

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

Протеолитические ферменты микромицетов рода *Aspergillus*, гидролизующие фибриллярные белки, для биомедицины и биотехнологических процессов**С.Н. Тиморшина , Е.А. Попова , А.А. Галиакберова, А.Г. Очнева, А.А. Осмоловский* ***Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: aosmol@mail.ru*

Фибриллярные белки играют значительную роль в функционировании живых организмов, а в последнее время к ним обращено большое внимание как к мишеням при терапии и диагностике различных заболеваний, субстратам для производства биополимеров, а также промышленно значимым белкам, играющим важную роль при производстве текстильных изделий и продуктов питания. Для реализации развития этих направлений необходимы методы гидролиза и обработки фибриллярных белков, наиболее перспективные из которых — применение протеолитических ферментов. Было изучено 11 ферментных препаратов, полученных при культивировании микромицетов рода *Aspergillus* с последующими высаливанием и диализом внеклеточных белков и содержащих от 1 до 10 белков, на способность гидролизовать фибриллярные белки: коллаген, кератин, фибрин и эластин. Протеолитические ферменты культур *A. alliaceus* 7dN1, *A. clavatus* A16 и *A. ustus* 1 показали активность, сопоставимую с активностью коммерческого препарата «Терилитин», используемого при раневой терапии, или выше. Ферментный препарат *A. fumigatus* D1 также проявил высокую фибринолитическую активность.

Ключевые слова: протеазы, фибриллярные белки, коллагеназы, кератиназы, фибринолитические ферменты, эластазы, *Aspergillus*

Фибриллярные белки широко представлены в организме различных животных и, как правило, выполняют структурные функции [1]. Коллаген и эластин являются основными белками внеклеточного матрикса соединительной ткани [2], кератин — входит в состав рогового слоя эпидермиса и его производных [3], а фибрин — основной компонент тромба — является критически важным белком гемостаза [4]. Однако их чрезмерное накопление или несвойственная локализация могут приводить к разнообразным заболеваниям, среди которых наиболее распространены тромбозы, фиброматозы и кератозы, что обеспечивает в медицинской практике высокий интерес к препаратам, способным к деградации фибриллярных белков [4, 5]. Такие препараты также применяются в терапии травматических повреждений кожного покрова — ран и ожогов, приводящих к образованию некротического компонента, богатого коллагеном и эластином [6]. Ферментные препараты, способные к эффективному гидролизу коллагена и кератина, также находят широкое применение в различных отраслях промышленности: в легкой и текстильной их используют для обработки шкур и меха, а в пищевой — применяют для тендеризации мяса. Не менее важной и перспективной сфе-

рой применения кератиназ и коллагеназ является биodeградация отходов животноводства. Продукты ферментативного гидролиза кератино- и коллагеносодержащих отходов, таких как куриное перо, свиная щетина, рога, копыта и хрящи, представляют собой смесь коротких пептидов и аминокислот, которую в дальнейшем можно использовать в качестве кормовых добавок и биодобавок [7].

Востребованность ферментов, высокоактивных в отношении фибриллярных белков, и разнообразие задач, для которых их применяют, обуславливают неугасающий интерес ученых к разработке новых способов их получения и поиску эффективных продуцентов. Одним из перспективных направлений исследований в этой области является изучение протеаз, образуемых мицелиальными грибами, так как они способны к синтезу широкого спектра протеолитических ферментов, в том числе с высокими значениями активности по отношению к фибриллярным белкам [8–11].

В рамках данного исследования была изучена ферментативная активность в отношении коллагена, кератина, эластина и фибрина протеаз, входящих в состав препаратов внеклеточных белков, 11 штаммов грибов рода *Aspergillus*.

Материалы и методы

Реактивы. Субстраты для анализа протеолитической активности, реактивы для электрофореза, а также коммерческие препараты трипсина (рН оптимум 7,8–8,0) и кислой протеазы *Aspergillus saitoi* (рН оптимум около 2,8) были приобретены у производителя «Sigma-Aldrich» (США). В исследовании были использованы соли, кислоты и другие реактивы фирмы «Panreac» (Испания). Изучаемые ферментные препараты также сравнили с коммерческим препаратом «Террилитин» производства Санкт-Петербургского научно-исследовательского института вакцин и сывороток, основным компонентом которого является протеаза *A. terreus*, используемая в медицине для заживления ран (рН оптимум около 8).

