

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

**Оценка спектра протеолитической активности  
микровицетов рода *Aspergillus*  
по отношению к белкам системы гемостаза****А.А. Осмоловский<sup>1, \*</sup> , Б. Шаш<sup>3</sup>, А.В. Александрова<sup>2</sup>,  
Н.А. Баранова<sup>1</sup>, В.Г. Крейер<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Кафедра микробиологии и <sup>2</sup>кафедра микологии и альгологии, биологический факультет,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>3</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Natural Sciences and Literature, Istanbul Kültür University,  
Ataköy 7-8-9-10, E5 Karayolu Üzeri Ataköy Yerleşkesi, Bakırköy, 34158, Istanbul, Turkey

\*e-mail: aosmol@mail.ru

Изучена активность внеклеточных протеиназ у семи штаммов разных видов микровицетов рода *Aspergillus* по отношению к белкам системы гемостаза. Сравнение значений энзиматических индексов при росте штаммов на агаризованных средах с казеином и фибрином с последующим их глубинным культивированием и анализом амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами протеиназ системы гемостаза позволило отобрать штаммы *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29 в качестве перспективных продуцентов фибринолитических протеиназ. Образующие обоими штаммами протеиназы оказались способны расщеплять хромогенные пептидные субстраты тромбина, плазмина, фактора X, протеина С и урокиназы, проявляя высокую плазминоподобную и тромбиноподобную активность и не обладая активаторным действием к проферментам системы гемостаза.

**Ключевые слова:** протеиназы микровицетов, фибринолитические ферменты, тромболитические средства, плазминоподобная активность, активаторы белков гемостаза, хромогенные пептидные субстраты

Микроскопические грибы, относящиеся к роду *Aspergillus*, протеолитически активны в отношении самых разных белковых субстратов и выделяются из самых разнообразных мест обитания [1–5]. Широко проводятся исследования по воздействию секретируемых аспергиллами протеиназ на различные белки системы гемостаза, прежде всего – фибрин, фибриноген и плазминоген – для разработки препаратов тромболитического действия [6–9]. Известно, что протеиназы некоторых микровицетов способны не только расщеплять эти белки, но и проводить ограниченный протеолиз плазминогена, проявляя таким образом активаторное действие [10–12]. У представителей рода *Aspergillus* активаторная активность была показана ранее по отношению к другим белкам системы гемостаза – протеину С (протеиназа *A. ochraceus*), фактору X (протеиназа *A. ochraceus*) и прекалликреину (протеиназа *A. terreus*) [13–15]. Проявление подобной активности делает возможным применение этих протеиназ в лабораторных диагностических целях для определения с их помощью концентрации белков-проферментов в кровотоке, недостаток

которых приводит к риску возникновения тромбоэмболических заболеваний [16].

Единичные исследования, направленные на изучение активаторной по отношению к белкам системы гемостаза активности среди протеиназ микровицетов, не позволяют в полной мере получить представление о ее распространенности среди аспергиллов. Показано, что не все представители *Aspergillus*, изученные ранее, обладают протеиназами с такой активностью [13, 17, 18]. В этой связи поиск новых продуцентов протеиназ – активаторов белков системы гемостаза и оценка их воздействия на ключевые белки гемостаза представляют значительный интерес. Целью настоящей работы стало изучение воздействия внеклеточных протеиназ микровицетов рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза.

**Материалы и методы**

**Объекты исследования и их поддержание.** Объектами исследования служили штаммы микровицетов *Aspergillus aculeatus* A2, *A. candidus* A4, *A. chevalieri* 1205, *A. crustosus* A29, *A. janus* A17, *A. raperi* A13 и *A. unguis* 2167 из коллекции кафе-

дры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова. Поддержание штаммов осуществляли в пробирках на скошенных средах Чапека-Докса и сусло-агаре (3°Б). В качестве посевного материала использовали культуры, выращенные в течение 7 сут.

**Определение протеолитического потенциала микромицетов.** Проявление протеолитической активности определяли при росте штаммов в чашках Петри на средах состава (в %):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,05,  $\text{MgSO}_4$  – 0,025, пептон – 0,5, казеин или бычий фибрин – 1,0, агар – 1,5. Культивирование проводили в течение 5 сут при температуре 28 °С. Выявление зон гидролиза осуществляли после добавления в чашки Петри реактива Кумасси бриллиантового голубого G-250 с хлорной кислотой. Протеолитический потенциал микромицетов определяли по значению энзиматического индекса, рассчитанного как соотношение диаметров (в мм) колонии с зоной гидролиза и колонии без нее [19].

