

## МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.222.3:577.152.34

## СЕКРЕЦИЯ МИКРОМИЦЕТАМИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ, АКТИВНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФИБРИЛЛЯРНЫМ БЕЛКАМ

Е.А. Попова<sup>1</sup>, Д.М. Бедненко<sup>1</sup>, А.А. Осмоловский<sup>1,\*</sup>,  
В.Г. Крейер<sup>1</sup>, И.Б. Котова<sup>1</sup>, Н.С. Егоров<sup>2</sup><sup>1</sup>Кафедра микробиологии и <sup>2</sup>Международный биотехнологический центр, биологический факультет,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

\*e-mail: aosmol@mail.ru

Показано, что микромицеты *Aspergillus ustus* 1 и *Tolypocladium inflatum* k1 секретируют протеолитические ферменты, обладающие высокой коллагенолитической, фибринолитической и эластолитической активностью. Активность протеиназ, гидролизующих фибриллярные белки, определяемая по расщеплению азоколлагена, у *T. inflatum* k1 составила  $122,6 \cdot 10^{-3} E_{A3K}/мл$  у *A. ustus* 1 и  $69,7 \cdot 10^{-3} E_{A3K}/мл$  ( $E_{A3K}$  — количество расщепившегося за 1 мин азоколлагена в микрограммах). Максимальные значения активности наблюдались при культивировании в глубинных условиях *A. ustus* 1 в течение 4 сут, а *T. inflatum* k1 — в течение 5 сут. Показано, что максимумы проявления коллагенолитической и общей протеолитической активности при культивировании у *A. ustus* 1, в отличие от *T. inflatum* k1, разнесены во времени, что, предположительно, может упростить процедуру получения активных по отношению к фибриллярным белкам протеиназ.

**Ключевые слова:** протеиназы микромицетов, протеолитическая активность, фибринолитические ферменты, коллагенолитические ферменты, эластолитические ферменты, энзиматический индекс

Протеолитические ферменты, высокоактивные по отношению к фибриллярным белкам, находят свое применение в различных промышленных отраслях. Например, для размягчения мясного сырья в пищевой промышленности и шкур животных в легкой промышленности используют коллагенолитические протеиназы [1]. Протеиназы, обладающие фибринолитической активностью, входят в состав препаратов, необходимых для комплексной тромболитической терапии, что делает их важным продуктом медицинской промышленности [2, 3].

Существующие способы получения подобных ферментов обладают некоторыми недостатками. Так, технология получения брахиуринов из гепатопанкреаса камчатских крабов отличается образованием большого количества отходов во время производственного процесса, требующих утилизации [4]. Среди бактериальных продуцентов коллагенолитических ферментов наиболее активным является *Clostridium hystolicum* — анаэробная спорообразующая патогенная бактерия, возбудитель газовой гангрены [5]. Использование такого продуцента требует повышенных мер безопасности на всех стадиях производства. В последнее время все большее внимание в качестве источников коллагенолитических и фибринолитических ферментов уделяется микромицетам. Среди продуцентов таких протеиназ известны представители родов *Alternaria*,

*Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium* [1–3]. Однако образуемые некоторыми видами этих микромицетов ферменты не всегда по своим свойствам оказываются перспективными для применения. Поэтому изучение коллагенолитических и фибринолитических ферментов, продуцируемых микромицетами, и поиск среди них наиболее подходящих по-прежнему остаются актуальными.

Протеолитическая активность у обнаруженных в последнее время штаммов микромицетов *Beauveria bassiana* 2, *Tolypocladium inflatum* k1, *Aspergillus ustus* 1 и *Purpureocillium lilacinum* k1 может представлять значительный интерес [3]. Известно, что для микромицетов—энтомопатогенов, таких как *B. bassiana* 2 и *T. inflatum* k1, характерен широкий спектр образуемых внеклеточных протеолитических ферментов, что обусловлено их паразитическим образом жизни, а именно необходимостью преодоления жестких покровов насекомых при прорастании спор [6, 7]. Для микромицетов—сапротрофов *A. ustus* 1 и *P. lilacinum* k1 показаны высокие значения фибринолитической активности, что позволяет предположить образование и других, высокоактивных по отношению к фибриллярным белкам, ферментов [3].

Целью работы было изучение протеолитической активности *Beauveria bassiana* 2, *Tolypocladium inflatum* k1, *Aspergillus ustus* 1 и *Purpureocillium lilacinum* k1 по отношению к фибриллярным белкам.

