

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

Получение и стабильность комплексного препарата протеиназ *Aspergillus ochraceus* L-1 с фибринолитической и антикоагулянтной активностью

А.А. Осмоловский^{1,*}, А.В. Орехова^{1,2}, Э. Конти², В.Г. Крейер¹, Н.А. Баранова¹, Н.С. Егоров³¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²"La Sapienza" University of Rome, Piazzale Aldo Moro, 5, Rome, 00185, Italy;³Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: aosmol@mail.ru

Из культуральной жидкости микромицета *Aspergillus ochraceus* L-1 высаливанием сульфатом аммония с последующими диализом и депигментацией на фенолоанилиноформальдегидной смоле при рН буфера 8,2 был получен комплексный препарат протеолитических ферментов с удельной плазминоподобной активностью не менее 890 Е_{рNA}/мг и удельной активаторной к протеину С активностью не менее 130 Е_{рNA}/мг. Сравнение полученного препарата по казеинолитической, фибринолитической, фибриногенолитической и плазминоподобной активности с коммерческими аналогами — террилитином, трипсином и стрептокиназой — показало его перспективность для использования в качестве средства для разжижения гнойно-ожоговых ран и фибриновых сгустков. Полученный комплексный препарат протеиназ имел высокую стабильность при хранении в условиях отрицательных температур сроком до 9 мес.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, фибринолитическая активность, ферментные препараты, стабильность ферментов, депигментация, гемостатически активные средства

Препараты протеолитических ферментов широко используются в различных областях: в пищевой и легкой промышленности, химической промышленности, медицине [1, 2]. Большая доля таких препаратов приходится на протеазы микроорганизмов, в частности мицелиальных грибов [2, 3]. Хорошо известно, что микромицеты являются высокоактивными продуцентами протеолитических ферментов. Их легко культивировать на простых по составу средах, образуемые ими протеазы секретируются в окружающую среду, что значительно упрощает процесс их получения [4, 5]. Среди микромицетов разных систематических и эколого-трофических групп наибольшую протеолитическую активность проявляют представители рода *Aspergillus*, в секрете большинства из которых присутствуют кислые, нейтральные и щелочные протеиназы [6–10]. Это свойство, а также различия в субстратной специфичности образуемых аспергиллами протеиназ позволяют получать при их культивировании ферментные препараты для решения разных задач.

Препараты протеолитических ферментов, нашедшие или имеющие потенциальное применение в медицинской практике для терапии ожоговых и гнойных ран, фибринолиза и диагностики белков системы гемостаза, отличаются по чистоте,

спектру активности и направленности действия. В связи с этим постоянно ведется поиск и получение новых препаратов, способных превзойти аналоги по каким-либо характеристикам [1, 3, 10–13]. Ряд протеиназ аспергиллов, полученных в последнее время, в условиях *in vitro* показал эффективность гидролиза компонентов тромба [6, 10, 14]. В связи с этим исследования протеолитических ферментов, активных по отношению к белкам системы гемостаза, представляются чрезвычайно актуальными.

Одним из перспективных продуцентов протеиназ является микромицет *Aspergillus ochraceus* L-1. Он образует несколько изоферментов — щелочных сериновых протеиназ, близких по физико-химическим свойствам и обладающих плазминоподобной (фибринолитической) активностью и активирующим воздействием на протеин С — антикоагулянтный белок кровотока, препятствующий чрезмерному тромбообразованию [14–16]. Протеиназы *A. ochraceus* L-1 могут найти применение как в терапии, так и в диагностике заболеваний системы гемостаза.

Целью работы было получение и изучение стабильности в разных условиях хранения комплексного препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. ochraceus* L-1.

