

ПРОДУКЦИЯ ШТАММОМ *ASPERGILLUS USTUS* ПРОТЕИНАЗ, ВЫСОКОАКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

© 2019 г. Е. А. Попова^{1,*}, А. А. Осмоловский^{1,**}, В. Г. Крейер^{1,***},
И. Б. Котова^{1,****}, Н. С. Егоров^{2,*****}

¹ Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

² Международный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119234 Москва, Россия

*e-mail: veliania@gmail.com

**e-mail: aosmol@mail.ru

***e-mail: vkreyer@yandex.ru

****e-mail: kira1959@gmail.com

*****e-mail: nsegorov21@mail.ru

Поступила в редакцию 18.02.2018 г.

После доработки 19.10.2018 г.

Принята к публикации 21.12.2018 г.

Изучено влияние условий культивирования и источников азота в составе среды на образование штаммом *Aspergillus ustus* I протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков. Было показано, что по сравнению с глубинным культивированием, в условиях твердофазного культивирования на вермикулите с ферментационной средой (рН 7.0), содержащей источники как аминного, так и минерального азота, при температуре 28°C штамм *A. ustus* I продуцирует протеиназы, обладающие наибольшей общей протеолитической ($1018.95 E_{\text{тир}}/\text{мл}$), коллагенолитической ($242.75 E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$), фибринолитической ($254.4 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) и эластинолитической ($271.76 E_{\text{пна}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) активностью.

Ключевые слова: коллагенолитические ферменты, протеиназы микромицетов, ферменты, высокоактивные в отношении фибриллярных белков

DOI: 10.1134/S0026364819040111

ВВЕДЕНИЕ

Мицелиальные грибы рода *Aspergillus* известны как продуценты широкого спектра протеолитических ферментов, обладающих различной субстратной специфичностью. В их числе можно обнаружить продуцентов протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков (Rhodes et al., 1990; Barthelemy et al., 1992; Sharkova et al., 2015; Popova et al., 2017; Ferreira et al., 2017; Wanderley et al., 2017). Способность этих грибов к расщеплению коллагена, эластина и фибрина находит широкое применение. Так, в кожевенной и пищевой промышленности активно используют коллагеназы для смягчения кожи и тендерезации мяса. В медицинской практике применяют не только коллагенолитические, но и фибринолитические и эластинолитические протеиназы: с их помощью удаляют некротизированные ткани, кровяные сгустки в открытых ранах и гнойные выделения (Zanoelo et al., 2013).

Наиболее подходящим способом для культивирования мицелиальных грибов и высокоэффективного получения продуцируемых ими фермен-

тов считается твердофазное культивирование (ТФК). Такой способ культивирования наиболее приближен к естественным условиям роста микромицетов (Barrios-González, 2012; Osmolovskiy et al., 2014; Barrios-González, Tarragó-Castellanos, 2015). Для ТФК характерны низкие значения активности воды (0.6–0.8) и использование сыпучих частиц, которые могут быть представлены как натуральными субстратами, так и инертными, иногда синтетическими, носителями. Экспериментальные данные показывают, что при применении твердофазного культивирования выход целевого продукта в несколько раз (от 2 до 20) выше, чем в случае глубинного культивирования того же микроорганизма (Pandey, 2003; Holker et al., 2004).

Среди аспергиллов, активно изучаемых последнее время, был обнаружен штамм *Aspergillus ustus* I, способный продуцировать протеиназы, обладающие высокой коллагенолитической и фибринолитической активностью (Osmolovskiy et al., 2016).

Целью данного исследования было изучение влияния условий культивирования и источников азота в составе среды на образование микромице-

том *A. ustus* 1 протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Продуцент и условия культивирования. Объектом исследования служил штамм микромицета *A. ustus* 1 из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, для которого ранее были показаны высокие значения активности образуемых протеиназ в отношении фибриллярных белков (Osmolovskiy et al., 2016).

Культивирование микромицета осуществляли в глубинных и твердофазных условиях. В качестве посевного материала использовали выращенные на скошенном сусло-агаре 7-суточные культуры микромицета.

Глубинное культивирование проводили в колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (BioSan, Латвия) при 200 об./мин и 28°C. Для наращивания биомассы использовали питательную среду, содержащую сусло, глюкозу и пептон (Osmolovskiy et al., 2017). Инокулирование проводили смывом спор культуры данной средой. После 2-х суток культивирования часть биомассы переносили в ферментационную среду № 1 следующего состава (%): глюкоза — 3.0, глицерин — 7.0, гидролизат рыбной муки — 0.5, NaNO₃ — 0.2, K₂HPO₄ — 0.05, MgSO₄ — 0.05.