## Материалы и методы

**Объекты исследования и их культивирование.** В работе были изучены микромицеты из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, отобранные ранее в качестве продуцентов протеолитических ферментов: *Beauveria bassiana* 2, *Tolypocladium inflatum* k1, *Aspergillus ustus* 1, *Purpureocillium lilacinum* k1 [3].

Выявление протеолитического потенциала штаммов проводили при поверхностном культивировании в чашках Петри на средах следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5,  $\text{MgSO}_4$  – 0,25, пептон – 5,0, казеинат натрия, желатин, фибрин, эластин – 10,0, агар – 15,0 [8]. Посев производили уколом в центр чашки, измерения диаметров зон гидролиза и колоний проводили через 7 сут. Энзиматический индекс (EI) рассчитывали по следующей формуле –  $EI = \frac{EI}{(D+d)}$ , где  $D$  – диаметр колонии в мм, а  $d$  – диаметр зоны гидролиза в мм [8–10].

Культивирование микромицетов в глубинных условиях проводили в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды на орбитальных качалках (200 об/мин) при 28°C. Выращенные на скошенном сусло-агаре 7-суточные культуры использовали в качестве посевного материала. Процесс культивирования осуществляли в две стадии: первые двое суток – в посевной среде, содержащей сусло, глюкозу и пептон [8], затем часть биомассы переносили в ферментационную среду следующего состава (г/л): глицерин – 70,0, глюкоза – 30,0, соевая мука – 5,0, пептон – 5,0,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 0,5,  $\text{MgSO}_4$  – 0,5,  $\text{KCl}$  – 0,5.

**Определение протеолитической активности.** Общую протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона-Хагихары по количеству тирозина в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктах протеолиза после 10-минутного гидролиза 1%-ного раствора казеина в 0,1 М Трис- $\text{HCl}$  буфере (рН 8,0–8,2, 37°C), как описано ранее [11]. Активность выражали в мкМ тирозина в минуту ( $E_{\text{Тир}}$ ).

Коллагенолитическую активность определяли колориметрически с использованием азоколлагена по общепринятой методике. Активность выражали как количество расщепившегося за 1 мин азоколлагена в микрограммах ( $E_{\text{АЗК}}$ ) [3, 12].

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 (“BioSan”, Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Hitachi, Япония).

Опыты проводили в трех повторностях. Приведенные результаты представляют собой средние значения, ошибка которых не превышала 5–7%. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы MS Excel 2010.

## Результаты и их обсуждение

Поверхностное культивирование *Beauveria bassiana* 2, *Tolypocladium inflatum* k1, *Aspergillus ustus* 1 и *Purpureocillium lilacinum* k1 на чашках Петри с белковыми субстратами – казеинатом натрия, желатином, фибрином и эластином – позволило провести оценку действия секретируемых протеиназ на глобулярные и фибриллярные белки. Гидролиз казеината натрия в составе среды показывает общий протеолитический потенциал микромицетов, а фибриллярных белков – специфичность секретируемых ими протеиназ. Величину протеолитического потенциала использованных штаммов рассчитывали по величине EI на средах с казеином ( $EI_{\text{Каз}}$ ), желатином ( $EI_{\text{Жел}}$ ), фибрином ( $EI_{\text{Фиб}}$ ) и эластином ( $EI_{\text{Эл}}$ ).

В таблице представлены EI для каждого штамма микромицетов, а также отношения их величин друг к другу.

Как видно из таблицы, наибольшее значение EI было показано для микромицета *A. ustus* 1 на среде с желатином и составило 1,96. Проявление зон гидролиза данного субстрата соответствует коллагенолитической активности образуемого *A. ustus* 1 комплекса протеиназ, выявленной ранее [11]. Од-

Таблица

Энзиматические индексы микромицетов при росте на средах с различными белковыми субстратами