Получение препаратов внеклеточных белков микромицетов рода *Aspergillus*. Получение ферментных препаратов осуществляли путем двухстадийного глубинного культивирования 11 штаммов микромицетов рода *Aspergillus* из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. На первом этапе мицелиальные грибы культивировали в 100 мл богатой углеводами среды (сусло – 6,7%, глюкоза – 2,0%, пептон – 0,1%; рН 5,5) в колбах Эрленмейера (750 мл) при 28°C и 200 об./мин в течение 2 сут для накопления биомассы. Затем 3% от объема биомассы переносили в ферментационные среды, подобранные для получения внеклеточных протеолитических ферментов микромицетов в предыдущих исследованиях [12–15]. Условия культивирования были аналогичными первому этапу (100 мл среды, 28°C, 200 об./мин). В день накопления максимальной протеолитической активности секретируемые микромицетами белки осаждали сульфатом аммония из отфильтрованной от биомассы культуральной жидкости (608 г сульфата аммония на 1 л культуральной жидкости). После 48 ч инкубации при 4°C белки центрифугировали при 3160 g и 4°C в течение 45 мин в центрифуге LMC-4200R (Biosan, Латвия). Осадки растворяли в 0,01 М Трис-НСl буфере (рН 8,2) и подвергали диализу против 0,005 М буфера Трис-НСl (рН 8,2) в течение 24 ч перед повторным центрифугированием в аналогичных условиях. Супернатанты замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Полученные порошки препаратов внеклеточных белков грибов *Aspergillus* хранили при температуре –20°C.

Определение количества белка. Определение количества белка проводили с бицинхониновой кислотой [16]. К 50 мкл растворов белковых препаратов в дистиллированной воде с концентрацией 2 мг/мл добавляли 950 мкл раствора В перед измерением оптической плотности смеси при 562 нм с помощью спектрофотометра BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, Германия). Раствор В готовили в день проведения реакции

путем смешивания раствора А (бицинхониновая кислота – 1,0%, Na₂CO₃ – 2,0%, виннокислый натрий – 0,16%, NaOH – 0,4%, NaHCO₃ – 0,95%; рН 11,25) и раствора Б (CuSO₄ – 4,0%) в соотношении 50 к 1 соответственно. Для расчета количества белка в ферментных препаратах строили калибровочную кривую с использованием бычьего сывороточного альбумина.

Электрофоретический анализ белкового состава ферментных препаратов. Электрофорез нативных белков в полиакриламидном геле проводили по методу Дэвиса в трис-глициновом буфере (рН 8,3) с концентрацией акриламида в концентрирующем геле 6,0% и в разделяющем геле – 7,5%. Белки разделяли при силе тока 25 мА. Гель окрашивали 0,08%-ным раствором кумасси бриллиантового синего G-250 в 3,5%-ной хлорной кислоте в течение 30 мин. Для удаления красителя из геля использовали 7%-ную уксусную кислоту.

Анализ протеолитической активности. Для определения протеолитической активности препаратов внеклеточных белков грибов рода *Aspergillus* использовали суспензии различных окрашенных белковых субстратов: азоказеина, азоколлагена, Hide Powder Azure (НРА), эластина-конго красного (ЭКК) и кератин-азура, приготовленных на 0,05 М Трис-НСl-буфере (рН 8,2), а также фибрина голубого – на 0,05 М ацетатном буфере (рН 5,5). Реакции проводили с 200 мкл 0,2%-ных суспензий азоказеина, азоколлагена, ЭКК и фибрина голубого, а также с 2%-ной суспензией НРА. К субстратам добавляли 100 мкл пробы. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 30 мин при гидролизе азоказеина и фибрина голубого, 24 ч – при реакциях с азоколлагеном или НРА и 48 ч – для разрушения ЭКК в термошейкерах TS-24 (Biosan, Латвия) при 600 об./мин (азоказеинолиз и гидролиз фибрина голубого) и 750 об./мин (азоколлагенолиз, гидролиз НРА и ЭКК). Все реакции останавливали добавлением 300 мкл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Затем образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия) перед измерениями оптической плотности при 340 нм (азоказеин), 520 нм (азоколлаген), 595 нм (НРА), 495 нм (ЭКК) и 620 нм (фибрин голубой) с помощью спектрофотометра BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, Германия).