Материалы и методы

Получение препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. ochraceus* L-1. Культуру *A. ochraceus* L-1, выросшую в течение 7 сут в пробирке на скошенном сусло-агаре, переносили в качалочную колбу объемом 750 мл со 100 мл среды, содержащей сусло, глюкозу и пептон [14]. Культивирование проводили в течение 2 сут при 28°C и скорости вращения платформы 200 об./мин в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (BioSan, Латвия). После этого часть полученного посевного материала переносили в качалочные колбы со средой состава (в %): глюкоза — 3,5, крахмал — 0,125, гидролизат рыбной муки — 1,0, пептон — 0,1, NaCl — 0,2, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05, pH 5,5–6,0 [14] с последующим культивированием в течение 2 сут при тех же условиях. По истечении срока культивирования из культуральной жидкости, предварительно отделенной от биомассы микромицета фильтрованием через фильтровальную бумагу («ФС», Россия), проводили осаждение секретированных протеаз сульфатом аммония при степени насыщения 0,7, как было показано ранее [17]. Осадок, содержащий протеазы микромицета, отделяли центрифугированием (15000 g, 15 мин, 4°C) на центрифуге Beckman J2-21 (Beckman, Германия). Полученный осадок перерастворяли в 0,001 М Трис-НCl буфере (pH 8,2) и диализовали в диализном мешочке против этого же буфера 12 ч при 4°C. Диализат отделяли от нерастворившейся части центрифугированием (те же условия), супернатант замораживали жидким азотом и высушивали на лиофильной сушилке FreeZone 2.5 (Labconco, США). Полученный препарат хранили при -20°C. На всех этапах получения препарата проводили определение протеолитической активности и концентрации белка.

Депигментация препарата внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* L-1. Протеиназы отделяли от пигмента с помощью фенолоанилинформальдегидной смолы (ФАФ; Олайнский химический завод БИОЛАР, Латвия) [18–21]. Для подготовки анионита к работе ФАФ последовательно отмывали в дистиллированной воде и 0,1 М NaOH (10 об./об.) по 8 ч, после чего отмывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и снова оставляли на 8 ч в 0,1 М HCl (10 об./об.) с последующим отмыванием дистиллированной водой. Аликвоты заряженной таким образом смолы ФАФ в Cl^- -форме помещали в буферы с разными значениями pH: 0,01 М аммоний-ацетатный буфер (pH 5,0, 6,2 и 7,0) и Трис-НCl буфер (pH 8,2). Навески препарата протеиназ (5 мг/мл), растворенные в дистиллированной воде, либо диализат добавляли к смоле ФАФ, уравновешенной соответствующим буфером. Депигментацию проводили в пробирках типа «Falcon» объемом 50 мл в течение 30 мин «batch-

методом» при постоянном покачивании на мини-рокер шейкере MR-1 (BioSan, Латвия).

Хранение комплексного препарата внеклеточных протеиназ. Депигментированный препарат протеиназ микромицета лиофилизировали и расфасовывали по 2 мг в круглодонные криопробирки «CryoFreeze» объемом 4,8 мл (SSI, США) и помещали на 25, 4, -20 и -80°C сроком на 3, 6, 9 и 12 мес. По истечении срока хранения содержимое пробирок растворяли в 4 мл дистиллированной воды и проводили определение активности протеаз и содержания белка.

Определение протеолитической активности. Активность внеклеточных протеиназ определяли с хромогенными пептидными и белковыми субстратами.

В качестве хромогенных пептидных субстратов использовали H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S2251) для определения плазминоподобной активности и Glp-Pro-Arg-pNA (S2366) для определения активности к протеину С активности [22]. В реакциях использовали 0,05%-ные растворы субстратов в 0,05М Трис-НCl-буфере (pH 8,2).

В случае с субстратом S2251 для проведения реакции к 200 мкл пробы добавляли 50 мкл 0,05М Трис-НCl-буфера (pH 8,2) и 100 мкл раствора субстрата S2251, полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 5 мин, реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты.

В случае с субстратом S2366 проводили прединкубацию пробы с разведенной в 2 раза плазмой крови человека (НПО «РЕНАМ», Россия) в течение 5 мин, после чего добавляли раствор субстрата и далее проводили реакцию как описано выше.