**Условия культивирования и определение протеолитической активности.** Культивирование микромицетов проводили в глубинных условиях в шейкере-инкубаторе ES-20/80 (BioSan, Латвия) при 200 об./мин в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28 °С в течение 2 сут на среде с суслон, глюкозой и пептоном [19, 20], после чего часть полученного посевного материала переносили в среду состава (в %): глюкоза – 3,0, глицерин – 7,0, гидролизат рыбной муки – 0,5,  $\text{NaNO}_3$  – 0,2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,05,  $\text{MgSO}_4$  – 0,05, pH 5,5, с последующим культивированием в течение 4 сут.

Активность внеклеточных протеиназ определяли в фильтрате культуральной жидкости с хромогенными пептидными и белковыми субстратами.

В качестве хромогенных пептидных субстратов использовали H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S2251) – для определения плазмина, Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S2765) и Vz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA (S-2222) – для определения Ха-фактора плазмы крови человека, Glp-Pro-Arg-pNA (S2366) – для определения активированного протеина C, Glp-Gly-Arg-pNA (S2444) – для определения урокиназы, Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH) и H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238) – для определения тромбина [21]. Для проведения реакции к 200 мкл культуральной жидкости добавляли 100 мкл 0,05%-ного (в 0,05М Трис-HCl-буфере, pH 8,2) раствора соответствующего субстрата (прямая активность) или прединкубировали ее с плазмой крови человека с последующим добавлением субстрата (активаторная активность) в случае отсутствия прямой активности, как описано ранее [13]. За единицу активности (Е) принимали количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от хромогенного субстрата за 1 мин.

Реакции проводили при постоянном перемешивании при 37 °С в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре BioSpectrometer® kinetic (Eppendorf, Германия).

Плазминоподобную активность (на прогретых фибриновых пластинах) и активность активаторов пламиногена (на непрогретых фибриновых пластинах) определяли по модифицированному методу Аструпа–Мюллертца–Лансена и выражали в условных единицах на 1 мл культуральной жидкости [22]. Инкубацию фибриновых пластинок с нанесенными образцами фильтрата культуральной жидкости микромицетов проводили в течение 3 ч. Активность выражали в усл. ед./мл.

**Определение содержания белка.** Количество белка в пробе определяли по методу Бредфорда [23]. Для этого к 50 мкл пробы добавляли 950 мкл реактива Кумасси бриллиантового голубого G-250. Оптическую плотность определяли при 595 нм.

Эксперименты выполнены в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ MS Excel 2013 и Statistica 7.0. Для сравнения данных использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Результаты представлены в виде среднего значения с ошибкой среднего.

### Результаты и их обсуждение

Изученные штаммы микромицетов выделены из образцов лесной подстилки Центрально-Лесного государственного биосферного заповедника и Кроноцкого заповедника (Россия), листового опада национальных парков Чуянгсин и Катъен (Вьетнам), а также почвы Богдинско-Баскунчакского заповедника (Россия).

Как известно, одним из способов оценки протеолитического потенциала микромицетов является их посев на агаризованные среды с белковыми субстратами с последующим расчетом энзиматического индекса – показателя относительной продуктивности микроорганизмов, определяемого как соотношение диаметров колонии с зоной гидролиза субстрата в среде к диаметру колонии. Чем это соотношение выше, тем более активен изучаемый штамм. Сравнение энзиматических индексов одного и того же штамма, выросшего на средах с разными белковыми субстратами, позволяет судить о выраженности действия образуемых им протеиназ и вести поиск продуцентов протеиназ с доминированием определенной активности [19]. Так, все семь изученных штаммов аспергиллов разных видов были протеолитически активными, однако величины энзиматических индексов варьировали от 1,0 до 1,7. Полученные данные представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, наибольший энзиматический индекс на среде

с казеином и на среде с фибрином был обнаружен у микромицета *A. candidus* A4 – как при росте на среде с казеином (1,714), так и при росте на среде с фибрином (1,410). Наименьший энзиматический индекс при росте на среде с казеином был показан для *A. chevalieri* 1205 (1,070), на среде с фибрином – для *A. aculeatus* A2 (1,000). Проявление казеинолитической и фибринолитической активности у всех микромицетов коррелировало, при этом значения энзиматических индексов на агаризованной среде с казеином были в 1,15–1,3 раза выше, чем на среде с фибрином. Видимо, протеиназы изученных микромицетов могут расщеплять глобулярные белки более активно, чем фибриллярные.