Для изучения кератинолитической активности 10 мг кератин-азура добавляли к 100 мкл 0,05 М Трис-НСl-буфера (рН 8,2) и 200 мкл пробы. Смесь инкубировали 48 ч при 37°C (750 об./мин). Реакцию останавливали и затем смесь центрифугировали, как описано выше. Измерения оптической плотности проводили при 595 нм.

За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0,01 ед. в условиях проведения реакции.

Активность ферментных препаратов в отношении фибриллярных белков, кроме того, определяли модифицированным методом Аструпа-Мюллерца-Лассена с использованием фибриновых пластин [17]. Для проведения эксперимента получали фибриновые пластины двух типов: стандартные (только с фибрином) и смешанные (с фибрином, коллагеном и эластином). Для приготовления стандартных фибриновых пластин в чашках Петри ($d = 9$ см) смешивали 900 мкл 0,3%-ного раствора бычьего фибриногена и 200 мкл 0,2%-ного раствора тромбина в физиологическом растворе. Суспензию 0,3%-ного фибриногена, 0,5%-ного коллагена и 0,5%-ного эластина использовали для получения смешанных пластин. Формирование и стабилизация фибринового геля происходили в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем фибриновые пластины прогревали 30 мин при 86°C для инактивации плазминогена, находящегося в качестве примеси в фибриногене быка. Для измерения протеолитической активности на пластины наносили пробы объемом 30 мкл и инкубировали их в течение 3 ч при 37°C . После этого измеряли площади зон лизиса. Данные были выражены в усл. ед./мг. За 1 усл. ед. принимали количество фермента, формирующего зону гидролиза фибриновой пластинки, равную 1 мм^2 .

Все измерения проводили в трех повторностях. Данные рассчитывали как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Результаты определения ферментативной активности и количества белка в препаратах изучаемых культур рода *Aspergillus* представлены в таблице. Для измерения протеолитической активности готовили растворы 11 препаратов внеклеточных белков (2 мг/мл), синтезируемых микромицетами. Для сравнения использовали три коммерческих

препарата той же концентрации: кислую протеазу *Aspergillus saitoi*, трипсин и террилитин.

Из исследованных ферментных препаратов мицелиальных грибов все, кроме белков, секретированных *A. flavipes* A17, проявляли высокую общую протеолитическую активность, которую измеряли при проведении реакций с двумя субстратами: азоказеином и НРА. Внеклеточные протеазы *A. candidus* A6 также эффективно гидролизировали НРА, однако обладали относительно невысоким уровнем активности по отношению к азоказеину. Среди коммерческих ферментов только протеаза *A. saitoi* показала незначительную общую протеолитическую активность в условиях проведения реакций, что обусловлено ее рН-оптимумом, лежащим в кислой области. Ферментативная активность в отношении азоколлагена была сравнительно высокой у белков трех штаммов: *A. raperi* A13, *A. alliaceus* 7dN1 и *A. clavatus* A16. Ферментные препараты этих культур гидролизировали азоколлаген эффективнее коммерческих, в том числе террилитина, что говорит об их перспективности в качестве агентов для раневой терапии. Препараты всех штаммов *Aspergillus* показали низкую способность к гидролизу кератин-азура – наиболее трудноразлагаемого субстрата из использованных. Внеклеточные белки *A. alliaceus* 7dN1 и *A. clavatus* A16 были более активны в реакциях с кератин-азуром по сравнению с другими изучаемыми препаратами, и значения их активности были сопоставимы с кератинолитической активностью террилитина, а также выше, чем у трипсина и коммерческой протеазы *A. saitoi*. Значительный уровень деградации фибрина голубого наблюдался при реакциях с белковыми препаратами *A. ochraceus* L-1, *A. fumigatus* D1 и *A. raperi* A13. Активность этих препаратов существенно превосходила уровень фибринолиза с использованием коммерческих аналогов. Полученные

Таблица

Протеолитическая активность и количество белка в препаратах внеклеточных белков микромицетов рода *Aspergillus*