Оптическую плотность продуктов реакции измеряли при 405 нм. За единицу активности (E_{pNA}) в обоих случаях принимали количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от субстрата за 1 мин.

В качестве белковых субстратов использовали казеин по Хаммерштайну, бычий фибриноген и бычий фибрин (Sigma-Aldrich, США). Для проведения реакций использовали 1%-ные суспензии субстратов в 0,1М Трис-НCl-буфере, pH 8,2.

Активность определяли по концентрации остатков тирозина после гидролиза белков с помощью модифицированного метода Ансона — Хагихары, инкубируя при 37°C 200 мкл пробы и 400 мкл суспензии соответствующего белкового субстрата как описано ранее [23]. Оптическую плотность растворов после реакции измеряли при 275 нм. Активность выражали в мкмольх тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл пробы ($E_{\text{Тир}}$).

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия).

Определение содержания белка. Количество белка в пробе определяли по методу Бредфорд, для чего к 50 мкл пробы добавляли 950 мкл реак-

тива Coomassie Brilliant Blue G-250 и регистрировали светопоглощение при 595 нм [24].

Сравнение активности комплексного препарата протеиназ *A. ochraceus* с активностью коммерческих аналогов. Навески (от 1 до 5 мг) полученного после депигментации препарата протеиназ *A. ochraceus* и коммерческого препарата Террилитин® (ФГУП «Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток», Россия), трипсина и стрептокиназы (Sigma-Aldrich, США) растворяли в дистиллированной воде и проводили сравнительное определение протеолитической активности и белка как указано выше.

Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре BioSpectrometer® kinetic (Eppendorf, Германия).

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 и их обсуждение

Комплексный препарат внеклеточных протеолитических ферментов микромицета *A. ochraceus* L-1, полученный после осаждения белков сульфатом аммония из культуральной жидкости и последующих диализа и лиофильной сушки, представлял собой гомогенный порошок светло-бежевого цвета, хорошо растворимый в воде, водных и спиртовых растворах. Раствор препарата в концентрации выше 1 мг/мл имел насыщенную коричневатую окраску с максимумом поглощения пигмента при 336 нм. Микроскопические грибы этого вида синтезируют несколько подобных пигментов, таких как виомеллеин, виоксантин, ксантомегнин и некоторые хромопептиды [25]. Эти соединения имеют хинонную природу и могут быть отделены от целевых белков с помощью анионообменной хроматографии. Для этих целей был использован доступный анионит ФАФ в СГ-форме.

Как видно из табл. 1, концентрация белка в культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1 составила 1,73 мг/мл, после высаливания и диализа внеклеточные белки удалось сконцентрировать в 2 раза. Удельная плазминоподобная активность также оказалась больше в 1,5 раза в диализате по сравнению с культуральной жидкостью и составила 46,0 Е_{р_{НА}}/мг, а удельная активаторная к протеину С активность практически не изменилась. Ранее из культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1 было выделено 3 протеиназы, 2 из которых обла-

дали плазминоподобной активностью и 1 – выраженной активаторной к протеину С активностью [17, 28]. Возможно, полученные различия в удельной активности по отношению к разным субстратам вызваны соотношением протеолитических ферментов в культуральной жидкости продуцента. Депигментация с помощью ФАФ позволила существенно повысить удельную активность препарата протеиназ. Так, удельная плазминоподобная активность составила 900,3 Е_{р_{НА}}/мг, а удельная активаторная к протеину С – 131,8 Е_{р_{НА}}/мг. Степень очистки препарата составила 30,2 и 9,3 раза соответственно. Использование ФАФ для депигментации культуральной жидкости другого штамма этого микромицета – *A. ochraceus* 513 – напрямую (без предварительных стадий высаливания и диализа) позволило провести очистку со степенью очистки не более 1,25 [22]. Таким образом, ФАФ можно считать достаточно эффективным анионитом для проведения депигментации сконцентрированных внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* L-1.