Твердофазное культивирование проводили в культуральных флаконах Т-75 (Eppendorf, Германия) в стационарных условиях при 28°C. В качестве субстратов или носителей твердой фазы использовали пенополиуретан (ППУ, размер частиц приблизительно 5 мм²), вермикулит, кокосовые волокна, пшеничные отруби и силикагель. Во флаконах устанавливали определенное соотношение носитель/среда (подобраны ранее). Так, во флаконы с ППУ на 1 г носителя добавляли 8.3 мл ферментационной среды № 1, с вермикулитом — 4.2 мл, с кокосовыми волокнами — 2.5 мл, с пшеничными отрубями — 2.3 мл и с силикагелем — 1.4 мл, соответственно. При культивировании микромицета на пшеничных отрубях дополнительно изучали образование протеиназ без добавления дополнительных питательных веществ, заменяя ферментационную среду дистиллированной водой. Инокулирование осуществляли 1 мл суспензии спор культуры дистиллированной водой с Твин-80. По истечении времени культивирования в культуральные флаконы добавляли 0.05 М Na-ацетатный буфер (рН 5.5), после чего флаконы помещали на орбитальную качалку (200 об./мин) на 30 мин. Во флаконы, содержащие ППУ, вносили 80 мл буфера, с вермикулитом — 20 мл, с кокосовыми волокнами и пшеничными отрубями — по 60 мл буфера, с силикагелем — 15 мл. Элюат отделяли от субстрата или носителя фильтрованием

через фильтровальную бумагу (ФС, Россия). В фильтрате проводили определение активности протеиназ.

Определение скорости роста микромицета *A. ustus* 1. Для определения скорости линейного роста микромицет культивировали на сусло-агаре (3°Б) и агаризованной питательной среде № 1 в чашках Петри при различных температурах (4, 25, 28, 32, 37°C). Скорость роста рассчитывали по формуле: $K_r = \Delta R / \Delta t$ (Panikov, 1991), где R — размер колонии (мм), t — время (сутки).

Засев проводили уколом в трех повторностях, диаметры колоний (мм) измеряли ежедневно в течение 7 суток.

Изучение влияния условий культивирования на образование протеолитических ферментов *A. ustus* 1. Изучение влияния источников азота на продукцию протеиназ микромицетом *A. ustus* 1 проводили с использованием 5 вариантов жидкой ферментационной среды № 1, содержащие источники азота в разных формах и концентрациях. В среде № 2 нитрат натрия был заменен на пептон (0.5%), в средах № 3 и № 4 был исключен гидролизат рыбной муки, а источники минерального азота были представлены NaNO₃ (0.5%) и NH₄NO₃ (0.5%), соответственно. В среде № 5 в качестве единственного источника азота использовали пептон (1%).

Влияние температуры культивирования на образование протеолитических ферментов изучали при 24, 28, 30, 32°C, а влияние начального рН среды при 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, как было описано ранее (Osmolovskiy et al., 2012).

Определение биомассы. Биомассу определяли после фильтрования, с последующим высушиванием до постоянной массы при 86°C. Массу выражали в мг на 1 мл культуральной жидкости.

Определение протеолитической активности. В культуральной жидкости (элюате) определяли общую протеолитическую, коллагенолитическую, фибринолитическую и эластинолитическую активность.

Общую протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона—Хагхары по количеству тирозина в продуктах протеолиза, не осаждаемых ТХУ, после десятиминутного гидролиза 1%-го р-ра казеина в 0.1 М Na-ацетатном буфере, рН 5.5 и 37°C, как было описано ранее (Osmolovskiy et al., 2016). Активность выражали в мкмольх тирозина/мин ($E_{\text{тир}}$).

Фибринолитическую активность определяли по количеству тирозина в супернатанте после тридцатиминутного гидролиза 1%-й суспензии бычьего фибрина в 0.1 М Na-ацетатном буфере, рН 5.5 и 37°C (Osmolovskiy et al., 2016; Osmolovskiy et al., 2017). Активность выражали в $E_{\text{тир}}$.

Коллагенолитическую активность определяли колориметрически по общепринятой методике с использованием азоколлагена (Chavira et al., 1984;

Sharkova et al., 2015). Активность выражали в количестве мкг расщепившегося азоколлза за 1 мин ($E_{\text{азк}}$).