Культуры	Ферментативная активность в отношении различных окрашенных белковых субстратов, Е						Количество белка, мкг/мл
	азоказеин	азоколлаген	кератин-азур	ЭКК	фибрин голубой	НРА	
<i>A. terreus</i> 2	$93 \pm 1,19$	$8,4 \pm 1,37$	$4,0 \pm 0,34$	$0,90 \pm 0,21$	$12,2 \pm 3,73$	$71 \pm 6,65$	$248,85 \pm 1,72$
<i>A. fumigatus</i> D1	$93 \pm 0,66$	$6,3 \pm 0,15$	$1,0 \pm 0,72$	$0,50 \pm 0,06$	$20,0 \pm 2,20$	$83 \pm 3,95$	$462,52 \pm 10,03$
<i>A. ochraceus</i> L-1	$89 \pm 0,68$	$9,6 \pm 0,00$	$9,0 \pm 1,71$	$1,70 \pm 0,06$	$30,0 \pm 2,45$	$86 \pm 2,33$	$359,30 \pm 2,41$
<i>A. flavus</i> 1	$100 \pm 0,92$	$3,9 \pm 0,25$	$6,5 \pm 0,76$	$0,20 \pm 0,10$	$9,7 \pm 1,17$	$98 \pm 3,64$	$535,98 \pm 2,68$
<i>A. sydowii</i> 1	$102 \pm 0,32$	$4,1 \pm 0,35$	$3,7 \pm 0,15$	$0,53 \pm 0,03$	$6,3 \pm 1,75$	$86 \pm 4,51$	$257,43 \pm 3,14$
<i>A. clavatus</i> A16	$95 \pm 0,27$	$15,3 \pm 0,39$	$10,5 \pm 0,00$	$2,00 \pm 0,10$	$8,0 \pm 1,55$	$77 \pm 0,65$	$1709,91 \pm 8,53$
<i>A. alliaceus</i> 7dN1	$80 \pm 0,45$	$20,5 \pm 2,95$	$13,3 \pm 0,10$	$1,20 \pm 0,15$	$0,0 \pm 0,00$	$95 \pm 0,75$	$641,61 \pm 10,72$
<i>A. ustus</i> 1	$95 \pm 0,20$	$10,5 \pm 0,52$	$4,5 \pm 0,20$	$0,67 \pm 0,12$	$0,0 \pm 0,00$	$93 \pm 1,25$	$858,58 \pm 5,93$
<i>A. flavipes</i> A17	$2 \pm 0,05$	$1,6 \pm 0,07$	$2,4 \pm 1,50$	$0,20 \pm 0,12$	$12,2 \pm 0,65$	$60 \pm 0,55$	$816,94 \pm 5,36$
<i>A. raperi</i> A13	$89 \pm 0,52$	$23,0 \pm 1,35$	$7,7 \pm 0,72$	$0,13 \pm 0,03$	$19,7 \pm 4,25$	$86 \pm 0,38$	$984,25 \pm 7,88$
<i>A. candidus</i> A6	$56 \pm 0,10$	$3,2 \pm 0,12$	$6,1 \pm 0,44$	$1,20 \pm 0,17$	$0,0 \pm 0,00$	$82 \pm 4,30$	$783,70 \pm 2,33$
<i>A. saitoi</i>	$2 \pm 0,09$	$0,7 \pm 0,12$	$7,5 \pm 0,98$	$0,17 \pm 0,17$	$9,1 \pm 0,30$	$3 \pm 0,20$	$188,26 \pm 1,88$
трипсин	$77 \pm 0,18$	$10,2 \pm 1,81$	$0,0 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,12$	$0,0 \pm 0,00$	$95 \pm 0,75$	$560,38 \pm 3,70$
террилитин	$100 \pm 0,10$	$10,5 \pm 0,75$	$10,1 \pm 0,45$	$0,00 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$97 \pm 0,95$	$470,97 \pm 3,54$

при культивировании коллекционных штаммов и коммерческие препараты не обладали существенной способностью гидролизовать ЭКК, что указывает на низкий уровень патогенности их продуцентов [18–20]. Также стоит отметить, что ни один из коммерческих препаратов не обладал высокой активностью в отношении фибриллярных белков, а количество белка во всех исследованных препаратах сильно различалось. Количество белка сильно варьировало у разных препаратов, что, по-видимому, обусловлено продуцентом и условиями культивирования, однако корреляции между количеством белка и активностью препаратов не было.

Способность ферментных препаратов гидролизовать фибриллярные белки также была изучена модифицированным методом Аструпа-Мюллерца-Лассена с использованием фибриновых пластин. Стандартные пластины содержали только фибрин, смешанные — фибрин, коллаген и эластин для имитации состава кожной раны. Результаты измерения активности показаны на рис. 1.