Для повышения эффективности депигментации на ФАФ препарата внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* L-1 было исследовано связывание пигмента с анионитом при разных значениях рН буфера. Полученные результаты представлены на рис. 1. Видно, что как плазминоподобная, так и активаторная активность была наибольшей при рН 8,2. При этом значении рН наблюдалась и лучшая депигментация. Кроме того, значение рН 8,2 соответствует оптимальному значению рН-активности протеиназ продуцента [15, 26]. При проведении депигментации при значениях рН ниже 5–7 снижалась как удельная протеолитическая активность с обоими субстратами, так и эффективность депигментации. Так, при рН буфера 5,0 эффективность депигментации составляла 53% для плазминоподобной активности и лишь 7% – для активаторной к протеину С активности (рис. 1).

Раствор протеиназ, депигментированный при рН 8,2, лиофильно высушивали; лиофилизат имел бледно-бежевый цвет, в растворенном виде – слегка соломенную окраску. Полученный депигментированный препарат имел удельную плазминоподобную активность не менее 890 Е_{р_{НА}}/мг и удельную активаторную к протеину С активность не менее 130 Е_{р_{НА}}/мг.

Возможности практического применения любого ферментного препарата, особенно препарата протеиназ, должны быть обоснованы, поэтому важно проводить его сравнение с имеющимися аналогами [27].

Таблица 1

Результаты депигментации на ФАФ препарата протеиназ *A. ochraceus*

Стадия	Белок, мг/мл	Удельная плазминоподобная активность, Е _{р_{НА}} /мг	Степень очистки, раз	Удельная активаторная к протеину С активность, Е _{р_{НА}} /мг	Степень очистки, раз
Культуральная жидкость	1,73	29,8±0,7	1,0	14,1±0,1	1,0
Диализат	2,40	46,0±0,7	1,5	14,3±0,1	1,0
Депигментирование на ФАФ	0,15	900,8±1,5	30,2	131,8±1,5	9,3

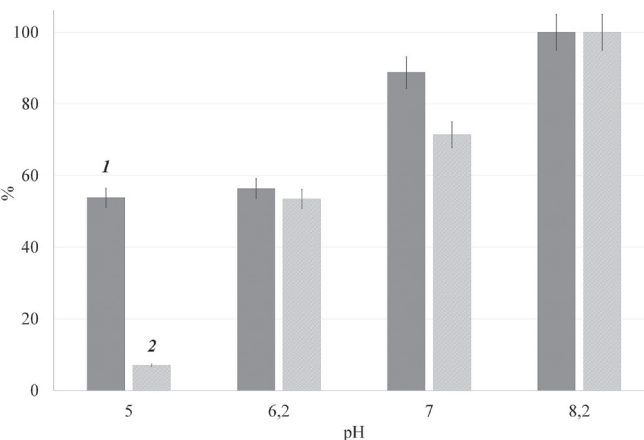


Рис. 1. Эффективность депигментации (%) препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. ochraceus* L-1 при различных значениях pH. 1 – плазминоподобная активность, 2 – активаторная по отношению к протеину С активность.

В табл. 2 показаны результаты сравнения активности препарата протеиназ *A. ochraceus* L-1 с активностью других ферментных препаратов. Была исследована плазминоподобная, фибрино- и фибринолитическая активность, а также неспецифическая казеинолитическая активность полученного препарата с террилитин (препарат внеклеточных ферментов *A. terricola*), трипсином и стрептокиназой. Удельная казеинолитическая активность полученного препарата была сопоставимой с активностью трипсина и почти в 10 раз выше активности стрептокиназы. В случае удельной фибринолитической активности данный препарат оказался активнее в 2 и в 4,7 раза соответственно, чем трипсин и стрептокиназа. Аналогичные результаты были получены при сравнении фибринолитической и плазминоподобной активности указанных препаратов. Несмотря на значения казеинолиза, препарат внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* L-1 проявил выраженность действия в отношении фибрина, что подтверждает полученные ранее для продуцента данные [14]. Превышение полученным препаратом фибринолитической и фибриногенотической активности над стрептокиназой делает возможным его потенциальное применение в медицине, ветеринарии и смежных областях.