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

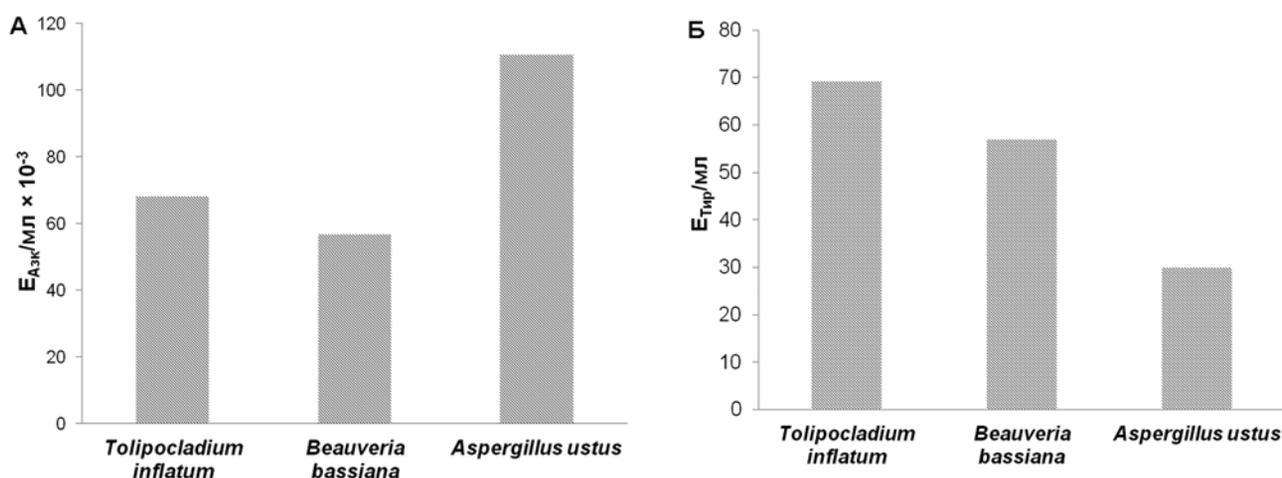


Рис. 1. Общая протеолитическая (А) и коллагенолитическая (Б) активность микромицетов *Beauveria bassiana* 2, *Tolipocladium inflatum* k1 и *Aspergillus ustus* 1

нако в случае с другими фибриллярными белками протеиназы, секретируемые *A. ustus* 1, не проявляют столь высокой активности. Значения EI при росте микромицетов на средах с фибрином и эластином составили 1,16 и 1,13, соответственно. Для оценки эффективности действия протеиназ продуцентов на фибриллярные белки важным является соотношение целевой (специфической) и неспецифической активности [11, 13, 14], которую можно представить в виде соотношений EI, полученных при росте микромицетов на среде с казеинатом натрия и на средах с каждым из изученных фибриллярных белков. Для *A. ustus* 1 значение  $EI_{\text{каз}}/EI_{\text{жел}}$  оказалось небольшим (0,83). Это указывает на высокий уровень секреции ферментов, расщепляющих преимущественно фибриллярные, а не глобулярные белки.

Значения EI для микромицетов *T. inflatum* k1 и *B. bassiana* 2 оказались достаточно близкими и составили 1,75 и 1,73 для среды с казеинатом натрия, 1,64 и 1,60 для среды с желатином, 1,25 и 1,17 для среды с фибрином, 1,56 и 1,67 для среды с эластином, соответственно. Помимо достаточно высоких значений EI, полученных на среде с желатином, микромицеты *T. inflatum* k1 и *B. bassiana* 2 проявляют протеолитическую активность и по отношению к эластину. Значения, полученные для *P. lilacinum* k1, были достаточно низкими, что позволило исключить данный штамм из дальнейшей работы.

Для количественного определения активности протеиназ микромицетов по отношению к фибриллярным белкам в качестве общепринятого субстрата реакции использовали азоколлаген [1, 15], по отношению к глобулярным — казеин [16]. Были изучены коллагенолитическая и общая протеолитическая активность ферментов, образуемых *A. ustus* 1, *B. bassiana* 2 и *T. inflatum* k1 на 5-е сут культивирования в глубинных условиях. Как следует из данных, представленных на рис. 1, А и Б, наиболее высокое

значение коллагенолитической активности показано для *A. ustus* 1 ( $110,6 \cdot 10^{-3} E_{\text{A3K}}/\text{мл}$ ). Оно превышало соответствующее значение активности *T. inflatum* k1 в 1,7 раз, а *B. bassiana* 2 — почти в 2 раза. Общая протеолитическая активность была выше у протеиназ, образуемых *T. inflatum* k1 ( $69,2 E_{\text{Типр}}/\text{мл}$ ), что оказалось на 18% больше активности *B. bassiana* 2 и более чем в 2 раза превысило значение активности протеиназ *A. ustus* 1.