Изучение спектра действия образуемых микромицетами протеиназ проводили в реакциях со специфическими хромогенными субстратами белков системы гемостаза при глубинном культивировании штаммов. В табл. 2 показаны результаты определения прямой и активаторной по отношению к белкам системы гемостаза активности внеклеточных протеиназ изученных аспергиллов.

Как показали полученные результаты, большинство культур обладали способностью гидролизовать все использованные субстраты, что может говорить об их широкой субстратной специфичности, значения активности варьировали от 2,6 до 70,3 Е/мл $\times 10^{-3}$ . Наиболее активными по отношению к субстратам – пара-нитроанилидам – оказались культуры *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29, наименьшую активность продемонстрировал *A. unguis* 2167. Наибольшая амидолитическая активность была выявлена по отношению к субстратам тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA) и плазмину (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), наименьшая – к субстрату X фактора (Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA). Максимальную плазминоподобную активность (с субстратом H-D-Val-Leu-Lys-pNA) обнаружили у *A. candidus* A4 (62,3 Е/мл $\times 10^{-3}$ ) и *A. chevalieri* 1205 (26,4 Е/мл $\times 10^{-3}$ ), тромбиноподобную (с субстратом Tos-Gly-Pro-Arg-pNA) – у *A. crustosus* A29 (56,2 Е/мл $\times 10^{-3}$ ) и *A. janus* A17 (43,9 Е/мл $\times 10^{-3}$ ). Внеклеточные протеиназы, образуемые двумя штаммами из семи – *A. aculeatus*

A2 и *A. janus* A17 – оказались неспособными расщеплять субстрат тромбина H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (табл. 2).

Преобладания какой-либо одной из исследованных амидолитической активности у изученных микромицетов выявить не удалось. Кроме того, у четырёх штаммов аспергиллов не было обнаружено активаторной активности по отношению ни к одному из факторов свертывания крови в сопряженных реакциях с плазмой крови человека. Остальные три штамма обладали активаторной к протромбину активностью (*A. aculeatus* A2, *A. janus* A17, *A. unguis* 2167) и фактору X (*A. janus* A17). Наибольшая активаторная активность была обнаружена к протромбину с субстратом Tos-Gly-Pro-Arg-pNA; ее проявили протеиназы *A. unguis* 2167 (17,6 Е/мл $\times 10^{-3}$ ). Величины активности не позволяют считать эти микромицеты продуцентами протеиназ – активаторов белков системы гемостаза, т.к. они оказались в несколько раз меньше, чем у подобных известных штаммов – *A. ochraceus* L-1 и *A. terreus* 2 [13–15].

Из всех изученных штаммов наибольший интерес представляли микромицеты *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29 как наиболее протеолитически активные. Ввиду способности секретиремых протеиназ микромицетов проявлять плазминоподобную активность дополнительно было изучено их фибринолитическое действие на фибриновых пластинах – как прямое, так и активаторное. Значения фибринолитической активности представлены на рисунке и оказались близки (175,2 и 186,5 усл.ед./мл для *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29 соответственно). Величины активности были сопоставимы с величинами активности для других аспергиллов – *A. ochraceus* L-1, *A. versicolor* 1 [22] и *Purpureocillium lilacinum* k1 [18]. Высокие значения удельной фибринолитической активности, более 10000 усл. ед./мг белка, свидетельствуют о возможности практического применения внеклеточных протеиназ *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29 в биомедицине (рисунок). Активаторной к плазминогену активности у изученных штаммов выявлено не было.