В сравнении с террилитин, удельная казеинолитическая активность препарата протеиназ *A. ochraceus* L-1 была в 2,5 раза меньше, в то время как фибринолитическая и плазминоподобная активность была, соответственно, в 2,1 и 2,3 раза выше. При этом фибриногенотическая активность террилитина превышала в 1,27 раз таковую

у полученного препарата. Террилитин® применяется в качестве наружного протеолитического средства для расщепления некротической ткани и разжижения гнойного экссудата и сгустков крови (Регистр. удостоверение РУ № ЛСР-009849/09). Интересно отметить, что оба препарата протеиназ – продукты культивирования аспергиллов разных видов (коммерческий и лабораторный образец) – проявили различия в специфичности к исследуемым хромогенным пептидным субстратам. Меньшая казеинолитическая активность и большая фибринолитическая активность препарата протеиназ *A. ochraceus* L-1 позволяют считать целесообразным его использование в тех же целях.

Ввиду возможности практического применения полученного препарата была изучена его стабильность при хранении в разных температурных режимах (комнатная температура, холодильник, морозильник, глубокая заморозка) на срок до 1 года. Определение плазминоподобной активности и активаторной к протеину С активности, которые были выбраны как маркерные, в образцах препарата с разным хранением представлены на рис. 2А и 2Б соответственно.

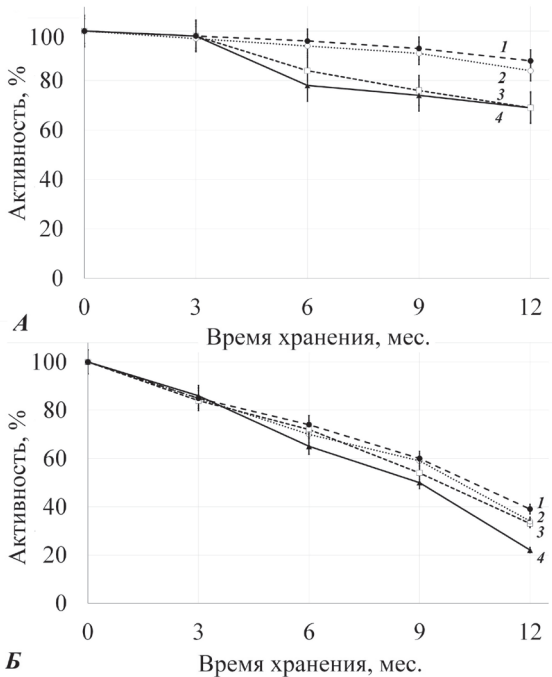


Рис. 2. Стабильность комплексного препарата протеиназ *A. ochraceus* L-1 при +25°С (1), +4°С (2), -20°С (3) и -80°С (4). А – сохранение плазминоподобной активности препарата (%), Б – сохранение активаторной по отношению к протеину С активности препарата (%).

Таблица 2

Сравнение активности препарата протеиназ <i>A. ochraceus</i> с активностью других ферментных препаратов				
Препарат	Удельная казеинолитическая активность, Е _{тип} /мг	Удельная фибринолитическая активность, Е _{тип} /мг	Удельная фибриногенотическая активность, Е _{тип} /мг	Удельная плазминоподобная активность, Е _{р_{НА}} /мг
Депигментированный препарат <i>A. ochraceus</i>	129,13±0,7	47,37±0,7	44,93±0,7	18,31±0,7
Террилитин®	316,58±0,7	20,42±0,7	57,28±0,7	8,60±0,7
Трипсин	132,53±0,7	23,86±0,7	44,70±0,7	17,31±0,7
Стрептокиназа	13,68±0,7	10,55±0,7	31,64±0,7	3,01±0,7

