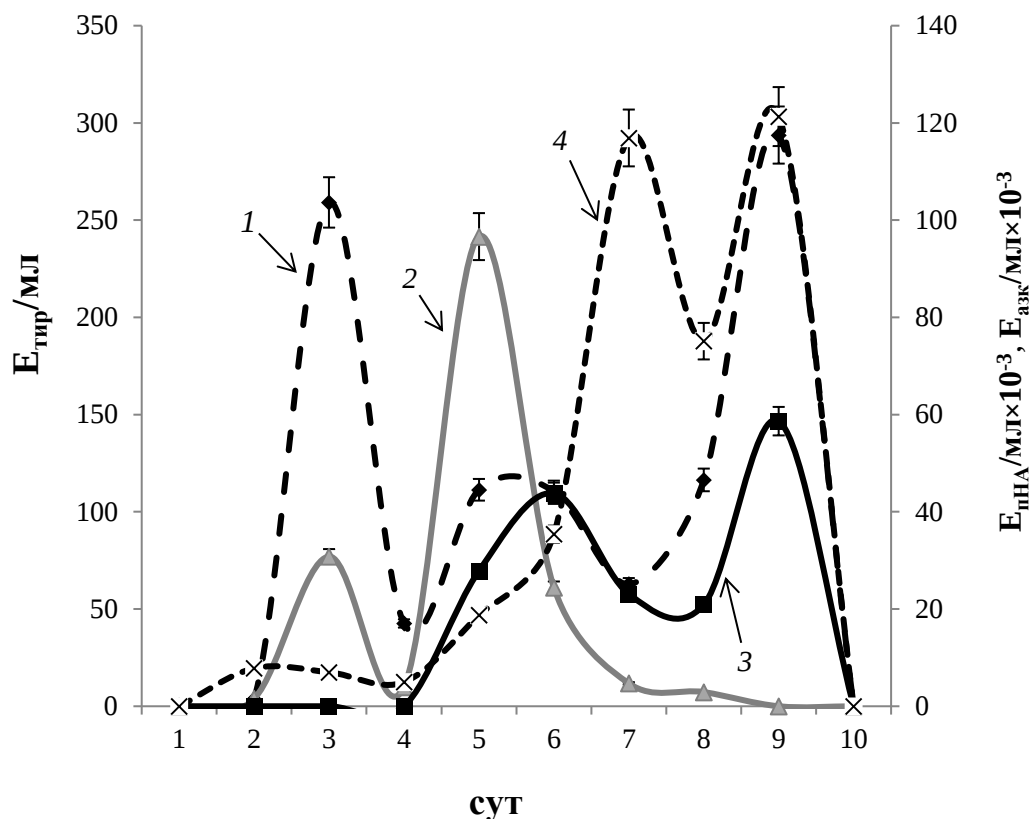


Рис. 26. Динамика накопления протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 в условиях ТФК с силикагелем в качестве носителя. 1 – казеинолитическая, 2 – фибринолитическая, 3 – эластинолитическая, 4 – коллагенолитическая активность.

5.4. Получение и разделение препаратов внеклеточных белков *A.ustus* 1, полученных в условиях глубинного и твердофазного культивирования

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. Культивирование проводили в соответствии с подобранными ранее

условиями: глубинное – на ферментационной среде №1, pH 7, 28 °С, твердофазное – с вермикулитом в качестве инертного носителя, ферментационной средой №1 с pH 7, при 28 °С. Препараты получали путем высаливания сульфатом аммония на 5 сутки культивирования как в случае глубинного, так и твердофазного культивирования.

Как видно из табл. 7, в процессе получения комплексного препарата внеклеточных белков микромицета, выращенного в условиях глубинного культивирования, было утеряно 23,8% общего белка, однако протеолитическая активность сохранялась.

Таблица 7.

Удельные общая протеолитическая и коллагенолитическая активности препаратов внеклеточных белков *A. ustus* 1, полученных в условиях глубинного и твердофазного культивирования.

Параметр	Глубинное культивирование		Твердофазное культивирование	
	Культуральная жидкость	Препарат протеиназ	Культуральная жидкость	Препарат протеиназ
Общий белок, мг/мл	13,5	10,3	18,4	13,8
Удельная общая протеолитическая активность, $E_{\text{тир}}$ /мг белка	4,8	5,6	32,2	33,9
Удельная коллагенолитическая активность, $E_{\text{азк}}$ /мг белка $\times 10^{-3}$	8,9	9,7	13,1	16,8

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.

Для разделения комплексных препаратов белков, образуемых микромицетом *A. ustus* 1, использовали метод изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в интервале рН амфолинов 2,5-10,0. В результате ИЭФ препарата белков, полученного после глубинного культивирования (рис. 27), было обнаружено, что фракции, обладающие максимальными значениями искомых типов активности – фибринолитической, коллагенолитической, казеинолитической и эластинолитической, сходили с колонки единым пиком и имели рI 4,5-4,7. Стоит отметить, что желтый пигмент, образуемый данным микромицетом, по-видимому, также белковой природы, он концентрировался в кислой области при рН 2,5-4,0. Аналогичным образом пигмент сходит с колонки и в результате ИЭФ препарата белков, полученных в результате твердофазного культивирования (рис. 28). Можно заметить, что результаты разделения обоих препаратов похожи, и для препарата, полученного после ТФК, наибольшие значения коллагенолитической, казеинолитической, фибринолитической и эластинолитической активности также были выявлены при рН 4,5-4,7, что говорит об образовании микромицетом *A. ustus* 1 протеиназ с соответствующей изоэлектрической точкой (рI 4,5-4,7).

Однако можно наблюдать и некоторые различия относительно других менее активных фракций, так, при разделении препарата, полученного после глубинного культивирования, обнаружено еще два пика, один концентрировался при рН 5,5. Данная фракция обладала коллагенолитической активностью, во второй фракции выявили присутствие протеиназы,

обладающей эластинолитической активностью, ее рI составил 6,5 – 6,7. В результате ИЭФ препарата, полученного после твердофазного культивирования, можно наблюдать большее количество областей концентрации активных фракций, чем в случае разделения препарата после глубинного культивирования. Так, помимо наиболее активной фракции, сходящей с колонки при рН 4,5 – 4,7, были обнаружены другие фракции, обладающие искомыми активностями: при рН 6,3 – 6,6 концентрировалась фракция, обладающая коллагенолитической, казеинолитической и эластинолитической активностью, при рН 7,5 – 7,8 фракция с коллагенолитической и эластинолитической активностью, а при рН 8,2 – 8,4 фракция, в которой обнаружили присутствие коллагенолитической протеиназы.

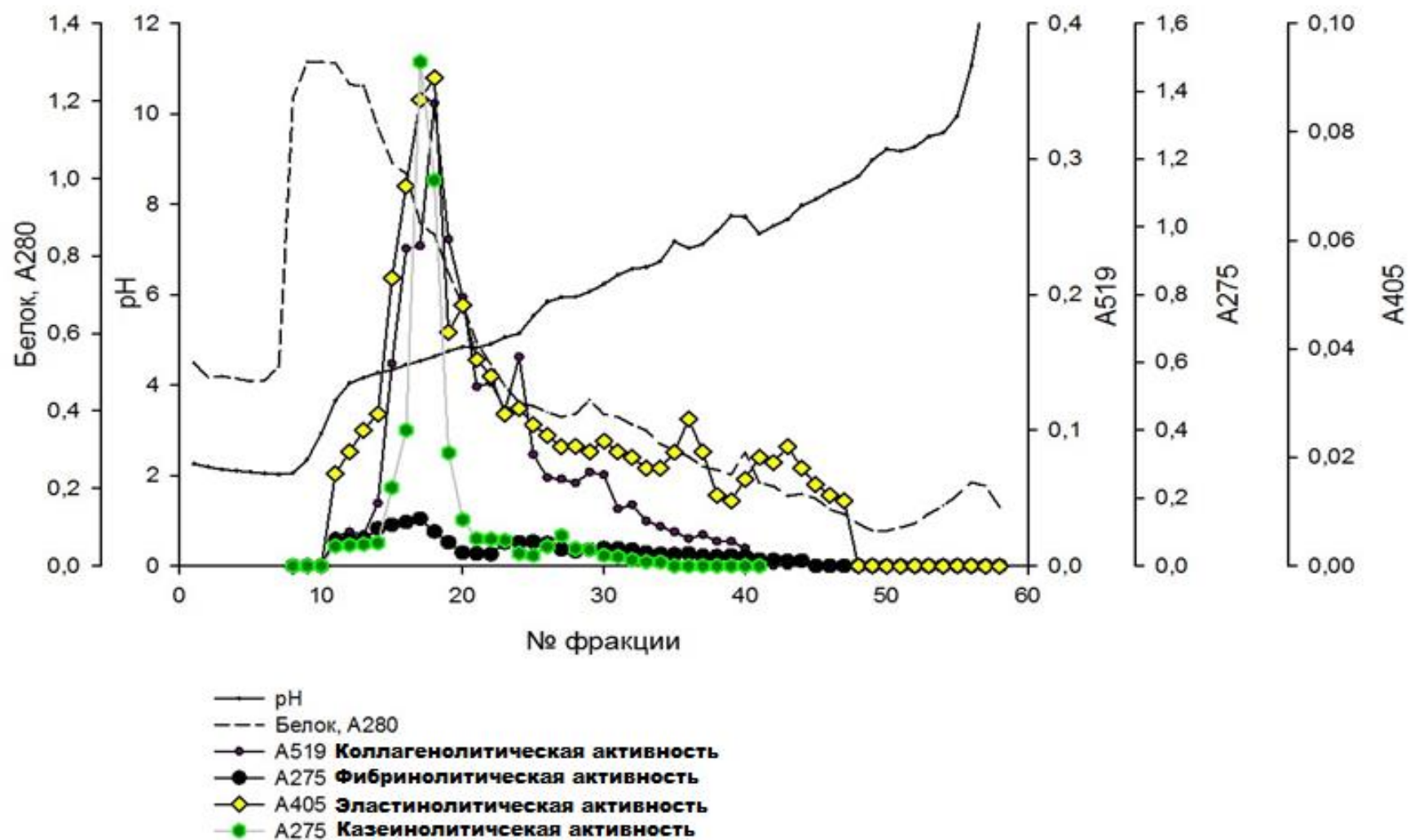


Рис 27. Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных белков культуральной жидкости *A. ustus* 1, выращенного в условиях глубокого культивирования.

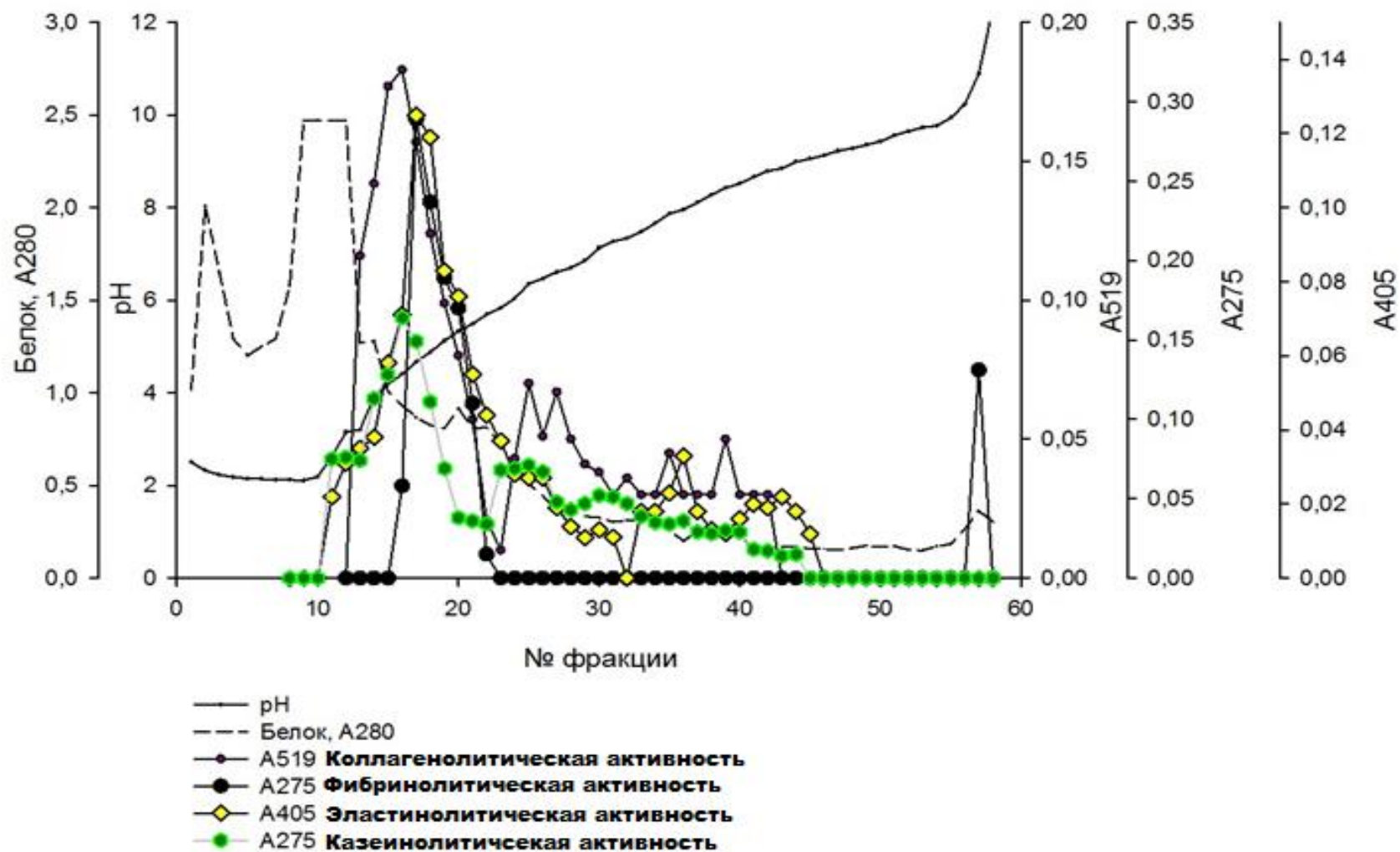


Рис. 28. Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных белков культуральной жидкости *A. ustus* 1, выращенного в условиях твердофазного культивирования.

5.5. Изучение свойств протеиназы *A. ustus* 1

5.5.1. Электрофоретический анализ протеиназы *A. ustus* 1

Наиболее активные фракции с pI 4,5-4,7, 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 (рис. 29), 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 наиболее активная фракция после ИЭФ комплексного препарата, полученного 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.

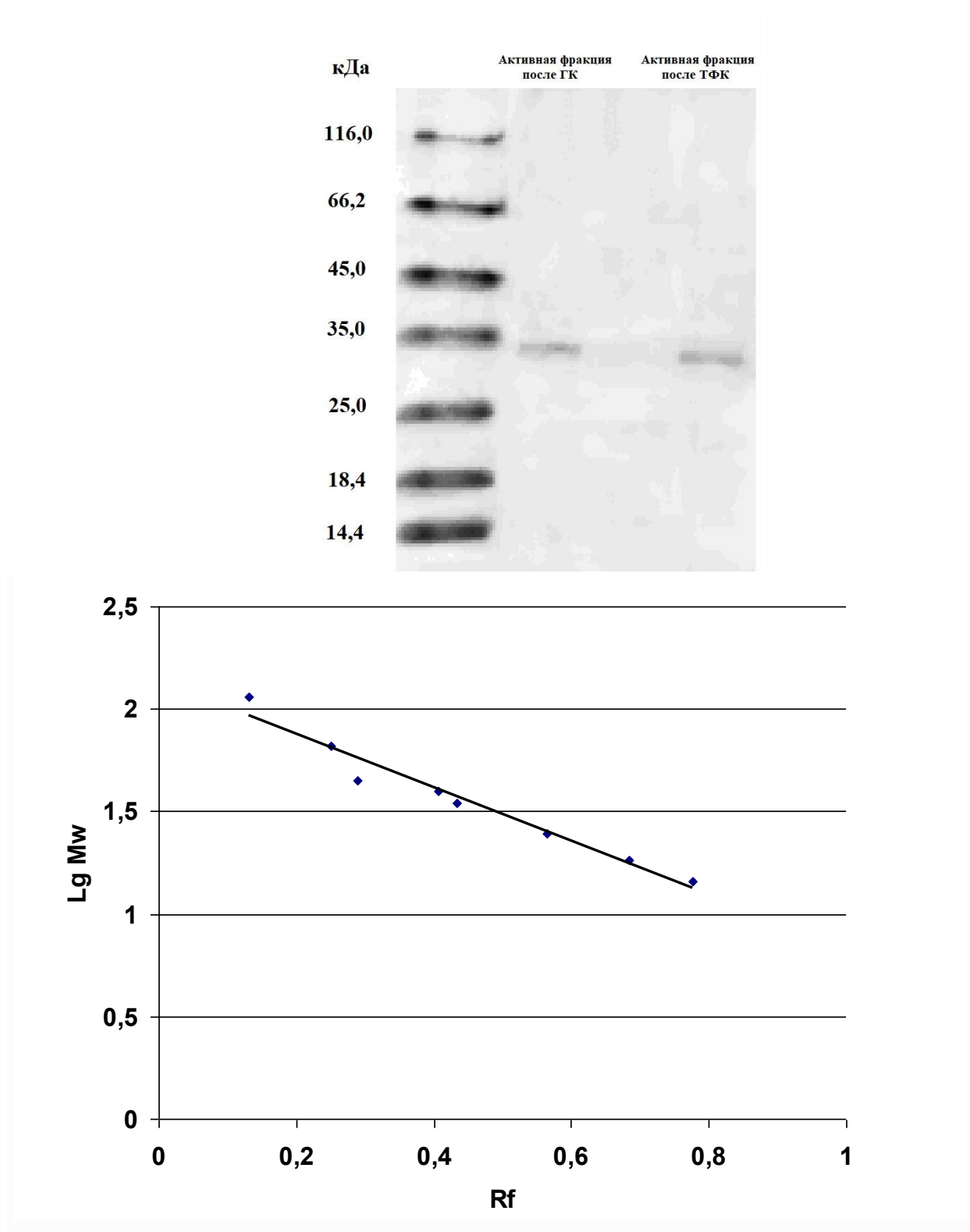


Рис. 29. Денатурирующий SDS – электрофорез по Лэммли активных фракций, полученных в результате изоэлектрофокусирования комплексных препаратов белков, образуемых *A. ustus* 1 в условиях глубинного и твердофазного культивирования, и определение молекулярных масс в полулогарифмических координатах.

5.5.2 Влияние ингибиторов протеолитических ферментов на активность протеиназы *A. ustus* 1

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 (табл. 8). 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.

Таблица 8.

Ингибиторный анализ внеклеточной протеиназы *A. ustus* 1.

Ингибитор	Молярное соотношение фермент:ингибитор	Остаточная активность, %
Контроль (без ингибитора)	-	100,0
ЭДТА	1:10	100,0
	1:100	100,0
<i>n</i> -ХМБ	1:10	100,0
	1:100	100,0
<i>o</i> -фенантролин	1:10	100,0
	1:100	100,0
PMSF	1:10	3,7
	1:100	4,0

5.5.3. Изучение физико-химических свойств протеиназы, образуемой микромицетом *A. ustus* 1

Было изучено влияние температуры реакции в диапазоне от 20 до 55 °С на коллагенолитическую активность, проявляемую протеиназой *A. ustus* 1 (рис. 30). Температурный оптимум данной протеиназы был выявлен при 41°С, активность выражали в процентах. Интересно, что более 80 % коллагенолитической активности сохраняется в достаточно широком диапазоне температур – от 39 до 55 °С.

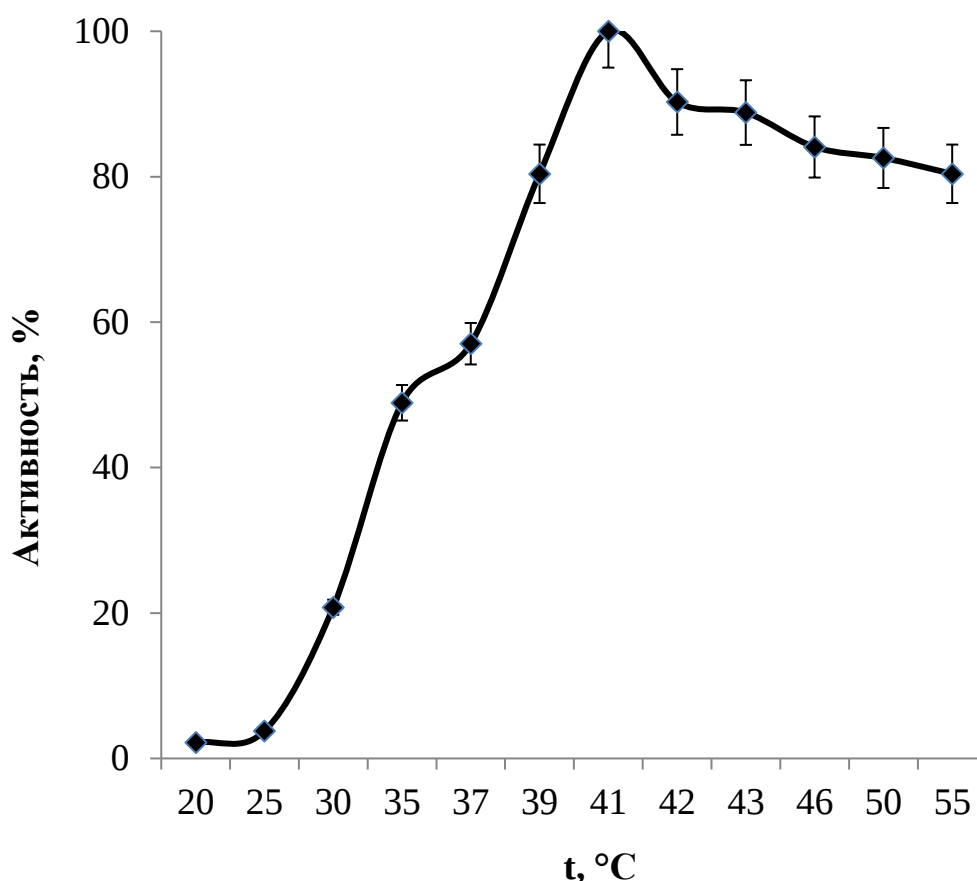


Рис. 30. Температурный оптимум активности протеиназы *A. ustus* 1

На рис. 31 отражено влияние температуры на стабильность протеиназы, образуемой *A. ustus* 1, активность выражена в процентах. Протеиназа сохраняет 100 % коллагенолитической активности при выдерживании в течение 2 часов при температуре от 24 до 45 °С. При более высоких температурах наблюдали резкое снижение активности, так, при 55 °С

активность составила 14,7 % от исходной. При 65 °С протеиназа полностью инактивировалась.

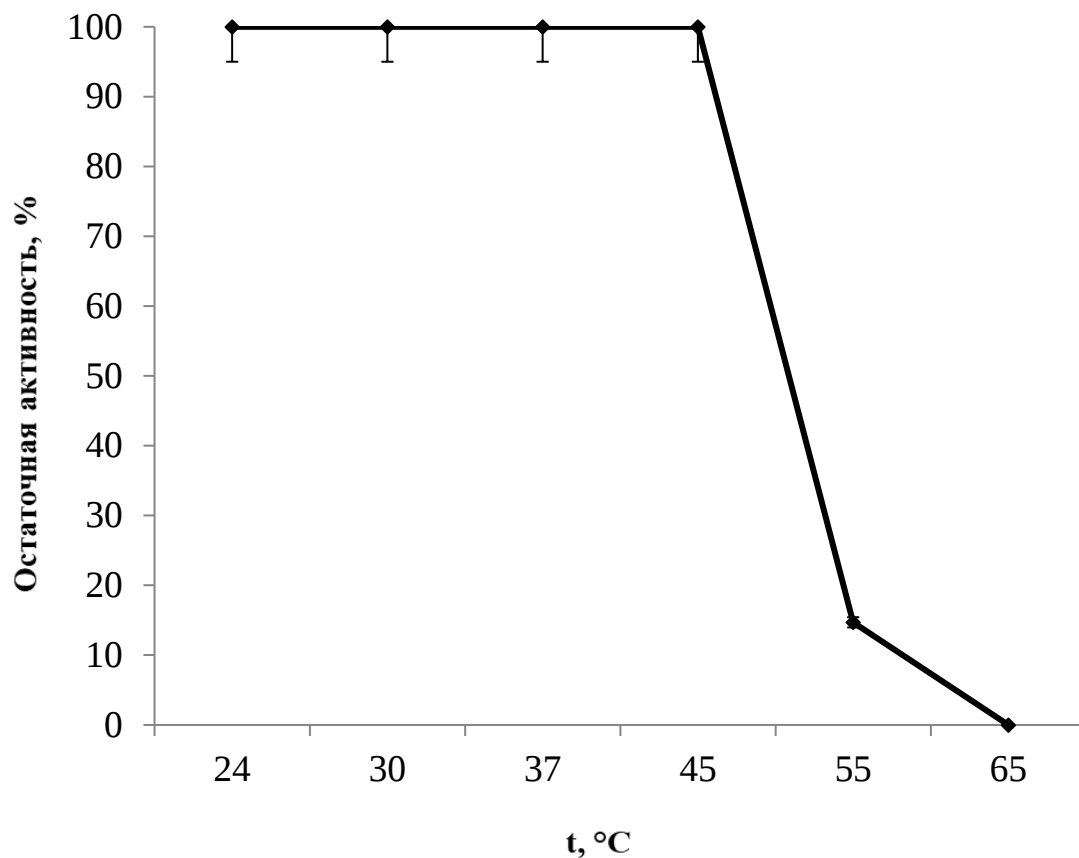


Рис. 31. Температурная стабильность активности протеиназы *A. ustus* 1

Изучение pH оптимума активности протеиназы *A. ustus* 1 (рис. 32) 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.

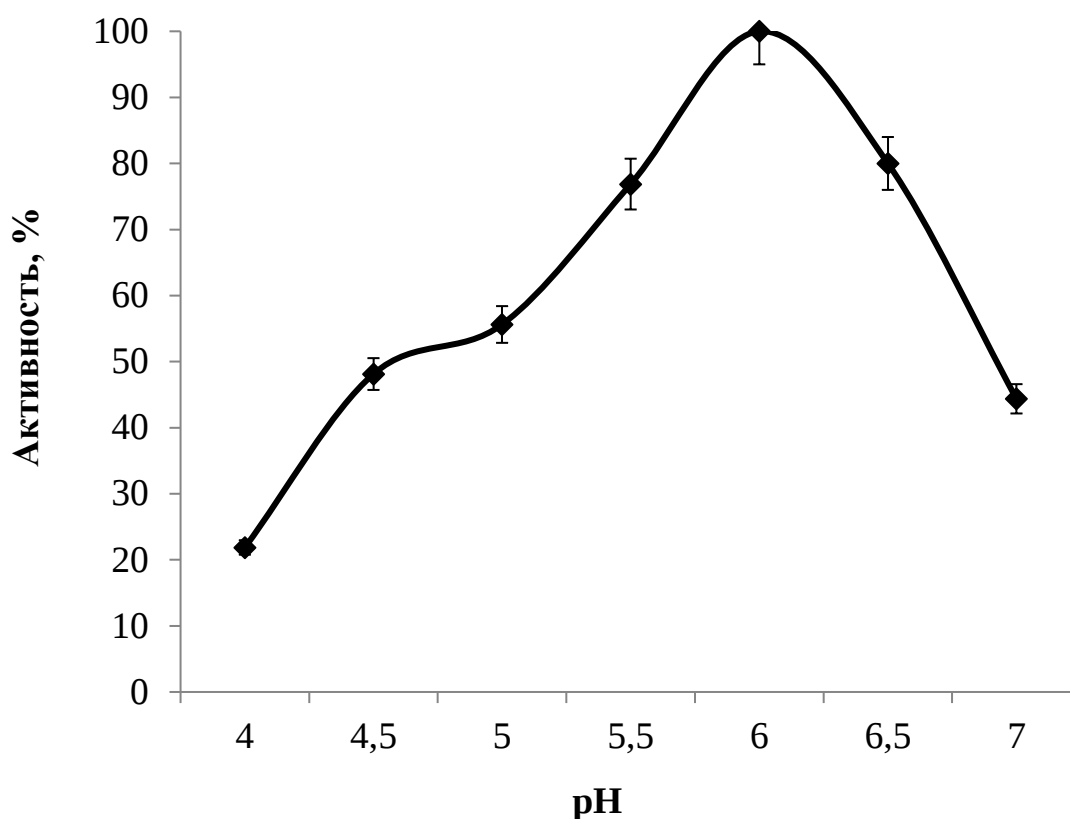


Рис. 32. pH оптимум активности протеиназы *A. ustus 1*

Также была изучена стабильность активности данной протеиназы в диапазоне pH от 4 до 10 (рис. 33). 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 (рис. 34). Было показано, что протеиназа, образуемая *A. ustus 1*, не гликозилирована. Гликозилирование – наиболее распространенная посттрансляционная модификация белков эукариот. Отсутствие такой модификации позволяет рассматривать потенциальную возможность клонирования и экспрессии гена, кодирующего образование протеиназы, в прокариотических клетках.