Эксперименты с фибриновыми пластинами частично подтвердили результаты, полученные при измерении ферментативной активности с окрашенными субстратами спектрофотометрически. Однако наибольшую активность показал трипсин, тогда как из полученных в лабораторных условиях препаратов наиболее эффективно гидролизовали фибриллярные белки протеазы микромицета *A. ustus* 1. Уровень их активности был сопоставим с действием террилитина, но последний был менее активен при использовании смешанных пластин. Стоит отметить, что для большинства препаратов различия активности в отношении стандартных и смешанных пластин оказались незначительными, за исключением трипсина, террилитина, а также белков мицелиальных грибов *A. fumigatus* D1 и *A. flavus* 1. Такие различия могут быть связаны как с субстратной специфичностью отдельных ферментов, так и с наличием в ферментных препаратах нескольких белков. Для определения количества белков в ферментных

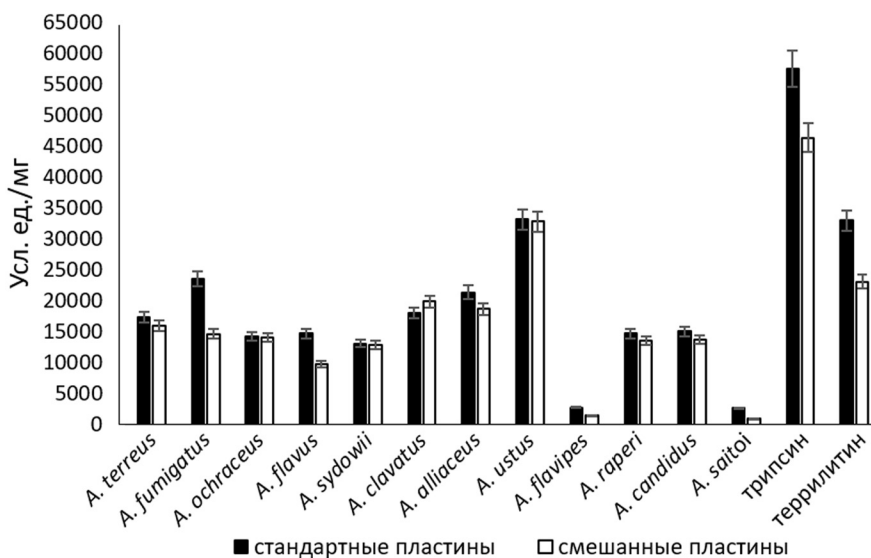


Рис. 1. Активность в отношении фибриллярных белков препаратов внеклеточных белков микромицетов рода *Aspergillus*.

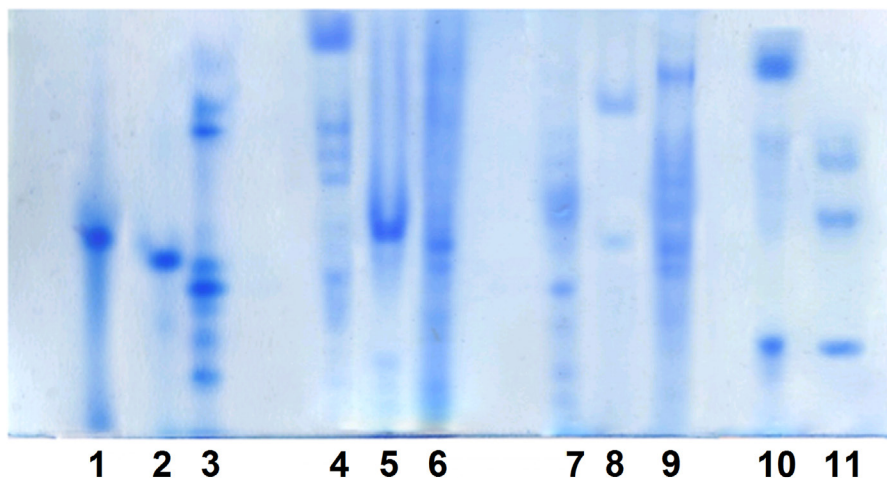


Рис. 2. Нативный электрофорез в полиакриламидном геле препаратов внеклеточных белков микромицетов рода *Aspergillus*: 1 — *A. fumigatus* D1, 2 — *A. ustus* 1, 3 — *A. raperi* A13, 4 — *A. sydowii* 1, 5 — *A. terreus* 2, 6 — *A. flavipes* A17, 7 — *A. alliaceus* 7dN1, 8 — *A. ochraceus* L-1, 9 — *A. clavatus* A16, 10 — *A. flavus* 1, 11 — *A. candidus* A6.

препаратах был проведен нативный электрофорез в полиакриламидном геле (рис. 2).

Ферментные препараты изучаемых грибов были различны по количеству белков: от одного (*A. fumigatus* D1, *A. ustus* 1) до более десяти (*A. sydowii* 1, *A. alliaceus* 7dN1). Действительно, ферментные препараты *A. fumigatus* D1 и *A. flavus* 1 оказались малокомпонентными (один и два основных белка соответственно), что может объяснять узкий спектр субстратов, которые способны гидролизовать эти ферменты. Однако препарат *A. ustus* 1, также содержащий лишь один полипептид, показал наибольшую активность со стандартными и смешанными пластинами среди изучаемых внеклеточных белков микромицетов, что говорит о его широкой субстратной специфичности по отношению к фибриллярным белкам и подтверждается предыдущими исследованиями протеаз этой культуры [9]. Препараты грибов *A. alliaceus* 7dN1 и *A. clavatus* A16, наиболее перспективные по результатам измерения активности спектрофотометрически, были многокомпонентными. Однако для заключения о количестве и активности отдельных протеаз в этих препаратах недостаточно данных.

Таким образом, микромицеты рода *Aspergillus* представляются перспективными продуцентами

протеаз, гидролизующих фибриллярные белки и востребованных в различных областях от медицины до биodeградации. Культура *A. fumigatus* D1 проявила высокую активность по отношению к фибрину как при слабокислой реакции среды, так и при нейтральном pH, что говорит о стабильности ферментов этого штамма и возможности их применения в широких диапазонах значения pH, что бывает важно при промышленных обработках материалов. Содержание же лишь одного белка в препарате *A. fumigatus* D1 облегчит его очистку и позволит использовать в фармацевтике. Многокомпонентные препараты *A. alliaceus* 7dN1 и *A. clavatus* A16 обладают способностью к разрушению широкого спектра фибриллярных белков, что указывает на их перспективность в качестве агентов для биodeградации. Возможно, однокомпонентный препарат *A. ustus* 1, показавший активность, сопоставимую с действием терилитина, может стать альтернативным агентом для раневой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00674). Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yeo J., Jung G., Tarakanova A., Martín-Martínez F.J., Qin Z., Cheng Y., Zhang Y.W., Buehler M.J. Multiscale modeling of keratin, collagen, elastin and related human diseases: Perspectives from atomistic to coarse-grained molecular dynamics simulations // *Extreme Mech. Lett.* 2021. Vol. 20. P. 112–124.
2. Sweeney S.M., Orgel J.P., Fertala A., McAuliffe J.D., Turner K.R., Di Lullo G.A., Barnes A.M., Marini J.C., San Antonio J.D. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 30. P. 21187–21197.
3. Schweizer J., Bowden P.E., Coulombe P.A., Langbein L., Lane E.B., Magin T.M., Maltais L., Omary M.B., Parry D.A.D., Rogers M.A., Wright M.W. New consensus nomenclature for mammalian keratins // *J. Cell Biol.* 2006. Vol. 174. N 2. P. 169–174.
4. Libby P., Bonow R.O., Mann D.L., Tomaselli G.F., Bhatt D., Solomon S.D., Braunwald E. Braunwald's heart disease-e-book: A textbook of cardiovascular medicine. Elsevier, 2021. 2032 pp.
5. 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. Vol. 6. N 3. P. 250–255.
6. Erdevi O., Atasay B., Arsan S. Collagenase application for amputation in a preterm // *Pediatr. Dermatol.* 2007. Vol. 24. N 2. P. 195–196.
7. Hassan M.A., Abol-Fotouh D., Omer A.M., Tamer T.M., Abbas E. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. Vol. 154. P. 567–583.
8. Kumar J., Singh I., Kushwaha R.K.S. Keratinophilic fungi: Diversity, environmental and biotechnological implications // *Progress in Mycology* / Eds. T. Satyanarayana, S.K. Deshmukh, and M.V. Deshpande. Singapore: Springer, 2021. P. 419–436.
9. 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-proteins hydrolysis // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. Vol. 57. N 2. P. 200–205.
10. Kate S., Pethe A. Study of collagenase production by *Penicillium* sp. isolated from deteriorated leather sample // *J. Adv. Sci. Res.* 2022. Vol. 13. N 01. P. 227–234.
11. Cardoso K.B.B., Nascimento M.C., Batista A.C., de Melo Oliveira V., Nascimento T.P., da Silva Batista J.M., Costa R.M.P.B., Pastrana L., Porto A.L.F. Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes // *Res., Soc. Dev.* 2022. Vol. 11. N 2: e13611225449.
12. Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. Продукция протеиназ с плазминоподобной и активирующей прекалликреин активностью микромицетом *Aspergillus terreus* // Прикл. биохим. микробиол. 2018. Т. 54. № 2. С. 195–200.
13. 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 // Микол. фитопатол. 2019. Т. 53. № 4. С. 229–235.
14. Osmolovskiy A.A., Schmidt L., Orekhova A.V., Komarevtsev S.K., Kreyer V.G., Shabunin S.V., Egorov N.S. Action of extracellular proteases of *Aspergillus flavus* and

Aspergillus ochraceus micromycetes on plasma hemostasis proteins // Life. 2021. Vol. 11. N 8: 782.

15. Osmolovskiy A.A., Schmidt L., Orekhova A.V., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Effect of proteinase from *Aspergillus fumigatus* on blood plasma proteins // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2021. Vol. 76. N 2. P. 71–76.

16. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid // Anal. Biochem. 1985. Vol. 150. N 1. P. 76–85.

17. Фокичев Н.С., Корниенко Е.И., Шаркова Т.С., Крейер В.Г., Осмоловский А.А. Тромболитическая активность и свойства препарата протеиназ, образуемых микромикетом *Tolypocladium inflatum* k1 // Микол. фитопатол. 2021. Т. 55. № 6. С. 449–456.

18. Kothary M.H., Chase T. Jr., Macmillan J.D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice // Infect. Immun. 1984. Vol. 43. N 1. P. 320–325.

19. Tamura Y., Suzuki S., Sawada T. Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice // Microb. Pathog. 1992. Vol. 12. N 3. P. 237–244.

20. Khosravi A.R., Mahdavi Omran S., Shokri H., Lotfi A., Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis // J. Mycol. Med. 2012. Vol. 22. N 2. P. 167–172.

Поступила в редакцию 21.06.2022

После доработки 28.07.2022

Принята в печать 29.07.2022

RESEARCH ARTICLE

***Aspergillus* proteolytic enzymes hydrolyzing fibrillar proteins for biomedicine and biotechnological process**

S.N. Timorshina , E.A. Popova , A.A. Galiakberova, A.G. Ochneva, A.A. Osmolovskiy* 

¹ Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

Fibrillar proteins play a significant role in the living organisms functioning, and recently much attention has been paid to them as targets in the therapy and diagnosis of various diseases, substrates for the biopolymers production, as well as industrially important proteins that are key agents in the textile and food manufacture. To implement the development of these directions, fibrillar proteins hydrolysis and processing methods are needed, the most promising of which is the use of proteolytic enzymes. 11 enzyme preparations obtained by cultivation of micromycetes belong to the genus *Aspergillus* and containing from 1 to 10 proteins were studied for the ability to hydrolyze fibrillar proteins: collagen, keratin, fibrin and elastin. The proteolytic enzymes of *A. alliaceus* 7dN1, *A. clavatus* A16, and *A. ustus* 1 showed an activity comparable to or higher than that of the commercial preparation Terrilitin used in wound therapy. The *A. fumigatus* D1 enzyme preparation also showed high level of fibrinolytic activity.

Keywords: *proteases, fibrillar proteins, collagenases, keratinases, fibrinolytic enzymes, elastases, Aspergillus*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 22-24-00674. The studies were performed without the use of animals and without involving people as subjects. The authors declare no conflict of interest.

Сведения об авторах

Тиморшина Светлана Наильевна — мл. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: timorshina.svetlana@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2963-4368>

Попова Елизавета Андреевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: e.a.popova1994@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0334-4234>

Галиакберова Аделя Альбертовна — аспирант кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: adgaliakberova@gmail.com

Очнева Александра Геннадьевна — инженер-лаборант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aleksochneva@yandex.ru

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, доцент кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6672-0551>