Как видно из рис. 2А, препарат оказался стабильным на протяжении всего года. Плазминоподобная активность снижалась незначительно, к 12 мес. хранения она составила от 69% при +25°C до 88% при -80°C. При отрицательных температурах хранения плазминоподобная активность была выше 90% от первоначальной на протяжении 9 мес. хранения. Наибольшая скорость потери стабильности наблюдалась при хранении препарата при +25°C и при +4°C. Оптимальным временем хранения препарата для сохранения им плазминоподобной активности и, как следствие, фибринолитических свойств следует считать 6 мес. Активаторная к протеину С активность снижалась в исследованных условиях хранения более резко (рис. 2Б). Так, остаточная активность за 12 мес. хранения составила от 22% при +25°C до 39% при -80°C. Наилучшими условиями хранения препарата, так же, как и в случае с плазминоподобной активностью, оказалась температура -80°C. При этом при -20°C препарат хранился не хуже. Оптимальным периодом хранения можно

считать также 6 мес., за это время препарат сохраняет около 80% своей активности.

Таким образом, из культуральной жидкости микробицета *A. ochraceus* L-1 высаливанием сульфатом аммония с последующими диализом и депигментацией на ФАФ при рН буфера 8,2 был получен комплексный препарат протеолитических ферментов. Препарат имел выраженную фибринолитическую, плазминоподобную и активаторную к протеину С активность. Сравнение препарата с коммерческими аналогами — терилитином, трипсином и стрептокиназой — показало его перспективность для использования в качестве средства для разжижения гнойно-ожоговых ран и фибриновых сгустков. Полученный комплексный препарат протеиназ имел высокую стабильность при хранении в условиях отрицательных температур сроком до 9 мес.

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M. Microbial proteases applications // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. Vol. 7: 110.
2. dos Santos Aguilar J.G., Sato H.H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates // Food Res. Int. 2018. Vol. 103. P. 253–262.
3. 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.
4. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreier 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.
5. Шамрайчук И.Л., Лавренова В.Н., Белозерский М.А., Кураков А.В., Белякова Г.А., Дунаевский Я.Е. Активность и спектр внеклеточных пептидаз у фитопатогенных микромицетов *Fusarium anguoides* и *F. sambucinum* // Микол. фитопатол. 2016. Т. 50. № 4. С. 250–256.
6. 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.
7. Osmolovskiy A.A., Kurakov A.V., Kreier 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.
8. Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Secretion of proteinases with fibrinolytic activity by micromycetes of the genus *Aspergillus* // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 1. P. 39–42.
9. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Пискункова Н.Ф., Егоров Н.С. Микромицеты *Aspergillus flavus* и *A. oryzae* как продуценты протеиназ — активаторов белков системы гемостаза человека // Микол. фитопатол. 2019. Т. 53. № 3. С. 183–185.
10. Shilpa H.K., Ambekar J.G., Dongre N.N., Siddalingeshwara K.G. Application of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus tamarii* — *in vitro* studies // Eur. J. Pharm. Med. Res. 2019. Vol. 6. N 12. P. 560–562.
11. Craik C.S., Page M.J., Madison E.L. Proteases as therapeutics // Biochem. J. 2011. Vol. 435. N 1. P. 1–16.
12. Chanalia P., Gandhi D., Jodha D., Singh J. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview // Rev. Med. Microbiol. 2011. Vol. 22. N 4. P. 96–101.
13. Kumar L., Jain S.K. Proteases: a beneficial degradative enzyme in therapeutic applications // Int. J. Sci. Res. Biol. Sci. 2018. Vol. 5. N 4. P. 114–118.
14. 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.
15. Osmolovskiy A.A., Kreier 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.
16. Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Possibility of application of extracellular proteases of the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D for determination of the protein C content in human blood plasma // Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B. Biomed. Chem. 2018. Vol. 12. N 2. P. 164–166.
17. Komarevtsev S.K., Popova E.A., Kreier V.G., Miroshnikov K.A., Osmolovskiy A.A. Purification of the protease activator of protein C of human blood plasma produced by the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D // Applied Biochem. Microbiol. 2020. Vol. 56. N 1. P. 39–44.
18. Шатаева Л.К., Крейер В.Г., Покровская С.С., Радзявичус К.И., Самсонов Г.В. Влияние аминокислотного состава белка на его связывание с карбоксильными катионитами // Высокомолекулярные соединения. 1985. Т. 27. № 1. С. 46–51.
19. Шатаева Л.К., Марина В.П., Радзявичус К.И., Мельникова С.К., Самсонов Г.В. Влияние набухания ани-