Таблица 1

Протеолитический потенциал аспергиллов при росте на агаризованных средах с казеином и фибрином (указаны средние и ошибки среднего)

Микромицет	Среда с казеином		Среда с фибрином		Энзиматический индекс	
	Диаметр колонии, мм	Диаметр зоны гидролиза, мм	Диаметр колонии, мм	Диаметр зоны гидролиза, мм	Среда с казеином	Среда с фибрином
<i>A. aculeatus</i> A2	27 ± 1	34 ± 1	15 ± 1	15 ± 1	1,260 ± 0,05	1,000 ± 0,05
<i>A. candidus</i> A4	21 ± 1	36 ± 1	22 ± 1	31 ± 1	1,714 ± 0,05	1,410 ± 0,05
<i>A. chevalieri</i> 1205	57 ± 1	61 ± 1	16 ± 1	19 ± 1	1,070 ± 0,05	1,187 ± 0,05
<i>A. crustosus</i> A29	19 ± 1	30 ± 1	19 ± 1	26 ± 1	1,578 ± 0,05	1,368 ± 0,05
<i>A. janus</i> A17	15 ± 1	21 ± 1	13 ± 1	17 ± 1	1,400 ± 0,05	1,307 ± 0,05
<i>A. raperi</i> A13	15 ± 1	19 ± 1	24 ± 1	29 ± 1	1,267 ± 0,05	1,208 ± 0,05
<i>A. unguis</i> 2167	11 ± 1	16 ± 1	6 ± 1	7 ± 1	1,455 ± 0,05	1,166 ± 0,05

Таблица 2

Прямая и активаторная по отношению к белкам системы гемостаза активность внеклеточных протеиназ аспергиллов

Микромицет	Активность с хромогенными пептидными субстратами, Е/мл $\times 10^{-3}$ (указаны средние и ошибки среднего)															
	Tos-Gly-Pro-Arg-pNA		H-D-Phe-Pip-Arg-pNA		H-D-Val-Leu-Lys-pNA		Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA		Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA		pGlu-Pro-Arg-pNA		pGlu-Gly-Arg-pNA			
	- плазма*	+ плазма**	- плазма	+ плазма	- плазма	+ плазма	- плазма	+ плазма	- плазма	+ плазма	- плазма	+ плазма	- плазма	+ плазма		
<i>A. aculeatus</i> A2	8,6 ± 0,2	0	5,5 ± 0,05	10,0 ± 0,05	7,9 ± 0,05	—	7,1 ± 0,05	0	7,6 ± 0,05	0	9,9 ± 0,05	—	—			
<i>A. candidus</i> A4	21,3 ± 0,05	—***	16,7 ± 0,05	62,3 ± 0,05	15,4 ± 0,05	—	9,8 ± 0,05	—	16,4 ± 0,05	—	17,6 ± 0,05	—	—			
<i>A. chevalieri</i> 1205	14,6 ± 0,05	—	27,5 ± 0,05	23,8 ± 0,05	14,2 ± 0,05	—	9,8 ± 0,05	—	9,3 ± 0,05	—	6,2 ± 0,05	0	—			
<i>A. stutosus</i> A29	56,2 ± 0,05	—	17,3 ± 0,05	26,4 ± 0,05	70,3 ± 0,05	—	7,9 ± 0,05	0	67,2 ± 0,05	—	17,8 ± 0,05	—	—			
<i>A. janus</i> A17	43,9 ± 0,05	—	0 ± 0,05	6,6 ± 0,05	22,0 ± 0,05	—	3,5 ± 0,05	16,1	34,6 ± 0,05	—	16,0 ± 0,05	—	—			
<i>A. raperi</i> A13	16,1 ± 0,05	—	15,4 ± 0,05	6,0 ± 0,05	32,7 ± 0,05	—	11,2 ± 0,05	—	29,5 ± 0,05	—	10,0 ± 0,05	—	—			
<i>A. unguis</i> 2167	4,0 ± 0,05	17,6 ± 0,05	7,0 ± 0,05	3,9 ± 0,05	8,6 ± 0,05	8,52 ± 0,05	9,3 ± 0,05	—	2,6 ± 0,05	12,9 ± 0,05	8,5 ± 0,05	—	—			