Учитывая высокие значения активности протеиназ, образуемых данными штаммами, по отношению к фибриллярным белкам, мы изучили динамику накопления протеолитических ферментов микромицетами *A. ustus* 1 и *T. inflatum* k1 (рис. 2, А и Б). Было показано, что коллагенолитическая активность протеиназ, секретируемых *A. ustus* 1, достигает максимума на 4-е сут культивирования и составляет  $122,6 \cdot 10^{-3} E_{\text{A3K}}/\text{мл}$ ; максимальное значение общей протеолитической активности приходилось на 5-е сут и составило  $30,5 E_{\text{Типр}}/\text{мл}$  (рис. 2, А). Стоит отметить, что максимальное проявление как общей протеолитической, так и коллагенолитической активности у *A. ustus* 1 наблюдалось только в одной точке, в отличие от активности протеиназ, образуемых *T. inflatum* k1. Для данного микромицета было характерно проявление двух пиков общей протеолитической активности, соответствующих 3-м ( $70,3 E_{\text{Типр}}/\text{мл}$ ) и 5-м ( $64,4 E_{\text{Типр}}/\text{мл}$ ) сут, и одного максимума коллагенолитической активности — на 5-е сут,  $69,7 \cdot 10^{-3} E_{\text{A3K}}/\text{мл}$  (рис 2, Б).

Результаты изучения динамики накопления протеолитических ферментов микромицетами *A. ustus* 1 и *T. inflatum* k1 демонстрируют ряд технологических преимуществ штамма *A. ustus* 1. Так, активность протеиназ *A. ustus* 1, гидролизующих фибриллярные белки, в 1,7 раз выше, чем у *T. inflatum* k1, а максимум накопления изученных протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 в среде наблюдается на сутки раньше,

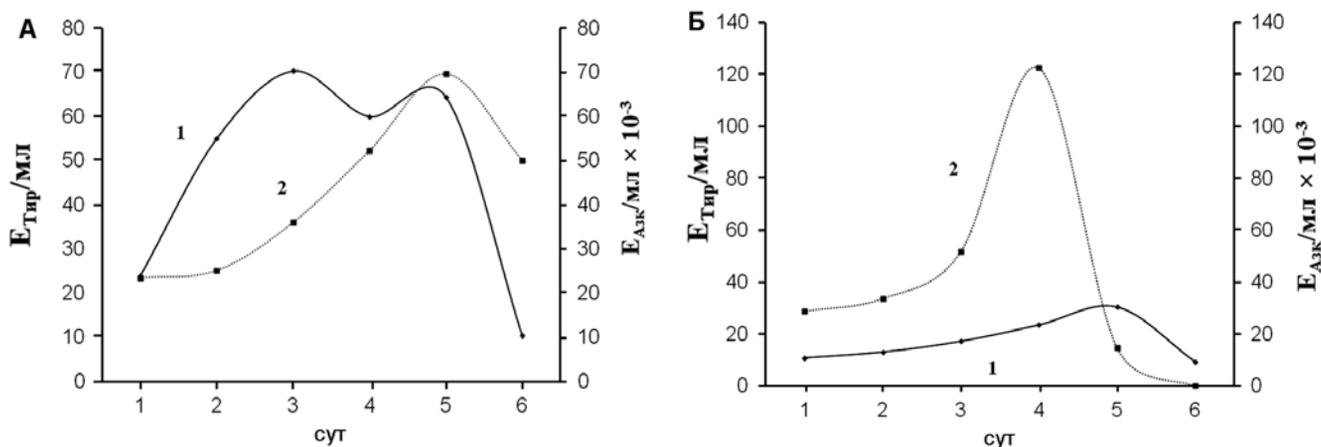


Рис. 2. Динамика накопления протеолитических ферментов микромицетами *Aspergillus ustus* 1 (А) и *Tolypocladium inflatum* k1 (Б). 1 – общая протеолитическая активность, 2 – коллагенолитическая активность

чем у *T. inflatum* k1. Кроме того, максимумы проявления коллагенолитической и общей протеолитической активности при культивировании у *A. ustus* 1 разнесены во времени, в отличие от *T. inflatum* k1, что, предположительно, может упростить процедуру получения активных в отношении фибриллярных белков протеиназ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wanderley M.C. de A., Neto J.M.W.D., Filho J.L. de L., Lima C. de A., Teixeira J.A.C., Porto A.L.F. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review // Braz. J. Microbiol. 2017. Vol. 48. N 1. P. 13–24.
2. Kotb E. The biotechnological potential of fibrinolytic enzymes in the dissolution of endogenous blood thrombi // Biotechnol. Prog. 2014. Vol. 30. N 3. P. 656–672.
3. 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.
4. Rudenskaya G.N. Brachyurins, serine collagenolytic enzymes from crabs // Russ. J. Bioorg. Chem. 2003. Vol. 29. N 2. P. 101–111.
5. Watanabe K. Collagenolytic proteases from bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. Vol. 63. N 5. P. 520–526.
6. Hasan S., Ahmad A., Purwar A., Khan N., Kundan R., Gupta G. Enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* // Bioinformation. 2013. Vol. 9. N 5. P. 238–242.
7. Yike I. Fungal proteases and their pathophysiological effects // Mycopathologia. 2011. Vol. 171. N 5. P. 299–323.
8. Osmolovskiy A.A., Rukavitsyna 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.
9. Gupta P., Samant K., Sahu A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential // Int. J. Microbiol. 2012. Vol. 22. Article ID 578925.
10. Behera B.C., Parida S., Dutta S.K., Thatoi N.H. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from agrofore soil of Mahanadi river delta and their cellulose pro-

дукция // Am. J. Microbiol. Res. 2014. Vol. 2. N 1. P. 41–46.
- 11. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1 // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 1. P. 62–66.
- 12. Chavira R. Jr., Burnett T.J., Hageman J.N. Assaying proteinase with Azocoll // Anal. Biochem. 1984. Vol. 136. N 2. P. 446–450.
- 13. El-Aassar S.A., El-Badry H.M., Abdel-Fattah A.F. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. Vol. 33. N 1. P. 26–30.
- 14. Osmolovskiy A.A., Kurakov A.V., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Ability of extracellular proteinases of micromycetes *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus fumigatus*, and *Aspergillus sydowii* to affect proteins of the human haemostatic system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 1. P. 20–24.
- 15. Lima C.A., Viana Marques D.A., Neto B.B., Lima Filho J.L., Carneiro-da-Cunha M.G., Porto A.L.F. Fermentation medium for collagenase production by *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 // Biotechnol. Prog. 2011. Vol. 27. N 5. P. 1470–1477.
- 16. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Буяк Л.И., Крейер В.Г. Гидролитическая система нокардиоформной бактерии *Nocardia minima* в процессе ее роста, развития и дифференциации // Микробиология. 1991. Т. 60. № 4. С. 637–643.

Поступила в редакцию  
27.07.2017 г.

Принята к печати  
09.09.2017 г.

## MICROBIOLOGY

## SECRETION OF EXTRACELLULAR PROTEINASES, ACTIVE AGAINST FIBRILLARY PROTEINS, BY MICROMYCETES

*E.A. Popova*<sup>1</sup>, *D.M. Bednenko*<sup>1</sup>, *A.A. Osmolovskiy*<sup>1,\*</sup>, *V.G. Kreyer*<sup>1</sup>, *I.B. Kotova*<sup>1</sup>, *N.S. Egorov*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Microbiology and* <sup>2</sup>*International Biotechnology Center,  
School of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*  
*\*e-mail: aosmol@mail.ru*

Micromycetes *Aspergillus ustus* 1 and *Tolypocladium inflatum* k1 were shown to produce proteolytic enzymes with high collagenolytic, fibrinolytic and elastolytic activity. The activity of the proteinases against fibrillar proteins was determined by the cleavage of azocollagen: collagenolytic activity was  $122.6 \cdot 10^{-3} E_{Azc}/ml$  ( $E_{Azc}$  – the amount of azocollagen cleaved in 1 min in micrograms) for proteinases produced by *A. ustus* 1 and  $69.7 \cdot 10^{-3} E_{Azc}/ml$  for proteinases produced by *T. inflatum* k1. The maximum activity values were observed at submerged cultivation of *A. ustus* 1 during 4 days, and *T. inflatum* k1 during 5 days. It has been shown that the maximum of collagenolytic and general proteolytic activity during the cultivation of *A. ustus* 1 are time-separated, unlike *T. inflatum* k1. This fact, presumably, can simplify the procedure for obtaining of active proteinases.

**Keywords:** *proteinases of micromycetes, proteolytic activity, fibrinolytic enzymes collagenolytic enzymes, elastolytic enzymes, enzymatic index*

**Сведения об авторах**

*Попова Елизавета Андреевна* – науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: veliana@gmail.com

*Бедненко Дарья Михайловна* – магистрант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: bi17bi03da@mail.ru

*Осмоловский Александр Андреевич* – канд. биол. наук, ст. преп. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru

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

*Котова Ирина Борисовна* – докт. биол. наук, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-72; e-mail: kira1959@gmail.com

*Егоров Николай Сергеевич* – докт. биол. наук, проф. Международного биотехнологического центра МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: nsegorov21@mail.ru