онита ФАФ на его сорбционные свойства // Прикл. биохим. микробиол. 1982. Т. 18. № 1. С 65–70.

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. Belakhov V.V., Momot N.N. Development of novel sorption method of preparation of high-purified α -amylase for the creation of enzyme drugs // In the World of Scient. Discov. 2010. Vol. 6. N 1. P. 173–175.

22. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N. S. *Aspergillus ochraceus* micromycetes – producers of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma // Applied Biochem. Microbiol. 2012. Vol. 48. N 5. P. 488–492.

23. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreier 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.

24. 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.

25. Lagashetti A.C., Dufossé L., Singh S.K., Singh P.N. Fungal pigments and their prospects in different industries // Microorganisms. 2019. Vol. 7. N 12: 604.

26. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kurakov A.V., Egorov N.S. Properties of extracellular proteinase – an activator of protein C in blood plasma formed by *Aspergillus ochraceus* // Applied Biochem. Microbiol. 2015. Vol. 51. N 1. P. 95–101.

27. Kotb E. Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from Kishk, a traditional Egyptian fermented food // Applied Biochem. Microbiol. 2015. Vol. 51. N 1. P. 34–43.

Поступила в редакцию 12.04.2020 г.

После доработки 03.06.2020 г.

Принята в печать 23.06.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Production and stability of a complex preparation of proteinases by *Aspergillus ochraceus* L-1 with fibrinolytic and anticoagulant activity

A.A. Osmolovskiy^{1,*}, A.V. Orekhova^{1,2}, E. Conti², V.G. Kreier¹, N.A. Baranova¹, N.S. Egorov³

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

²“La Sapienza” University of Rome, Piazzale Aldo Moro, 5, Rome, 00185, Italy;

³International Biotechnological Center, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

A complex preparation was obtained from the culture fluid of micromycete *Aspergillus ochraceus* L-1 by salting out with ammonium sulfate followed by dialysis and depigmentation to phenolalanine formaldehyde resin at a pH of 8.2 with a specific plasmin-like activity of at least 890 E_{pNA}/mg and a specific activator for protein C activity of less than 130 E_{pNA}/mg was. Comparison of the obtained preparation with caseinolytic, fibrinolytic, fibrinogenolytic and plasmin-like activity with commercial analogues terrilithin, trypsin and streptokinase showed its promise for use as a means for thinning purulent burn wounds and fibrin clots. The resulting complex preparation of proteinases had high storage stability at low temperatures for up to 9 months.

Keywords: micromycete proteinases, fibrinolytic activity, enzymes preparations, enzyme stability, depigmentation, hemostatic-active compounds

Сведения об авторах

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

Орехова Анастасия Владимировна — вед. инженер кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: stasya77@list.ru

Конти Элеонора (Eleonora Conti) — магистр университета «Ла Сапиенца». Тел.: +39 06 4991 2791; e-mail: conti.1581596@studenti.uniroma1.it

Крейер Валериана Георгиевна — 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

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: baranovana2012@mail.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