Определение эластолитической активности проводили по расщеплению хромогенного пептидного субстрата эластазы – сукцинил-L-аланил-L-аланил-L-аланил-p-нитроанилида (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA) (Bieth, Wermuth, 1973). К 200 мкл пробы добавляли 100 мкл 0.05%-го раствора субстрата и 50 мкл 0.05 М Na-ацетатного буфера, рН 5.5. Инкубацию проводили в течение 5 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-й уксусной кислоты. Поглощение определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм. Активности выражали в мкмольях p-нитроанилина в мин ($E_{\text{пНА}}$).

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

Опыты проводили в трех повторностях. Приведенные результаты представляют собой средние значения, ошибка которых не превышала 5–7%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

A. ustus Thom et Church (*Eurotiales*, *Ascomycota*) – типичный обитатель почв и мелких растительных остатков.

Для штамма *A. ustus* 1 при поверхностном росте на агаризованных средах характерно образование плоских бархатистых колоний. Они имеют серо-зеленую окраску при росте на сусло-агаре, и более светлую, желто-зеленую при росте на агаризованной ферментационной среде № 1. Обратная сторона колоний при росте на обеих средах была окрашена в желтый цвет. Максимальная линейная скорость роста *A. ustus* 1 была выявлена при температуре 28°C на агаризованной среде № 1, где она была на 29.1% выше, чем на сусло-агаре (рис. 1). Очевидно, что наличие в среде гидролизатов белков является предпочтительным для поверхностного роста микромицета.

Влияние источников азота на образование продуцентом протеолитических ферментов, высокоактивных в отношении фибриллярных белков оценивали по величине коллагенолитической активности на 5-е сутки культивирования. В соответствии с полученными результатами (табл. 1), наибольшее значение удельной коллагенолитической активности ($5.38 E_{\text{азк}}/\text{мг} \times 10^{-3}$) было показано при культивировании *A. ustus* 1 на ферментационной среде № 1, содержащей источники как аминного, так и минерального азота. При росте на средах № 3 и 4, содержащих только источники минерального азота, значения обоих типов активности были близки или активность отсутствовала во-

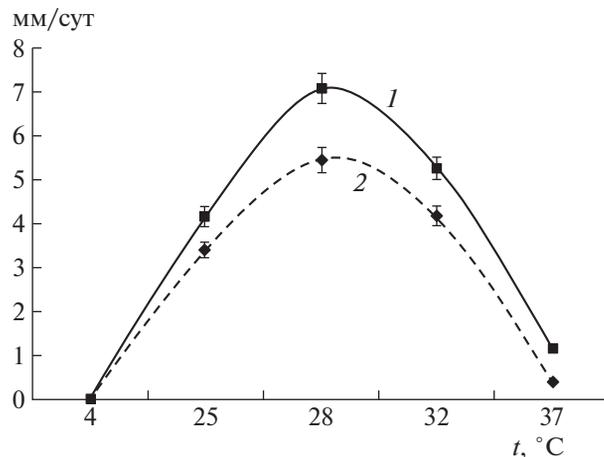


Рис. 1. Линейная скорость роста *Aspergillus ustus* 1 на ферментационной агаризованной среде № 1 (1) и на сусло-агаре (2).

все вне зависимости от природы содержащегося в среде источника азота. В данном случае можно говорить о проявлении одного из механизмов контроля экспрессии генов ферментов – азотной каталитической репрессии. Также интересно отметить, что на среде № 3 при небольших значениях активности отмечали максимальное количество биомассы микромицета *A. ustus* 1 (26.7 мг/мл). При росте на среде № 2, содержащей только аминные формы азота (гидролизат рыбной муки в сочетании с пептоном), удельная коллагенолитическая активность составила $3.65 E_{\text{азк}}/\text{мг} \times 10^{-3}$ и была меньше, чем при росте на среде № 1 в 1.5 раза. Значение же удельной протеолитической активности, напротив, оказалось на 12% выше, чем при росте на среде № 1. Среда № 5, в состав которой в качестве источника азота входил только пептон, также оказалась неэффективной для повышения продуктивности образования протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков (табл. 1). Таким образом, для образования искомым ферментов микромицетом *A. ustus* 1, наиболее подходящим является сочетание источников аминного и минерального азота в составе ферментационной среды.

На рис. 2 представлена динамика роста *A. ustus* 1 и накопления протеиназ, обладающих активностью к фибриллярным белкам, на среде № 1. Максимальное значение коллагенолитической активности наблюдали на 5-е сутки культивирования в конце логарифмической фазы роста продуцента, которое составило $134.86 E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$, а удельная активность – $5.39 E_{\text{азк}}/\text{мг} \times 10^{-3}$.

Результаты изучения влияния температуры и начального рН среды культивирования на образование протеолитических ферментов микромицетом *A. ustus* 1 представлены на рис. 3 и 4. Определе-

Таблица 1. Влияние источников азота в составе ферментационной среды на образование протеиназ штаммом *Aspergillus ustus* 1

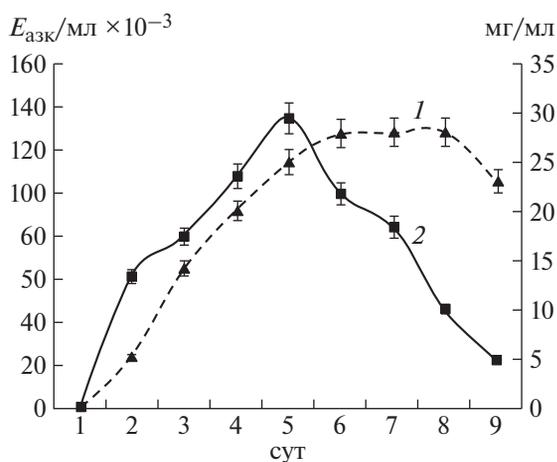
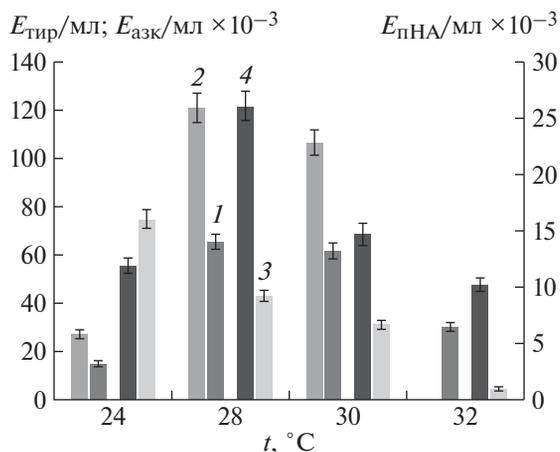
Среда №	Источник азота, %	Общая протеолитическая активность, $E_{\text{тир}}/\text{мг}$	Коллагенолитическая активность, $E_{\text{азк}}/\text{мг} \times 10^{-3}$
1	гидролизат рыбной муки – 0.5; NaNO_3 – 0.2	6.48	5.38
2	гидролизат рыбной муки – 0.5; пептон – 0.5	7.35	3.65
3	NaNO_3 – 0.5	0.19	0
4	NH_4NO_3 – 0.5	0.37	0
5	пептон – 1.0	4.54	0

ние общей протеолитической, коллагенолитической, фибринолитической и эластинолитической активности проводили на 5-е сутки культивирования микромицета на среде № 1. Максимальные значения коллагенолитической ($121.31 E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$), фибринолитической ($25.82 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) и общей протеолитической ($62.25 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) активности наблюдали при 28°C , однако наибольшая эластинолитическая активность ($16.01 E_{\text{пНА}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) была выявлена при культивировании *A. ustus* 1 при 24°C . Стоит отметить, что оптимальная температура роста микромицета *A. ustus* 1 не совпадала с оптимальной температурой для образования протеолитических ферментов.

Влияние начального pH ферментационной среды № 1 на секрецию протеиназ *A. ustus* 1 изучали, определяя протеолитическую активность на 5-е сутки культивирования. Как видно из рис. 4, максимальные значения коллагенолитической ($127.3 E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$), общей протеолитической ($49.68 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) и фибринолитической активности ($19.37 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) были выявлены при росте гриба на

ферментационной среде с начальным значением pH 7.0. Так же как и температурный оптимум, pH-оптимум образования эластаз микромицетом *A. ustus* 1 отличается от оптимума других протеиназ. Так, максимальную эластинолитическую активность наблюдали при pH 5.0 – она составила $13.51 E_{\text{пНА}}/\text{мл} \times 10^{-3}$, и оказалась более чем в 2 раза больше, чем значения, полученные при других значениях pH.