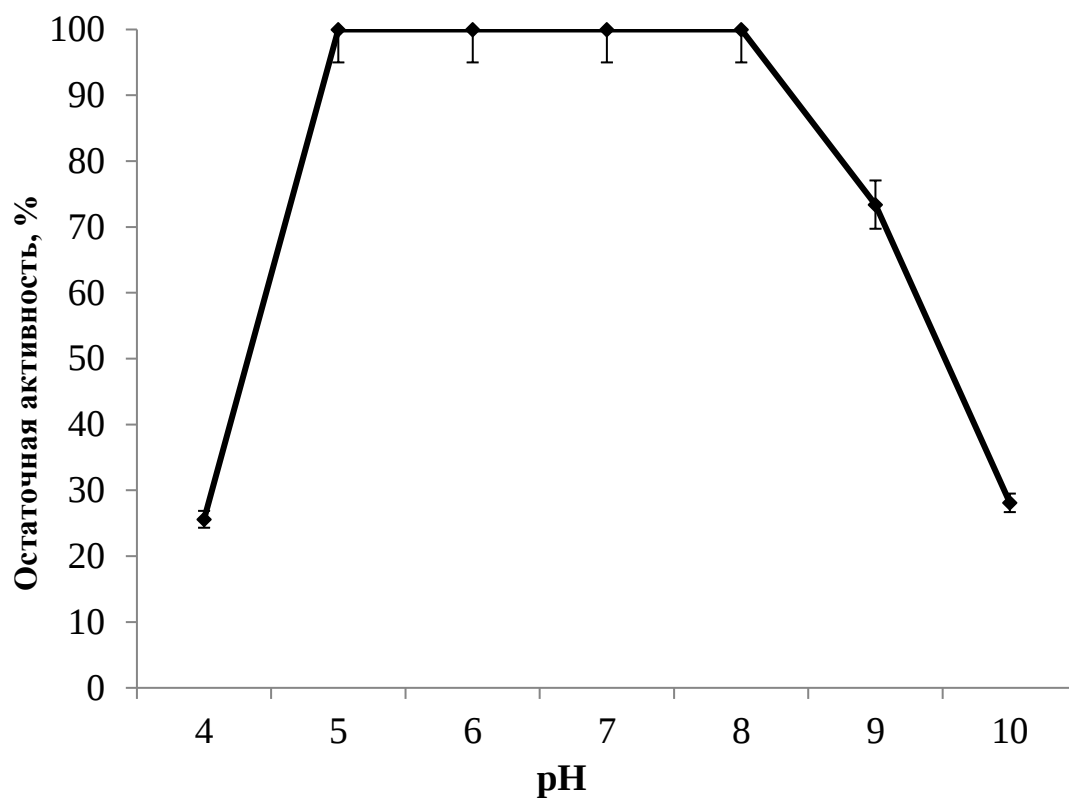


Рис. 33. pH стабильность активности протеиназы *A.ustus 1*

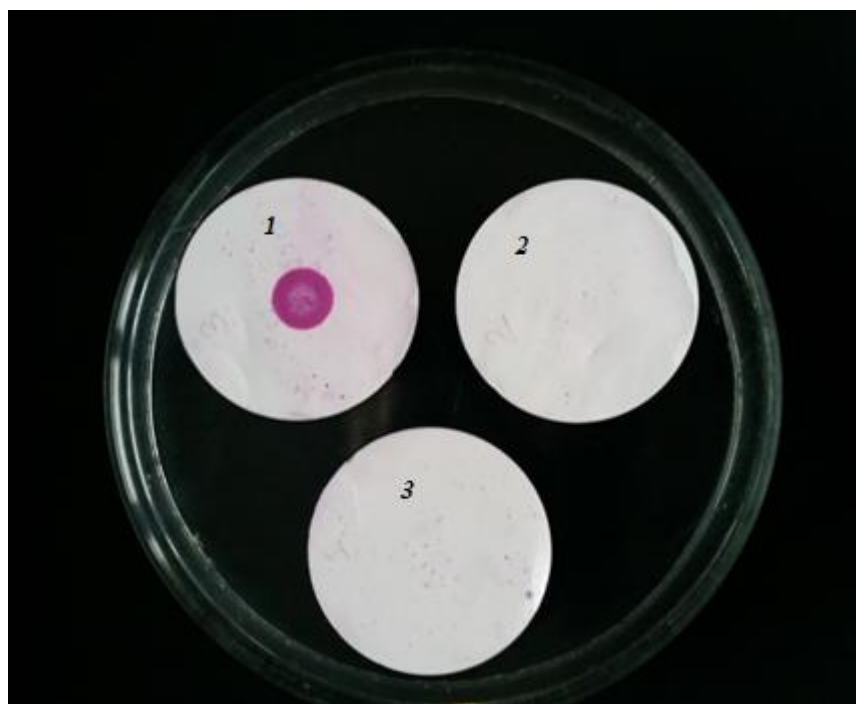


Рис. 34. Определение гликопротеинов с ШИК– реактивом методом дот-блоттинга протеиназы, образуемой микромицетом *A. ustus 1*, 1 – положительный контроль (инвертаза), 2 – отрицательный контроль (БСА), 3 – протеиназа *A. ustus 1*

5.5.4. Субстратная специфичность протеиназы, образуемой микромицетом *A.ustus* 1

Была изучена субстратная специфичность протеиназы (рис. 35), 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 С, тромбина, плазмина, тканевого активатора плазминогена, урокиназы, Ха фактора, трипсина. Наибольшие значения были получены в отношении субстрата тромбина – $29,9 \text{ E}_{\text{pNA}}/\text{мл} \times 10^{-3}$. Значения, полученные для хромогенных пептидных субстратов химо трипсина и трипсина, были менее $2 \text{ E}_{\text{pNA}}/\text{мл} \times 10^{-3}$. Интересно отметить, что наибольшую активность протеиназа проявляет к тем хромогенным субстратам, в составе которых имеются аминокислоты Gly и Arg.

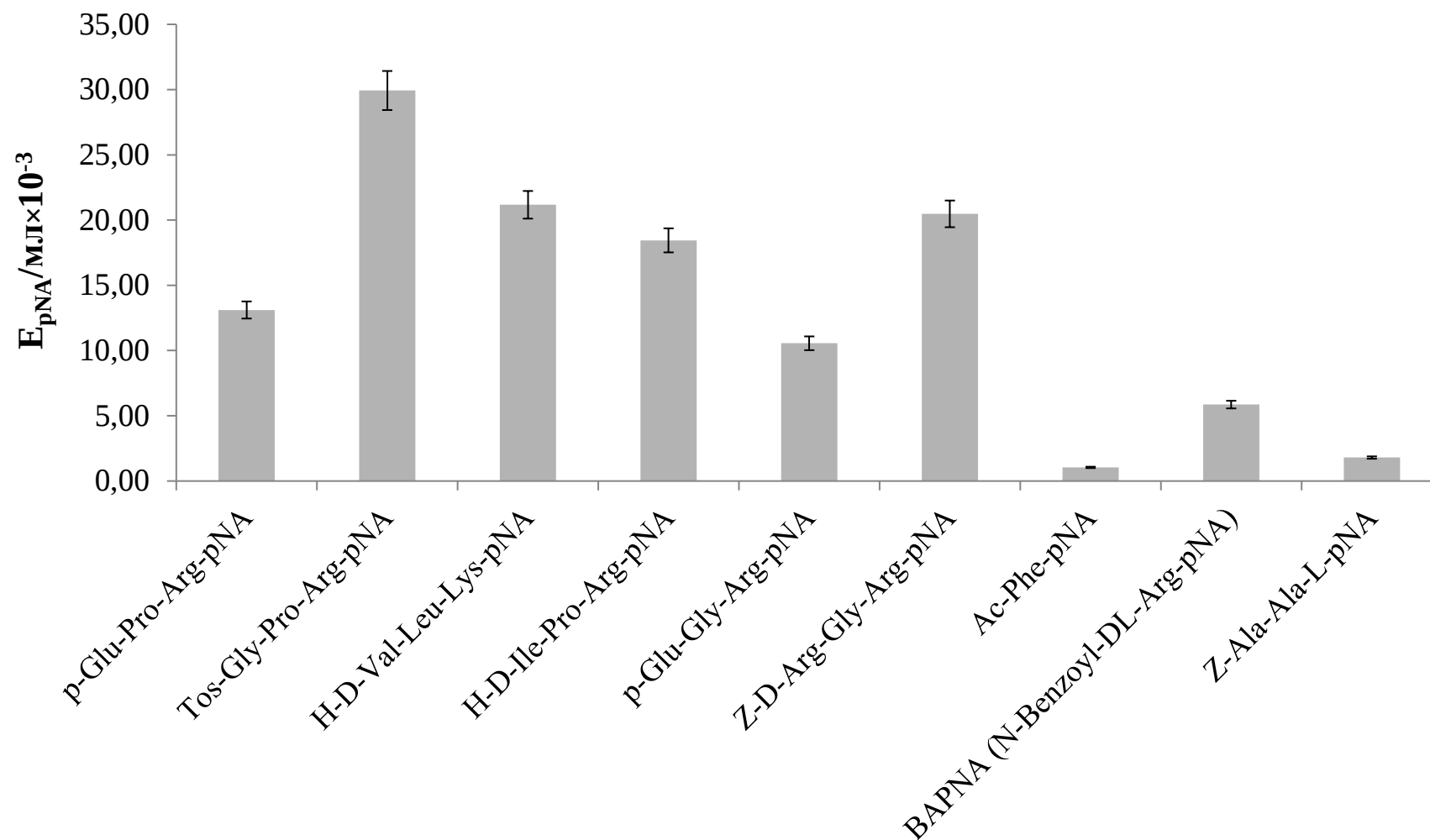


Рис. 35. Субстратная специфичность *A.ustus* 1 (с хромогенными субстратами)

Как видно из табл. 9 протеиназа, образуемая *A. ustus* 1, по своим физико-химическим характеристикам похожа на протеиназы, образуемые другими аспергиллами, однако отличается от них более широкой субстратной специфичностью и способностью к расщеплению таких субстратов, как фибрин и эластин. Такая особенность может быть востребована, например, при производстве белковых кормовых добавок, поскольку позволит снизить затраты на ферментативную обработку субстратов.

Таблица 9.

Сравнение свойств протеиназы, образуемой *A.ustus* 1, с данными других исследований.

Продуцент	рН и температурный оптимум работы протеиназы	pI	Молекулярная масса, кДа	Ингибиторы	Расщепляемые субстраты	Источник литературы
<i>Aspergillus oligospora</i>	рН 6,0-8,0; 45 °С	4,9	38	PMSF	Казеин и желатин	Minglian et al., 2004
<i>Lecanicillium psalliotae</i>	рН 10; 70 °С	Нет данных	32	PMSF, EDTA	Казеин, коллаген, БСА	Yang et al., 2005
<i>Aspergillus</i> sp. (UCP 1276)	рН 8,0; 40 °С	Нет данных	28,7	PMSF	Казеин, кератин	Ferreira et al., 2017
<i>Aspergillus ustus</i> 1	рН 6,0; 41 °С	4,5 - 4,7	33	PMSF	Казеин, коллаген, фибрин, эластин	Изучен в рамках данной работы

5.5.5. 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 10.

Таблица 10.

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 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. Перспективным для дальнейшего изучения кажется расширение спектра натуральных 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 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 ($41^{\circ} C$) и температурная стабильность работы протеиназы, образуемой *A. ustus* 1 (от 24 до $45^{\circ} C$).

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 NaNO_3 (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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аль-Нури М. А., Иваница В. А., Егоров Н. С. Биосинтез внеклеточных протеаз *Aspergillus candidus* при отсутствии источников углерода или серы // Микробиология. 1981. Т. 50, № 6. С. 1019-1023.
2. Батомункуева Б. П., Егоров Н. С. Выделение, очистка и разделение комплексного препарата внеклеточных протеиназ *Aspergillus ochraceus* с фибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Микробиология. 2001. Т. 70, № 5. С. 602-606.
3. Демина Н. С., Лысенко С. В. Коллагенолитические ферменты, синтезируемые микроорганизмами // Микробиология. 1996. Т. 65, № 3. С. 293-304.
4. Дунаевский Я. Е., Белякова Г. А., Павлюкова Е. Б., Белозерский М.А. Влияние условий культивирования на образование протеаз грибами *Alternaria alternata* и *Fusarium oxysporum* // Микробиология. 1995. Т. 64, № 3. С. 327-330.
5. Егоров Н. С., Ландау Н. С. Влияние различных концентраций глицерина и источников азота на биосинтез фибринолитического вещества культурой *Aspergillus oryzae* штамм МГУ // Прикладная Биохимия и Микробиология. 1965. Т. 1. № 1, С. 487-493.
6. Егоров Н. С., Лория Ж. К., Ландау Н. С. Протеолитические ферменты микроорганизмов в связи с их фибринолитической и коагулазной активностью / Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М.: Наука. 1979. С.146-196.
7. Звонарёва Е. С., Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Баранова Н.А., Котова И. Б., Егоров Н. С. Продукция протеиназ с плазминоподобной и активирующей прекаллекреин активностью микромицетом *Aspergillus terreus* // Прикладная Биохимия и Микробиология. 2018. Т. 54, № 2. С. 195-200.
8. Ландау Н. С., Егоров Н. С. Образование фибринолитического агента *Aspergillus oryzae* штамм МГУ при развитии в глубинных условиях на

синтетической среде // Научные Доклады Высшей Школы. 1965. Т. 3. С. 168-172.

9. Ландау Н. С., Кураков А. В., Гуликова О. М., Батомункуева Б. П., Струкова С. М., Егоров Н. С. Экстрацеллюлярные протеиназы микромицетов с фибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Микробиология. 1998. Т. 67, № 2. С. 215-220.

10. Осмоловский А. А., Кураков А. В., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. Способность внеклеточных протеиназ микромицетов *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus sydowii* воздействовать на белки системы гемостаза человека // Вестник Московского Университета. Биология. 2017. Т. 72, № 1. С. 24-28.

11. Отрошко Т. А., Ключковская В. В., Егоров Н. С. Изучение протеолитической системы *Aspergillus ochraceus* в связи с плазмокоагулирующей и фибринолитической активностями // Микробиология. 1979. Т. 58, № 4. С. 645-651.

12. Павлюкова Е. Б., Белозерский М. А., Дунаевский Я. Е. Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов // Биохимия. 1998. Т. 63, № 8. С. 1059-1089.

13. Северин Е. С. Биохимия: Учеб. для вузов. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2003. 779 с.

14. Шаркова Т. С., Кураков А. В., Осмоловский А. А., Матвеева Э. О., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. С. Скрининг продуцентов протеиназ с фибринолитической и коллагенолитической активностями среди микромицетов // Микробиология. 2015. Т. 84, № 3. С. 316-322.

15. Acuña-Argüelles M., Gutierrez-Rojas M., Viniegra-González G., Favela-Torres E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation // Applied Microbiology and Biotechnology. 1995. V. 43, № 5. P. 808-814.

16. Adhikari A. S., Glassey E., Dunn A. R. Conformational dynamics accompanying the proteolytic degradation of trimeric collagen I by collagenases //

Journal of the American Chemical Society. 2012. V. 134, № 32. P. 13259-13265.

17. Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis // *Process Biochemistry*. 2004. V. 39, № 8. P. 977-981.

18. Agrebi R., Haddar A., Hmidet N., Jellouli K., Manni L., Nasri M. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization // *Process Biochemistry*. 2009. V. 44, № 11. P. 1252-1259.

19. Anson M. Crystalline carboxypolypeptidase // *Science*. 1935. V. 81, № 2106. P. 467-468.

20. Arana-Cuenca A., Tovar-Jiménez X., Favela-Torres E., Perraud-Gaime I., González-Becerra A. E., Martínez A., Moss-Acosta C. L., Mercado-Flores Y., Téllez-Jurado A. Use of water hyacinth as a substrate for the production of filamentous fungal hydrolytic enzymes in solid-state fermentation // *3 Biotech*. 2019. V. 9, № 1. P. 21-30.

21. Asano K., Kamei K., Hebisawa A. Allergic bronchopulmonary mycosis–pathophysiology, histology, diagnosis, and treatment // *Asia Pacific Allergy*. 2018. V. 8, № 3. P. e24

22. Baehaki A., Suhartono M. T., Syah D., Sitanggang A. B., Setyahadi S., Meinhardt F. Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11. 4 // *African Journal of Microbiology Research*. 2012. V. 6, № 10. P. 2373-2379.

23. Bailey K., Astbury W., Rudall K. Fibrinogen and fibrin as members of the keratin-myosin group // *Nature*. 1943. V. 151, № 3843. P. 716-717.

24. Balo J., Banga I. The elastolytic activity of pancreatic extracts // *Biochemical Journal*. 1950. V. 46, № 4. P. 384-387.

25. Baños J. G., Tomasini A., Szakács G., Barrios-González J. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: an artificial inert support // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009. V. 108, № 2. P. 105-110.

26. Barrios-González J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications // *Process Biochemistry*. 2012. V. 47, № 2. P. 175-185.
27. Battaglino R. A., Huergo M., Pilosof A., Bartholomai G. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1991. V. 35, № 3. P. 292-296.
28. Beg Q. K., Gupta R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis* // *Enzyme and Microbial Technology*. 2003. V. 32, № 2. P. 294-304.
29. Bella J., Eaton M., Brodsky B., Berman H. M. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution // *Science*. 1994. V. 266, № 5182. P. 75-81.
30. Berisio R., Vitagliano L., Mazzarella L., Zagari A. Crystal structure of the collagen triple helix model [(Pro-Pro-Gly) 10] 3 // *Protein Science*. 2002. V. 11, № 2. P. 262-270.
31. Beynon R. J., Bond J. S. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, 2001. Second Edition. 320 p.
32. Bhagwat P. K., Dandge P. B. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2016. V. 7. P. 234-240.
33. Bhagwat P. K., Dandge P. B. Collagen and collagenolytic proteases: A review // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018. V. 15. P. 43-55.
34. Boer C. G., Peralta R. M. Production of extracellular protease by *Aspergillus tamarii* // *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*. 2000. V. 40, № 2. P. 75-81.
35. Bond M. D., Van Wart H. E. Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum* // *Biochemistry*. 1984. V. 23, № 13. P. 3085-3091.

36. Brazel D., Oberbäumer I., Dieringer H., Babel W., Glanville R. W., Deutzmann R., Kühn K. Completion of the amino acid sequence of the $\alpha 1$ chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 non-triplet interruptions located within the collagenous domain // *European Journal of Biochemistry*. 1987. V. 168, № 3. P. 529-536.
37. Brüggemann H., Bäumer S., Fricke W. F., Wiezer A., Liesegang H., Decker I., Herzberg C., Martinez-Arias R., Merkl R., Henne A. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. V. 100, № 3. P. 1316-1321.
38. Buret A., Cripps A. W. The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa*. Relevance for cystic fibrosis // *The American Review of Respiratory Disease*. 1993. V. 148, № 3. P. 793-805.
39. Chandel, A. K., Rudravaram, R., Rao, L. V., Ravindra, P., Narasu, M. L. Industrial enzymes in bioindustrial sector development: an Indian perspective // *Journal of Commercial Biotechnology*. 2007. V. 13, № 4. P. 283-291.
40. Chavira Jr. R., Burnett T. J., Hageman J. H. Assaying proteinases with azocoll // *Analytical Biochemistry*. 1984. V. 136, № 2. P. 446-450.
41. Chen N. C., Srinivasan R. C., Shauver M. J., Chung K. C. A systematic review of outcomes of fasciotomy, aponeurotomy, and collagenase treatments for Dupuytren's contracture // *Hand*. 2011. V. 6, № 3. P. 250-255.
42. Chu K. H. Collagenase chemonucleolysis via epidural injection. A review of 252 cases // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1987. № 215. P. 99-104.
43. Cirulis J. T., Bellingham C. M., Davis E. C., Hubmacher D., Reinhardt D. P., Mecham R. P., Keeley F. W. Fibrillins, fibulins, and matrix-associated glycoprotein modulate the kinetics and morphology of in vitro self-assembly of a recombinant elastin-like polypeptide // *Biochemistry*. 2008. V. 47, № 47. P. 12601-12613.
44. Clark D. J., Hawrylik S. J., Kavanagh E., Opheim D. J. Purification and characterization of a unique alkaline elastase from *Micrococcus luteus* // *Protein*

Expression and Purification. 2000. V. 18, № 1. P. 46-55.

45. Collen D., Lijnen H. Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential? // *Blood*. 1994. V. 84, № 3. P. 680-686.

46. Collen D., Lijnen H. R. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004. V. 2, № 4. P. 541-546.

47. Costa J. A., Treichel H., Kumar V., Pandey A. *Advances in Solid-State Fermentation / Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. 2018. P. 1-17.

48. Couri S., da Costa Terzi S., Pinto G. A. S., Freitas S. P., da Costa A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8 // *Process Biochemistry*. 2000. V. 36, № 3. P. 255-261.

49. Davis B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1964. V. 121, № 2. P. 404-427.

50. Davis E. C. Stability of elastin in the developing mouse aorta: a quantitative radioautographic study // *Histochemistry*. 1993. V. 100, № 1. P. 17-26.

51. Di Lullo G. A., Sweeney S. M., Körkkö J., Ala-Kokko L., San Antonio J. D. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. V. 277, № 6. P. 4223-4231.

52. Duffy M. J. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies // *Clinical Chemistry*. 2002. V. 48, № 8. P. 1194-1197.

53. Dulon S., Leduc D., Cottrell G. S., D'Alayer J., Hansen K. K., Bunnett N. W., Hollenberg M. D., Pidar D., Chignard M. *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2005. V. 32, № 5. P. 411-9.

54. Eckhard U., Schönauer E., Ducka P., Briza P., Nüss D., Brandstetter H.

Biochemical characterization of the catalytic domains of three different Clostridial collagenases // *Biological Chemistry*. 2009. V. 390, № 1. P. 11-18.

55. Eiler H., Hopkins F. Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cows // *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1993. V. 203, № 3. P. 436-443.

56. El-Aassar S., El-Badry H., Abdel-Fattah A. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1990. V. 33, № 1. P. 26-30.

57. Erdevé O., Atasay B., Arsan S. Collagenase application for amputation in a preterm // *Pediatric Dermatology*. 2007. V. 24, № 2. P. 195-196.

58. Fernández-Lahore H. M., Fraile E. R., Cascone O. Acid protease recovery from a solid-state fermentation system // *Journal of Biotechnology*. 1998. V. 62, № 2. P. 83-93.

59. Ferreira, C. M. O., Correia, P. C., Brandão-Costa, R. M. P., Albuquerque, W. W. C., Lin Liu, T. P. S., Campos-Takaki, G. M., Porto, A. L. F. Collagenase produced from *Aspergillus sp.*(UCP 1276) using chicken feather industrial residue // *Biomedical Chromatography*. 2017. V. 31, №. 5. P. e3882.

60. Frosco M., Chase T., Macmillan J. D. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus* // *Infection and Immunity*. 1992. V. 60, № 3. P. 728-734.

61. Geisseler D., Horwath W. R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon // *Soil Biology and Biochemistry*. 2008. V. 40, №. 12. P. 3040-3048.

62. Germano S., Pandey A., Osaku C. A., Rocha S. N., Soccol C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation // *Enzyme and Microbial technology*. 2003. V. 32, № 2. P. 246-251.

63. Gomes E., da Silva R., de Cassia Pereira J., Ladino-Orjuela G. Fungal Growth on Solid Substrates: A Physiological Overview / *Current Developments in*

Biotechnology and Bioengineering. Elsevier. 2018. P. 31-56.

64. Gordon M. K., Hahn R. A. Collagens // Cell and Tissue Research. 2010. V. 339, № 1. P. 247-257.

65. Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K. Crystalline bacterial proteinase // The Journal of Biochemistry. 1958. V. 45, № 3. P. 185-194.

66. Haki G., Rakshit S. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review // Bioresource Technology. 2003. V. 89, № 1. P. 17-34.

67. Hata Y., Ishida H., Ichikawa E., Kawato A., Suginami K., Imayasu S. Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae* // Gene. 1998. V. 207, № 2. P. 127-134.

68. Hata Y., Ishida H., Kojima Y., Ichikawa E., Kawato A., Suginami K., Imayasu S. Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and in submerged culture // Journal of Fermentation and Bioengineering. 1997. V. 84, № 6. P. 532-537.

69. Hensel M., Tang C. M., Arst Jr H. N., Holden D. W. Regulation of fungal extracellular proteases and their role in mammalian pathogenesis // Canadian Journal of Botany. 1995. V. 73, № S1. P. 1065-1070.

70. Hölker U., Höfer M., Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi // Applied Microbiology and Biotechnology. 2004. V. 64, № 2. P. 175-186.

71. Hossain M. T., Das F., Marzan L., Rahman M. S., Anwar M. Some properties of protease of the fungal strain *Aspergillus flavus* // International Journal of Agriculture and Biology. 2006. V. 8, № 2. P. 162-164.

72. Hu Y., Yu D., Wang Z., Hou J., Tyagi R., Liang Y., Hu Y. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food // Scientific Reports. 2019. V. 9, № 1. P. 9235.

73. Ikasari L., Mitchell D. Protease production by *Rhizopus oligosporus* in

solid-state fermentation // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1994. V. 10, № 3. P. 320-324.

74. Ishida H., Hata Y., Ichikawa E., Kawato A., Suginami K., Imayasu S. Regulation of the glucoamylase-encoding gene (*glaB*), expressed in solid-state culture (koji) of *Aspergillus oryzae* // Journal of Fermentation and Bioengineering. 1998. V. 86, № 3. P. 301-307.

75. Itoi Y., Horinaka M., Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K. Characteristic features in the structure and collagen-binding ability of a thermophilic collagenolytic protease from the thermophile *Geobacillus collagenovorans* MO-1 // Journal of Bacteriology. 2006. V. 188, № 18. P. 6572-6579.

76. Jacquot J., Tournier J.-M., Puchelle E. In vitro evidence that human airway lysozyme is cleaved and inactivated by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and not by human leukocyte elastase // Infection and Immunity. 1985. V. 47, № 2. P. 555-560.

77. Janda J. M., Abbott S. L., Khashe S. Identification and initial characterization of elastase activity associated with *Vibrio cholerae* // Current Microbiology. 1999. V. 39, № 2. P. 73-78.

78. Jarai G., Buxton F. Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger* // Current Genetics. 1994. V. 26, № 3. P. 238-244.

79. Jin B., Alter H. J., Zhang Z.-C., Shih J. W.-K., Esteban J. M., Sun T., Yang Y.-S., Qiu Q., Liu X.-L., Yao L. Reversibility of experimental rabbit liver cirrhosis by portal collagenase administration // Laboratory Investigation. 2005. V. 85, № 8. P. 992-1002.

80. Jordan G. H. The use of intralesional clostridial collagenase injection therapy for Peyronie's disease: a prospective, single-center, non-placebo-controlled study // The Journal of Sexual Medicine. 2008. V. 5, № 1. P. 180-187.

81. Kagan H. M., Sullivan K. A. Lysyl oxidase: Preparation and role in elastin biosynthesis / Methods in Enzymology. Elsevier. 1982. P. 637-650.

82. Kessler E., Safrin M., Abrams W. R., Rosenbloom J., Ohman D. E. Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA // Journal of Biological Chemistry. 1997. V. 272, № 15. P. 9884-9889.
83. Kim M., Hamilton S. E., Guddat L. W., Overall C. M. Plant collagenase: unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2007. V. 1770, № 12. P. 1627-1635.
84. Kim S. H., Choi N. S. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2000. V. 64, № 8. P. 1722-1725.
85. Kotb E., Helal G. E. D. A., Edries F. M. Screening for fibrinolytic filamentous fungi and enzymatic properties of the most potent producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735 // Biologia. 2015. V. 70, № 12. P. 1565-1574.
86. Kranthi V., Rao D. M., Jaganmohan P. Production of protease by *Aspergillus flavus* through solid state fermentation using different oil seed cakes // International Journal of Microbiological Research. 2012. V. 3, № 1. P. 12-15.
87. Kučera M. The production of toxic protease by the entomopathogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture // Journal of Invertebrate Pathology. 1981. V. 38. №. 1. P. 33-38.
88. Kumar C. G., Takagi H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint // Biotechnology advances. 1999. V. 17. №. 7. P. 561-594.
89. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227, № 5259. P. 680-685.
90. Levene P. The cleavage products of proteoses // Journal of Biological Chemistry. 1905. V. 1, № 1. P. 45-58.
91. Liu X., Zhao Y., Gao J., Pawlyk B., Starcher B., Spencer J. A., Yanagisawa H., Zuo J., Li T. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein // Nature Genetics. 2004. V. 36, № 2. P. 178-182.
92. Lizardi-Jiménez M. A., Hernández-Martínez R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass // 3 Biotech. 2017. V.

7, №. 1. P. 44:1-9.

93. Macchione M. M., Merheb C. W., Gomes E., Da Silva R. Protease production by different thermophilic fungi // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2008. V. 146, № 1-3. P. 223-230.

94. Machado R., Da Costa A., Sencadas V., Garcia-Arévalo C., Costa C. M., Padrao J., Gomes A., Lanceros-Méndez S., Rodríguez-Cabello J. C., Casal M. Electrospun silk-elastin-like fibre mats for tissue engineering applications // Biomedical Materials. 2013. V. 8, № 6. P. 065009.

95. Maeda H., Yamamoto T. Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections // Biological Chemistry Hoppe-Seyler. 1996. V. 377, № 4. P. 217-226.

96. Malathi S., Chakraborty R. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent // Appl. Environ. Microbiol. 1991. V. 57, № 3. P. 712-716.

97. Mandl I., MacLennan J. D., Howes E. L., DeBellis R. H., Sohler A. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. histolyticum* // The Journal of Clinical Investigation. 1953. V. 32, № 12. P. 1323-1329.

98. Mandl I., Zipper H., Ferguson L. *Clostridium histolyticum* collagenase: its purification and properties // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1958. V. 74, № 2. P. 465-475.

99. Mariencheck W. I., Alcorn J. F., Palmer S. M., Wright J. R. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D // American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2003. V. 28, № 4. P. 528-537.

100. Martínez-Medina G. A., Barragán A. P., Ruiz H. A., Ilyina A., Hernández J. L. M., Rodríguez-Jasso R. M., Hoyos-Concha J. L., Aguilar-González C. N. Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry / Enzymes in Food Biotechnology. Elsevier. 2019. P. 221-246.

101. Matsushita O., Jung C.-M., Katayama S., Minami J., Takahashi Y., Okabe A. Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum* // Journal of Bacteriology. 1999. V. 181, № 3. P. 923-933.

102. Matsushita O., Yoshihara K., Katayama S., Minami J., Okabe A. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene // Journal of Bacteriology. 1994. V. 176, № 1. P. 149-156.
103. Mehta P. K., Sehgal S. Microbial Enzymes in Food Processing / Biocatalysis. Springer. 2019. P. 255-275.
104. Merheb C. W., Cabral H., Gomes E., Da-Silva R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein // Food Chemistry. 2007. V. 104, № 1. P. 127-131.
105. Merheb-Dini C., Gomes E., Boscolo M., da Silva R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31:(Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31) // Food Chemistry. 2010. V. 120, № 1. P. 87-93.
106. Mikhailova R. Proteolytic enzymes of mycelial fungi // Microbiology And Biotechnology 2011. № 3. P. 47-61.
107. Minglian Z., Minghe M., Keqin Z. Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* // Mycologia. 2004. V. 96, № 1. P. 16-22.
108. Mitchell D. A., Krieger N. Solid-State Cultivation Bioreactors / Essentials in Fermentation Technology. Springer. 2019. P. 105-133.
109. Morihara K., Tsuzuki H. Production of protease and elastase by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients // Infection and Immunity. 1977. V. 15, № 3. P. 679-685.
110. Morihara K., Tsuzuki H., Oka T., Inoue H., Ebata M. *Pseudomonas aeruginosa* elastase isolation, crystallization, and preliminary characterization // Journal of Biological Chemistry. 1965. V. 240, № 8. P. 3295-3304.
111. Muiznieks L. D., Weiss A. S., Keeley F. W. Structural disorder and dynamics of elastin // Biochemistry and Cell Biology. 2010. V. 88, № 2. P. 239-

112. Müller W. E. The origin of metazoan complexity: *Porifera* as integrated animals // Integrative and Comparative Biology. 2003. V. 43, № 1. P. 3-10.

113. Noblesse E., Cenizo V., Bouez C., Borel A., Gleyzal C., Peyrol S., Jacob M.-P., Sommer P., Damour O. Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers // Journal of Investigative Dermatology. 2004. V. 122, № 3. P. 621-630.

114. O'Donnell D., Wang L., Xu J., Ridgway D., Gu T., Moo-Young M. Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity // Biochemical Engineering Journal. 2001. V. 8, № 3. P. 187-193.

115. Ogawa A., Yasuhara A., Tanaka T., Sakiyama T., Nakanishi K. Production of neutral protease by membrane-surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* IAM2704 // Journal of Fermentation and Bioengineering. 1995. V. 80, № 1. P. 35-40.

116. Oostra J., Le Comte E., Van den Heuvel J., Tramper J., Rinzema A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation // Biotechnology and Bioengineering. 2001. V. 75, № 1. P. 13-24.

117. Ozaki H., Shiio I. Purification and properties of elastolytic enzyme from *Flavobacterium immotum* // The Journal of Biochemistry. 1975. V. 77, № 1. P. 171-180.

118. Pal G. K., Suresh P. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition // RSC Advances. 2016. V. 6, № 40. P. 33763-33780.

119. Palsaniya P., Mishra R., Beejawat N., Sethi S., Gupta B. L. Optimization of alkaline protease production from bacteria isolated from soil // Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2012. V. 2, № 6. P. 695-701.

120. Pandey A. Solid-state fermentation // Biochemical Engineering Journal.

2003. V. 13, № 2-3. P. 81-84.

121. Parmely M., Gale A., Clabaugh M., Horvat R., Zhou W.-W. Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa* // Infection and Immunity. 1990. V. 58, № 9. P. 3009-3014.

122. Pati F., Adhikari B., Dhara S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability // Bioresource Technology. 2010. V. 101, № 10. P. 3737-3742.

123. Pelley J. W. Elsevier's Integrated Review Biochemistry E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences, 2011. 238 p.

124. Peng Y., Zhang Y. Cloning and expression in *E. coli* of coding sequence of the douchi fibrinolytic enzyme mature peptide from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 // Chinese Journal of Applied and Environmental Biology. 2002. V. 8, № 3. P. 285-289.

125. Peters J. E., Galloway D. R. Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity // Journal of Bacteriology. 1990. V. 172, № 5. P. 2236-2240.

126. Raaij M. J., Mitraki A. Natural fibrous proteins: Structural analysis, assembly, and applications / Proteins in Solution and at Interfaces: Methods and Applications in Biotechnology and Materials. Science. 2013. P. 219-232.

127. Raghavarao K., Ranganathan T., Karanth N. Some engineering aspects of solid-state fermentation // Biochemical Engineering Journal. 2003. V. 13, № 2-3. P. 127-135.

128. Ramachandran G., Kartha G. Structure of collagen // Nature. 1955. V. 176, № 4482. P. 593-595.

129. Ramshaw J. A., Shah N. K., Brodsky B. Gly-XY tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides // Journal of Structural Biology. 1998. V. 122, № 1-2. P. 86-91.

130. Ran L.Y., Su H.N., Zhou M.Y., Wang L., Chen X.L., Xie B.B., Song X.Y., Shi M., Qin Q.L., Pang X. Characterization of a novel subtilisin-like protease myroicolsin from deep sea bacterium *Myroides profundus* D25 and molecular insight

into its collagenolytic mechanism // Journal of Biological Chemistry. 2014. V. 289, № 9. P. 6041-6053.

131. Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1998. V. 62, № 3. P. 597-635.

132. Rawlings N. D., Barrett A. J. Families of serine peptidases / Methods in Enzymology. Elsevier. 1994. P. 19-61.

133. Rawlings N. D., Barrett A. J., Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors // Nucleic acids research. 2011. V. 40, № D1. P. D343-D350.

134. Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M. Microbial Proteases Applications // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2019. V. 7. A. 110. P. 1-20.

135. Rich A., Crick F. The structure of collagen / Book The structure of collagen. Editor World Scientific. 1955. P. 915-916.

136. Robert L., Robert A., Jacotot B. Elastin–elastase–atherosclerosis revisited // Atherosclerosis. 1998. V. 140, № 2. P. 281-295.

137. Saeki K., Ozaki K., Kobayashi T., Ito S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2007. V. 103, № 6. P. 501-508.

138. Samarntarn W., Cheevadhanarak S., Tanticharoen M. Production of alkaline protease by a genetically engineered *Aspergillus oryzae* U1521 // The Journal of General and Applied Microbiology. 1999. V. 45, № 3. P. 99-103.

139. Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation // Process Biochemistry. 2005. V. 40, № 8. P. 2689-2694.

140. Sardjono, Zhu Y., Knol W. Comparison of fermentation profiles between lupine and soybean by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* in solid-state culture systems // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998. V. 46, № 8. P. 3376-3380.

141. Sathishkumar R., Ananthan G., Arun J. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2015. V. 4, № 2. P. 214-220.
142. Saulnier J. M., Curtil F. M., Duclos M. C., Wallach J. M. Elastolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* elastase // Biochim Biophys Acta. 1989. V. 995, № 3. P. 285-90.
143. Schultz D. R., Miller K. D. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors // Infection and Immunity. 1974. V. 10, № 1. P. 128-135.
144. Seifter S., Gallop P. M., Klein L., Meilman E. Studies on collagen II. Properties of purified collagenase and its inhibition // Journal of Biological Chemistry. 1959. V. 234, № 2. P. 285-293.
145. Shafee T. Evolvability of a viral protease: experimental evolution of catalysis, robustness and specificity. Cambridge: University of Cambridge, 2014, p. 167.
146. Shapiro S. D., Campbell E. J., Welgus H. G., Senior R. M. Elastin Degradation by Mononuclear Phagocytes a // Annals of the New York Academy of Sciences. 1991. V. 624, № 1. P. 69-80.
147. Shekhter, A. B., Balakireva, A. V., Kuznetsova, N. V., Vukolova, M. N., Litvitsky, P. F., Zamyatnin, A. A. Collagenolytic enzymes and their applications in biomedicine // Current medicinal chemistry. 2019. V. 26, №. 3. P. 487-505.
148. Shinoda S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections // Biocontrol Science. 2011. V. 16, № 4. P. 129-137.
149. Shoulders M. D., Raines R. T. Collagen structure and stability // Annual Review of Biochemistry. 2009. V. 78. P. 929-958.
150. Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri K. M., Soccol C. R., Pandey A. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation // Journal of Scientific and Industrial Research. 2007. V. 66. P. 621-626.

151. Starcher B. C. Lung elastin and matrix // *Chest*. 2000. V. 117, № 5. P. 229S-234S.
152. Suryanarayan S. Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience // *Biochemical Engineering Journal*. 2003. V. 13, № 2-3. P. 189-195.
153. Suzuki Y., Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria // *Journal of Bioscience and bioengineering*. 2006. V. 102, № 2. P. 73-81.
154. Sweeney S. M., Orgel J. P., Fertala A., McAuliffe J. D., Turner K. R., Di Lullo G. A., Chen S., Antipova O., Perumal S., Ala-Kokko L. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. V. 283, № 30. P. 21187-21197.
155. Tao S., Beihui L., Peng L., Deming L., Zuohu L. New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum* // *Process Biochemistry*. 1998. V. 33, № 4. P. 419-422.
156. Teles A. S., Chávez D. W., Oliveira R. A., Bon E. P., Terzi S. C., Souza E. F., Gottschalk L. M., Tonon R. V. Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds // *Food Research International*. 2019. V. 120. P. 441-448.
157. Thomas L., Larroche C., Pandey A. Current developments in solid-state fermentation // *Biochemical Engineering Journal*. 2013. V. 81. P. 146-161.
158. Thornton D. J., Carlstedt I., Sheehan J. K. Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels // *Molecular Biotechnology*. 1996. V. 5, № 2. P. 171-176.
159. Toder D., Gambello M., Iglewski B. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR // *Molecular Microbiology*. 1991. V. 5, № 8. P. 2003-2010.
160. Tsuruoka N., Nakayama T., Ashida M., Hemmi H., Nakao M., Minakata H., Oyama H., Oda K., Nishino T. Collagenolytic serine-carboxyl

proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression // Applied Environmental Microbiology. 2003. V. 69, № 1. P. 162-169.

161. Tunga R., Banerjee R., Bhattacharyya B. Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation // Bioprocess Engineering. 1998. V. 19, № 3. P. 187-190.

162. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects // Nature Reviews: Drug Discovery. 2006. V. 5, № 9. P. 785.

163. Uesugi Y., Arima J., Usuki H., Iwabuchi M., Hatanaka T. Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. 2008. V. 1784, № 4. P. 716-726.

164. Vesterberg O. Isoelectric focusing of proteins / Methods in Enzymology. Elsevier. 1971. P. 389-412.

165. Villegas E., Aubague S., Alcantara L., Auria R., Revah S. Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments // Biotechnology Advances. 1993. V. 11, № 3. P. 387-397.

166. Vishwanatha K., Rao A. A., Singh S. A. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 // Food Chemistry. 2009. V. 114, № 2. P. 402-407.

167. Vishwanatha K., Rao A. A., Singh S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2010. V. 37, № 2. P. 129-138.

168. Vrhovski B., Jensen S., Weiss A. S. Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin // European Journal of Biochemistry. 1997. V. 250, № 1. P. 92-98.

169. Wang R., Law R. C. S., Webb C. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation // Process Biochemistry. 2005. V. 40, № 1. P. 217-227.

170. Wang S. H., Zhang C., Yang Y. L., Diao M., Bai M. F. Screening of a high fibrinolytic enzyme producing strain and characterization of the fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus subtilis* LD-8547 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008. V. 24, № 4. P. 475-482.
171. Wang S.-L., Chen Y.-H., Yen Y.-H. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium // Enzyme and Microbial Technology. 2005. V. 36, № 5-6. P. 660-665.
172. Weisel J. W., Litvinov R. I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications // Blood. 2013. V. 121, № 10. P. 1712-1719.
173. Weisel J. W., Litvinov R. I. Fibrin formation, structure and properties // Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms. Springer, 2017. P. 405-456.
174. Wilson B. A., Salyers A. A., Whitt D. D., Winkler M. E. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. American Society for Microbiology (ASM), 2011. Third Edition. 540 p.
175. Wlodawer A., Gustchina A., Oyama H., Dunn B., Oda K. Structural and enzymatic properties of the sedolisin family of serine-carboxyl peptidases // Acta biochimica polonica (English edition). 2003. V. 50, № 1. P. 81-102.
176. Wu R., Chen G., Pan S., Zeng J., Liang Z. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose // Scientific Reports. 2019. V. 9, № 1. P. 6824.
177. Wu T., Mohammad A. W., Jahim J. M., Anuar N. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate // Enzyme and Microbial Technology. 2006. V. 39, № 6. P. 1223-1229.
178. Xiao-Lan L., Lian-xiang D., Fu-ping L., Xi-qun Z., Jing X. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12 // Applied Microbiology and Biotechnology. 2005. V. 67, № 2. P. 209-214.
179. Xu Y., He G.-q., Li J.-J. Effective extraction of elastase from *Bacillus* sp. fermentation broth using aqueous two-phase system // Journal of Zhejiang

University. Science. B. 2005. V. 6, № 11. P. 1087.

180. Yang F. C., Lin I.-H. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger* // Enzyme and Microbial Technology. 1998. V. 23, № 6. P. 397-402.

181. Yang, J., Huang, X., Tian, B., Wang, M., Niu, Q., Zhang, K. Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematocidal activity // Biotechnology letters. 2005. V. 27, №. 15. P. 1123-1128.

182. Yoshida E., Noda H. Isolation and characterization of collagenases I and II from *Clostridium histolyticum* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation. 1965. V. 105, № 3. P. 562-574.

183. Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications // Marine Drugs. 2015. V. 13, № 3. P. 1133-1174.

184. Zhang, Y., Fu, Y., Zhou, S., Kang, L., Li, C. A straightforward ninhydrin-based method for collagenase activity and inhibitor screening of collagenase using spectrophotometry //Analytical biochemistry. 2013. V. 437, №. 1. P. 46-48.

185. Zhao S., Liu Q., Wang J.-X., Liao X.-Z., Guo H., Li C.-X., Zhang F.-F., Liao L.-S., Luo X.-M., Feng J.-X. Differential transcriptomic profiling of filamentous fungus during solid-state and submerged fermentation and identification of an essential regulatory gene *PoxMBF1* that directly regulated cellulase and xylanase gene expression // Biotechnology for Biofuels. 2019. V. 12, № 1. P. 103.

186. Zohri A., Aboul-Nasr M., Adam M., Mustafa M., Amer E. Impact of enzymes and toxins potentiality of four *Aspergillus* species to cause aspergillosis // Biology and Medicine. 2017. V. 9, № 409. P. 2.