\* прямая активность с хромогенными субстратами

\*\* активаторная активность с хромогенными субстратами

\*\*\* активность не определяли

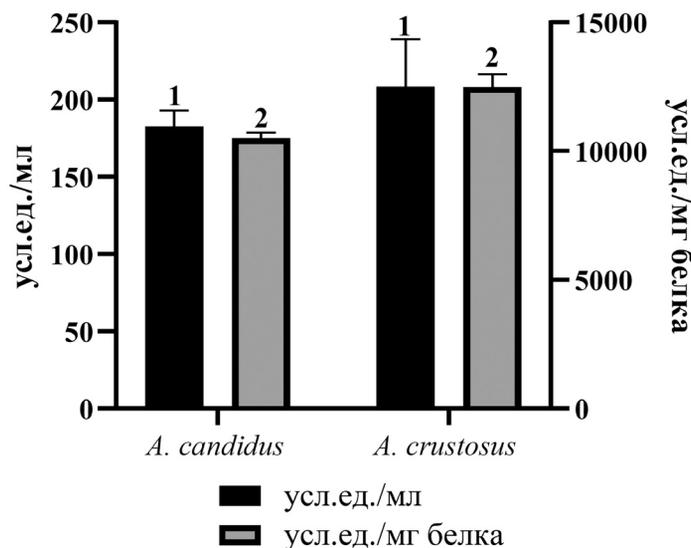


Рисунок. Общая (1) и удельная (2) фибринолитическая активность протеиназ, образуемых *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29.

Таким образом, изучена активность внеклеточных протеиназ у семи штаммов разных видов микромицетов рода *Aspergillus* по отношению к белкам системы гемостаза. Сравнение значений энзиматических индексов при росте штаммов на агаризованных средах с казеином и фибрином с последующим их глубинным культивированием и анализом амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами протеиназ системы гемостаза позволило отобрать штаммы

*A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29 в качестве перспективных продуцентов фибринолитических протеиназ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ № СП-3906.2021.4. Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abdal-Aziz S.A.A., Ali S.M.* Molecular characterization and differentiation of proteases isolated from different *Aspergillus* fungal species // Online J. Biol. Sci. 2021. Vol. 21. N 1. P. 69–119.
2. *Galiakberova A.A., Bednenko D.M., Kreyer V.G., Osmolovskiy A.A., Egorov N.S.* Formation and properties of the extracellular proteinase of *Aspergillus flavus* O-1 micromycete active against fibrillar proteins // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. Vol. 57. N 5. P. 586–593.
3. *Mustefa Beyan, S., Venkatesa Prabhu, S., Mumecha, T.K., Gemeda Mesfin T.* Production of alkaline proteases using *Aspergillus* sp. isolated from Injera: RSM-GA based process optimization and enzyme kinetics aspect // Curr. Microbiol. 2021. Vol. 78. N 5. P. 1823–1834.
4. *Popova E.A., Kreyer V.G., Komarevtsev S.K., Shabunin S.V., Osmolovskiy A.A.* Properties of extracellular proteinase of the micromycete *Aspergillus ustus* 1 and its high activity during fibrillary-protein hydrolysis // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. Vol. 57. N 2. P. 200–205.
5. *Chung D., Yu W.-J., Lim J.-Y., Kang N.-S., Kwon Y.-M., Choi G., Bae S.-S., Cho K., Lee D.-S.* Characterization of the proteolytic activity of a halophilic *Aspergillus reticulatus* strain SK1-1 isolated from a solar saltern // Microorganisms. 2022. Vol. 10. N 1: 29.
6. *Diwan D., Usmani Z., Sharma M., Nelson J.W., Thakur V.K., Christie G., Molina G., Gupta V.K.* Thrombolytic enzymes of microbial origin: a review // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. N 19: 10468.
7. *Moula Ali A.M., Bavisetty S.C.B.* Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: a comprehensive review // Int. J. Biol. Macromol. 2020. Vol. 163. P. 1498–1517.
8. *Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* Протеолитические ферменты мицелиальных грибов с плазминоподобной и активаторой к плазминогену активностью // Усп. совр. биол. 2021. Т. 141. № 5. С. 467–482.
9. *Sharma C., Osmolovskiy A., Singh R.* Microbial fibrinolytic enzymes as anti-thrombotics: production, characterization and prodigious biopharmaceutical applications // Pharmaceutics. 2021. Vol. 13. N 11: 1880.
10. *Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S.* Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // Microbiology. 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.
11. *Fokichev N.S., Kornienko E.I., Sharkova T.S., Kreyer V.G., Osmolovskiy A.A.* Thrombolytic activity and properties of the proteinase produced by the micromycete *Tolypocladium inflatum* k1 // Mycol. Phytopathol. 2021. Vol. 55. N 6. P. 449–456.

12. Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Characteristics and properties of the complex of proteolytic enzymes of the thrombolytic action of the micromycete *Sarocladium strictum* // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. Vol. 57. N 1. P. 57–64.
13. Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. The effect of micromycete extracellular proteases of *Aspergillus* genus on the proteins of haemostatic system // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. Vol. 40. N 6. P. 634–639.
14. Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Identification of targets for extracellular proteases activating proteins of the haemostatic system produced by micromycetes *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus terreus* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. Vol. 41. N 5. P. 500–505.
15. Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Production of proteinase with plasmin-like and prekallikrein activating activity by the micromycete *Aspergillus terreus* // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. Vol. 54. N 2. P. 206–210.
16. Marlar R.A., Gausman J.N. Laboratory testing issues for protein C, protein S, and antithrombin // Int. J. Lab. Hematol. 2014. Vol. 36. N 3. P. 289–295.
17. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Piskunkova N.F., Egorov N.S. Micromycetes *Aspergillus flavus* and *A. oryzae* as producers of proteinases activating the proteins of human hemostasis system // Mycol. Phytopatol. 2019. Vol. 53. N 3. P. 183–185.
18. Lukianova A.A., Kornienko E.I., Vigand P.A., Kreyer V.G., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A. Secretion by micromycetes of proteases with activity similar to the activity of the hemostatic system proteins // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2020. Vol. 75. N 1. P. 31–35.
19. Osmolovskiy A.A., Rukaviitsyna E.D., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* // Microbiology. 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.
20. Batomunkueva B.P., Egorov N.S. Isolation, purification and resolution of the extracellular proteinase complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities // Microbiology. 2001. Vol. 70. N 5. P. 519–522.
21. Proteolytic Enzymes. A practical approach / Eds. R. Beynon and J.S. Bond. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001. 340 pp.
22. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // Microbiology. 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.
23. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. N 1–2. P. 248–254.

Поступила в редакцию 09.04.2022

После доработки 12.05.2022

Принята в печать 23.05.2022

## SHORT COMMUNICATION

# Evaluation of the spectrum of proteolytic activity of micromycetes of the genus *Aspergillus* in relation to proteins of the hemostasis system

A.A. Osmolovsky<sup>1</sup>, \* , B. Şaş<sup>3</sup>, A.V. Aleksandrova<sup>2</sup>, N.A. Baranova<sup>1</sup>, V.G. Kreyer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and <sup>2</sup>Department of Mycology and Algology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

<sup>3</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Natural Sciences and Literature, Istanbul Kültür University, Ataköy 7-8-9-10, E5 Karayolu Üzeri Ataköy Yerleşkesi, Bakırköy, 34158, Istanbul, Turkey

\*e-mail: aosmol@mail.ru

The activity of extracellular proteinases in seven strains of different species of micromycetes of the genus *Aspergillus* in relation to proteins of the hemostasis system was studied. Comparison of the values of enzymatic indices during the growth of strains on agar media with casein and fibrin, followed by their submerged cultivation and analysis of amidolytic activity with chromogenic peptide substrates of proteinases of the hemostasis system, made it possible to select strains of *A. candidus* A4 and *A. crustosus* A29 as promising producers of fibrinolytic proteinases. The proteinases formed by both strains were able to cleave the chromogenic peptide substrates of thrombin, plasmin, factor X, protein C, and urokinase, exhibiting high plasmin-like and thrombin-like activity and not having an activating effect on the proenzymes of the hemostasis system.

**Keywords:** micromycete proteinases, fibrinolytic enzymes, thrombolytic agents, plasmin-like activity, hemostasis protein activators, chromogenic peptide substrates

**Funding:** The work was supported by the Financial Council for Grants of the President of the Russian Federation No. SP-3906.2021.4.

**Сведения об авторах**

*Осмоловский Александр Андреевич* – канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: 0000-0001-6672-0551

*Шаш Бегюм (Şaş Begüm)* – студент кафедры молекулярной биологии и генетики, факультет естественных наук и литературы, Стамбульский университет Кюльтюр. Тел.: +90 542 747 61 10; e-mail: begum.sas99@gmail.com

*Александрова Алина Витальевна* – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: alinaalex2011@yandex.ru

*Баранова Нина Андреевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: baranovana2012@mail.ru

*Крейер Валериана Георгиевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru