

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 582.282.123.4:577.152.34

СЕКРЕЦИЯ ПРОТЕИНАЗ С ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ
МИКРОМИЦЕТАМИ РОДА *ASPERGILLUS*А.А. Осмоловский^{1,*}, Е.С. Звонарева¹, В.Г. Крейер¹, Н.А. Баранова¹, Н.С. Егоров²¹Кафедра микробиологии, биологический факультет и ²Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: aosmol@mail.ru

Изучена активность внеклеточных протеиназ у 11 штаммов разных видов аспергиллов. Сравнение значений энзиматических индексов при росте штаммов на агаризованных средах с казеином и фибрином позволило отобрать штамм *Aspergillus terreus* 2 в качестве перспективного продуцента фибринолитических протеиназ. Выявлено, что протеазы *A. terreus* 2 проявляют максимальную активность при рН 8,0. Наибольшие значения фибринолитической и общей протеолитической активности, выраженной в $E_{\text{Тир}}$ (количество тирозина в мкмольях, освобожденного за 1 мин при гидролизе фибрина или казеина), составили 34,0 и 358,3, соответственно. Максимальная активность протеиназ была выявлена при росте продуцента на среде, содержащей источники только аминного азота (гидролизат рыбной муки и пептон). Однако количество внеклеточного белка и удельная фибринолитическая и общая протеолитическая активность были больше на среде с источниками как минерального, так и аминного азота (гидролизат рыбной муки и нитрат натрия), нежели на среде, содержащей в качестве источников азота гидролизат рыбной муки и пептон.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, аспергиллы, фибринолитические ферменты, тромболитические средства, плазминоподобная активность, источники азота

Секреция ферментов, гидролизующих труднорастворимые в воде белковые субстраты, — свойство, присущее микромицетам разных экологических и систематических групп [1, 2]. Внеклеточные протеолитические ферменты микромицетов способны расщеплять такие фибриллярные белки как кератин, эластин, коллаген, фибрин, причем активность одной и той же протеиназы по отношению к каждому из них различна. Эффективный лизис фибрина — как основного полимера в сгустке тромба в кровеносных сосудах или мелких полых медицинских устройствах (типа катетеров) — задача, решаемая с помощью тромболитических средств, главными компонентами которых являются фибринолитические ферменты [3]. Протеиназы с фибринолитической (плазминоподобной) активностью образуют многие микромицеты, в частности, представители рода *Aspergillus*. Среди протеиназ, образуемых аспергиллами, встречаются кислые, нейтральные и щелочные, проявляющие максимальную фибринолитическую активность при различных значениях рН. Показано, что такие протеиназы в разной степени обладают неспецифической протеолитической активностью, а именно способностью к гидролизу глобулярных белков [4–8]. Соответственно, эти факторы накладывают ограничения на возможности их применения в медицине (чувствительность к ингибиторам плазмы крови, неспецифичность действия, токсичность и аллергия) и технологии (низкая эффективность тромболитизиса). В связи с этим

в последнее время значительно увеличилось количество исследований, направленных на поиск среди аспергиллов новых продуцентов фибринолитических протеиназ, причем как видов, ранее не изученных в этом отношении, так и известных видов — изолятов конкретных экотопов, для определения их биотехнологического потенциала [4–8].

Целью работы было изучение фибринолитической активности ряда штаммов аспергиллов и отбор активного продуцента фибринолитических протеиназ.

Материалы и методы

Объекты исследования и их поддержание. Использовали штаммы микромицетов *A. alliaceus* 7dN1, *A. flavipes* A17, *A. flavus* 1, *A. fumigatus* D1, *A. niger* 1, *A. nidulans* 203, *A. oryzae* k1, *A. sclerotiorum* 1, *A. sydowii* 1, *A. terreus* 2 и *A. versicolor* 1 из коллекции кафедры микологии и альгологии, а также кафедры микробиологии МГУ, ранее не изученные в отношении образования фибринолитических ферментов. Поддержание штаммов осуществляли в пробирках на скошенной среде 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 аспергиллов в чашках Петри на средах состава (в %): KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,025, пептон — 0,5, казеин или бычий

фибрин — 1,0, агар — 1,5. Культивирование проводили в течение 5–7 сут при температуре 28°C. Выявление зон гидролиза осуществляли после добавления в чашки Петри реактива Кумасси бриллиантового голубого G-250 с хлорной кислотой [9]. Протеолитический потенциал микромицета определяли по значению энзиматического индекса, рассчитанного как соотношение диаметров (в мм) колонии с зоной гидролиза и колонии без нее [10, 11].

Условия культивирования и определение протеолитической активности. Отобранный штамм культивировали в глубинных условиях на орбитальной качалке (200 об/мин) в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28°C в течение 2 сут на среде, содержащей суло, глюкозу и пептон [9], после чего часть полученного посевного материала переносили в среды следующего состава (в %): глюкоза — 3,5, крахмал — 0,1, гидролизат рыбной муки — 0,5, пептон — 0,5, NaCl — 0,2, K_2HPO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05 (среда №1); глюкоза — 3,0, глицерин — 7,0, гидролизат рыбной муки — 0,5, NaNO_3 — 0,2, K_2HPO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05 (среда № 2) с последующим культивированием в течение 5 сут.

Активность внеклеточных протеиназ определяли в фильтрате культуральной жидкости при разных значениях pH с фибрином и казеином, приготовленными на 0,1 М натрий-ацетатном буфере (pH 5,0 и 6,0) и 0,1 М буфере Трис-HCl (pH 7,0 и 8,0), как описано ранее [8]. Реакции с субстратами проводили по модифицированному методу Ансона-Хагхары, инкубируя при 37°C 200 мкл культуральной жидкости и 400 мкл 1%-ных суспензии фибрина или раствора казеина, приготовленных на соответствующем буфере, как описано ранее [8, 12]. За единицу активности ($E_{\text{тип}}$) принимали количество мкмоль тирозина, образовавшегося при расщеплении фибрина или казеина в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости. Реакции проводили при постоянном перемешивании в термощейкере TS-100 (BioSan, Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Hitachi Ltd, Япония). Для расчета общей протеолитической активности строили калибровочную кривую по тирозину.

Определение белка в культуральной жидкости. Концентрацию белка определяли при 280 нм после предварительного осаждения белков культуральной жидкости дезоксихолатом натрия и трихлоруксусной кислотой, как описано ранее [8].

Повторность опытов трехкратная. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы MS Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

Мицелиальные грибы, в частности аспергиллы, характеризуются способностью гидролизовать содержащиеся в окружающей среде полимерные субстраты, в том числе белковые. Введение белковых субстратов в состав агаризованных сред позволяет

судить о проявлении микромицетами протеолитической активности не только качественно, но и количественно, путем нахождения соотношения диаметров колонии с зоной гидролиза и самой колонии (при посеве уколом), т.е. определения энзиматического индекса. Способность образовывать внеклеточные протеолитические ферменты у использованных в работе микромицетов рода *Aspergillus* изучали на двух агаризованных средах: содержащих казеин или фибрин в качестве белкового субстрата. Различия в значениях энзиматических индексов, выявленных для одного штамма, позволяют судить о выраженности протеолитической активности по отношению к глобулярным или фибриллярным белкам, соответственно. Это особенно важно для направленного поиска продуцентов, образующих протеиназы, активные по отношению к фибрину.

В табл. 1 приведены данные протеолитической активности аспергиллов при росте на агаризованных средах с казеином и фибрином. Как видно, среди 11 изученных штаммов наибольшую казеинолитическую активность проявили микромицеты *A. fumigatus* D1, *A. sydowii* 1 и *A. versicolor* 1. Значения энзиматического индекса на среде с казеином у этих штаммов составило больше 2. При этом энзиматический индекс на среде с фибрином был в 2,0–2,3 раза меньше. Величина этого показателя у микромицетов *A. flavus* 1 и *A. sclerotiorum* 1 также на среде с казеином была выше, чем на среде с фибрином, в 1,15–1,2 раза (табл. 1).

Для штаммов *A. alliaceus* 7dN1, *A. flavipes* A17, *A. niger* 1, *A. nidulans* 203 и *A. oryzae* k1 значения энзиматических индексов при росте на средах с казеином и фибрином оказались сопоставимы. По всей видимости, проявление их протеолитической активности не связано со специфичностью образуемых ими протеиназ, они могут гидролизовать глобулярные и фибриллярные белки в равной степени.

Микромицет *A. terreus* 2 также проявлял схожую протеолитическую активность при росте на средах с казеином и фибрином, однако энзиматический индекс микромицета на среде с фибрином был выше, чем у остальных микромицетов (табл. 1). В связи с этим штамм *A. terreus* 2 был отобран для дальнейших исследований.

В табл. 2 показаны результаты определения общей протеолитической и фибринолитической активности *A. terreus* 2. Активность внеклеточных протеиназ этого штамма была изучена в интервале значений pH реакционной смеси 5,0–8,0 с шагом в единицу. Известно, что протеиназы аспергиллов проявляют в этом диапазоне pH наибольшую активность [13]. Из табл. 2 видно, что внеклеточные протеиназы штамма *A. terreus* 2 обладают максимальной активностью при pH реакции 8,0, минимальной — при pH реакции 5,0. Эти данные согласуются с данными, полученными ранее при изучении влияния pH реакции на протеолитическую активность других аспергиллов — *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 [8].

Таблица 1

Протеолитический потенциал аспергиллов при росте на агаризованных средах с казеином и фибрином

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. alliaceus</i> 7dN1	43	50	45	52	1,162	1,156
<i>A. flavipes</i> A17	58	64	25	27	1,103	1,080
<i>A. flavus</i> 1	32	40	40	42	1,250	1,050
<i>A. fumigatus</i> D1	19	39	9	10	2,053	1,111
<i>A. niger</i> 1	59	61	59	60	1,034	1,017
<i>A. nidulans</i> 203	59	60	48	49	1,017	1,020
<i>A. oryzae</i> k1	55	63	27	31	1,145	1,148
<i>A. sclerotiorum</i> 1	28	33	45	46	1,179	1,022
<i>A. sydowii</i> 1	11	30	42	44	2,727	1,048
<i>A. terreus</i> 2	13	16	18	22	1,230	1,222
<i>A. versicolor</i> 1	6	16	25	27	2,667	1,080

Таблица 2

Общая протеолитическая и фибринолитическая активность микромицета *A. terreus* 2 при росте на средах № 1 и № 2 (пояснения в тексте)

рН реакции	Общая протеолитическая активность, E _{Тир}		Фибринолитическая активность, E _{Тир}	
	среда № 1	среда № 2	среда № 1	среда № 2
5,0	9,3	45,3	0,4	8,8
6,0	10,5	87,7	3,8	26,3
7,0	27,0	200,1	5,8	32,4
8,0	42,6	358,3	7,6	34,0

Ввиду смешанного типа азотного питания микромицетов, в частности аспергиллов, важным представляется сравнение протеолитической активности при культивировании штамма *A. terreus* 2 на средах с разными источниками азота. Так, на среде, содержащей источники только аминного азота – гидролизат рыбной муки и пептон (среда № 1), общая протеолитическая активность была в 8,4 раза ниже, чем на среде с источниками как аминного, так и минерального азота (гидролизат рыбной муки и нитрат натрия, среда № 2). Фибринолитическая активность внеклеточных протеиназ *A. terreus* 2 была также ниже на среде №1. Значения фибринолитической активности оказались в 4,5 раза меньше при культивировании продуцента на среде № 1, чем при культивировании на среде № 2 (табл. 2). В аналогичной работе с использованием в качестве продуцентов протеиназ *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 было показано, что протеолитическая активность первого микромицета выше на среде № 1, а второго – на среде № 2 [8]. Полученные данные могут сви-

детельствовать о различиях во влиянии источников азота на регуляцию секреции протеиназ этими микромицетами и указывают на важность изучения образования протеиназ микромицетами на средах с разными источниками белкового азота. Максимальные значения общей протеолитической активности у *A. terreus* 2 оказались в 3,7 и 11,2 раза больше, а фибринолитической активности – на 48,3 и 33,2% больше, чем у *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1, соответственно.

Определение содержания белка в культуральной жидкости *A. terreus* 2 показало, однако, что при росте продуцента на среде №1 количество секретируемого белка превышает в 4,5 раза количество белка, выделяемого в среду культивирования при росте на среде № 2, где наблюдалась максимальная протеолитическая активность. Вероятно, при росте на богатой среде микромицет продуцирует и другие внеклеточные ферменты. Значения удельных фибринолитической и общей протеолитической активности протеиназ *A. terreus* 2 также были больше на среде № 1, чем на среде № 2.

Одним из показателей эффективности протеиназ по отношению к гидролизу фибриллярных белков является соотношение фибринолитической и общей протеолитической активностей (соотношение ФА/ОПА) [8, 9, 14]. Для микромицета *A. terreus* 2 это соотношение составило 0,18 при росте на среде № 1 и 0,09 при росте на среде № 2 (рисунок). Аналогичные значения были получены при расчете соотношения указанных активностей на мкг белка. Такие различия, полученные при росте микромицета на средах с разными источниками азота, подтверждают высказанное ранее предположение о возможности управлять этим соотношением, изменяя

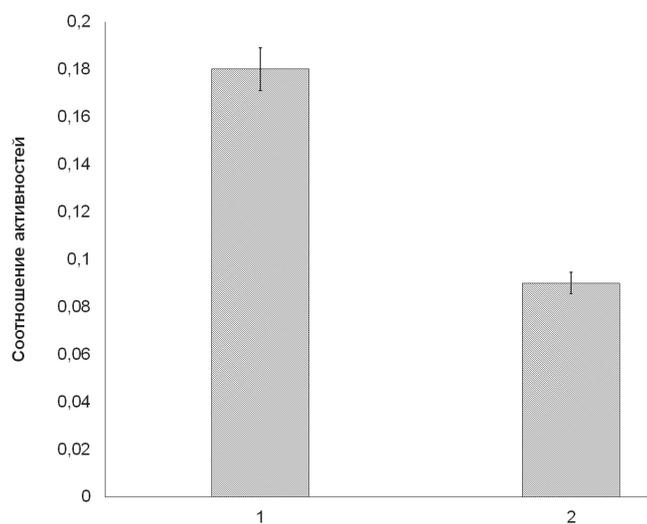


Рисунок. Соотношение показателей фибринолитической и общей протеолитической активности (на мг белка). 1 – на среде № 1, 2 – на среде № 2 (пояснения в тексте)

источники азотного питания в составе среды, что может привести к получению более активных по отношению к фибриллярным белкам протеиназ [8]. Сходные значения ФА/ОПА были получены и

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. Balami J.S., Chen R., Sutherland B.A., Buchan A.M. Thrombolytic agents for acute ischaemic stroke treatment: the past, present and future // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2013. Vol. 12. N 2. P. 145–154.
4. 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.
5. 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. Vol. 70. N 12. P. 1565–1574.
6. Aradhya P.K., Chavan M.D. Production and characterization of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus niger* // *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015. Vol. 3. N 9. P. 843–851.
7. Yadav S., Siddalingeshwara K.G. Screening and biosynthesis of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus japonicum* // *J. Drug Deliv. Therap.* 2015. Vol. 5. N 6. P. 60–62.
8. 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.
9. 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

для другого микромицета – *A. ochraceus* L-1, известного продуцента протеиназ с фибринолитической и активаторной по отношению к белкам системы гемостаза активностью [15, 16].

Полученные данные указывают на значительный биотехнологический потенциал микромицета *A. terreus* 2 как продуцента протеиназ с фибринолитической активностью.

Таким образом, среди 11 штаммов разных видов аспергиллов по значениям энзиматических индексов при росте штаммов на агаризованных средах с казеином и фибрином в качестве перспективного продуцента фибринолитических протеаз был отобран микромицет *A. terreus* 2. Показано, что протеазы *A. terreus* 2 проявляют максимальную активность при pH реакционной смеси 8,0. Наибольшие значения фибринолитической (34,0 Е_{тип}) и общей протеолитической (358,3 Е_{тип}) активности были выявлены при росте продуцента на среде, содержащей источники аминного азота, однако количество внеклеточного белка и удельные фибринолитическая и общая протеолитическая активность были больше на среде с источниками минерального и аминного азота, нежели на среде, содержащей только аминные источники азота.

Aspergillus ochraceus // *Microbiology.* 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.

10. 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.

11. Behera B.C., Parida S., Dutta S.K., Thatoi H.N. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from angrove soil of Mahanadi river delta and their cellulose production ability // *Am. J. Microbiol. Res.* 2014. Vol. 2. N 1. P. 41–46.

12. 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.

13. Nirmal N.P., Shankar S., Laxman R.S. Fungal proteases: an overview // *Int. J. Biotech. Biosci.* 2011. Vol. 1. N 1. P. 1–40.

14. 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.

15. 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.

16. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Properties of extracellular plasmin-like proteases of *Aspergillus ochraceus* micromycete // *Applied Biochem. Microbiol.* 2017. Vol. 53. N 4. P. 429–434.

Поступила в редакцию
11.09.2017

Принята в печать
12.12.2017

MICROBIOLOGY

SECRETION OF PROTEINASES WITH FIBRINOLYTIC ACTIVITY BY MICROMYCETES OF THE GENUS *ASPERGILLUS*

A.A. Osmolovskiy^{1,*}, *E.S. Zvonareva*¹, *V.G. Kreyer*¹, *N.A. Baranova*¹, *N.S. Egorov*²

¹*Department of Microbiology and* ²*International Biotechnology Center, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, 119234, Moscow, Russia*

**e-mail: aosmol@mail.ru*

Proteolytic activity of extracellular enzymes of 11 strains of different *Aspergillus* species was studied. Comparison of the enzymatic indices of strains grown on agar medium with casein and fibrin allowed us to select the strain *A. terreus* 2 as a promising producer of fibrinolytic proteases. It was found that *A. terreus* 2 proteases show maximum activity at pH 8.0. The highest values of fibrinolytic and total proteolytic activities expressed in U_{Tyr} (amount of micromoles of tyrosine released from fibrin or casein for 1 min) were 34.0 and 358.3, respectively. Maximums of activity were detected with when growing the producer on a medium containing only amine nitrogen sources (fish flour hydrolysate and peptone), however, the amount of extracellular protein and the specific fibrinolytic and total proteolytic activity were greater in the medium containing both mineral and amine nitrogen sources (fish flour hydrolysate and sodium nitrate), rather than on a medium containing fish flour hydrolysate and peptone as nitrogen sources.

Keywords: *proteinases of micromycetes, Aspergillus, fibrinolytic enzymes, thrombolytic agents, plasmin-like activity, nitrogen sources*

Сведения об авторах

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

Звонарева Елена Сергеевна — аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: zvonareva.es@gmail.com

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

Баранова Нина Андреевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Егоров Николай Сергеевич — докт. биол. наук, проф. Международного биотехнологического центра МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: nsegorov21@mail.ru