Подбор оптимального носителя (субстрата) для культивирования *A. ustus* 1 в условиях ТФК проводили при наиболее подходящих условиях культивирования: в качестве питательной среды была использована ферментационная среда № 1 с начальным значением pH 7.0, температура культивирования составила 28°C . Были изучены общая протеолитическая, коллагенолитическая, фибринолитическая и эластинолитическая активность *A. ustus* 1 на 7-е сутки культивирования.

**Рис. 2.** Динамика роста (1) и накопления протеолитических ферментов (2) штаммом *Aspergillus ustus* 1.**Рис. 3.** Влияние температуры культивирования на продукцию протеиназ штаммом *Aspergillus ustus* 1: 1 – казеинолитическая активность, 2 – фибринолитическая активность, 3 – эластинолитическая активность, 4 – коллагенолитическая активность.

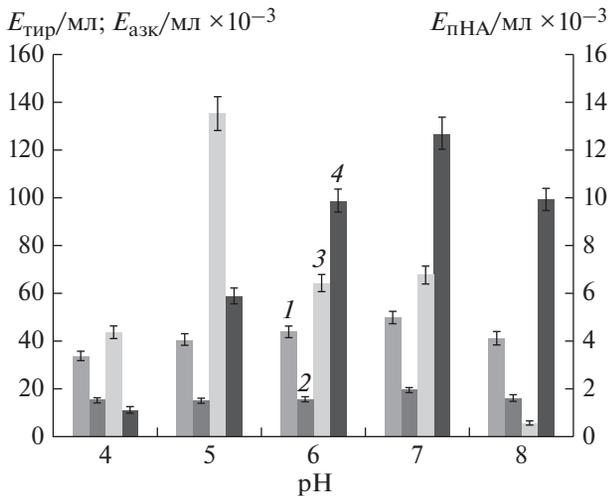


Рис. 4. Влияние начального значения pH среды на продукцию протеиназ штаммом *Aspergillus ustus* 1: 1 – казеинолитическая активность, 2 – фибринолитическая активность, 3 – эластинолитическая активность, 4 – коллагенолитическая активность.

В соответствии с данными, представленными на рис. 5, при культивировании на пшеничных отрубях была выявлена высокая общая протеолитическая и фибринолитическая активность, причем при росте продуцента на отрубях с водой значения активности составили 658.56 и 114.79 $E_{тир}/мл$ соответственно, что оказалось в 2.5 и в 1.8 раза выше, чем в случае культивирования микромицета на отрубях с ферментационной средой № 1. Однако коллагенолитическая и эластинолитическая активность в данных условиях выявлены не были. Кокосовые волокна в качестве носителя в системе

ТФК с *A. ustus* 1 оказались неэффективны: протеиназы, образуемые в таких условиях показали низкие значения искомым типов активности по сравнению с другими вариантами (коллагенолитическая активность составила 105.43 $E_{азк}/мл \times 10^{-3}$, общая протеолитическая – 150.3 $E_{тир}/мл$, фибринолитическая – 52.26 $E_{тир}/мл$), эластинолитическая активность обнаружена не была. При ТФК на пенополиуретане удалось выявить только общую протеолитическую активность (634.78 $E_{тир}/мл$). Максимальные же значения искомым типов активности были выявлены при использовании вермикулита в качестве носителя. Так, при росте на вермикулите, общая протеолитическая активность составила 365.4 $E_{тир}/мл$, коллагенолитическая – 130.36 $E_{азк}/мл \times 10^{-3}$, фибринолитическая – 67.34 $E_{тир}/мл$. Максимум эластинолитической активности был показан при росте *A. ustus* 1 на среде с силикагелем – 114.32 $E_{пНА}/мл \times 10^{-3}$. Однако, поскольку это значение активности менее чем на 10% превышало значение, полученное при ТФК на вермикулите (106.74 $E_{пНА}/мл \times 10^{-3}$) для дальнейшей работы был выбран вермикулит в качестве наиболее подходящего носителя для изучения образования протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков, микромицетом *A. ustus* 1.

Динамика накопления протеолитических ферментов микромицетом *A. ustus* 1 в условиях ТФК на ферментационной среде № 1, с использованием вермикулита в качестве носителя представлена на рис. 6. Видно, что общая протеолитическая активность достигала максимума к 3-м суткам культивирования и составляла 1018.95 $E_{тир}/мл$, что оказалось в 16.3 раза выше, чем при глубинном

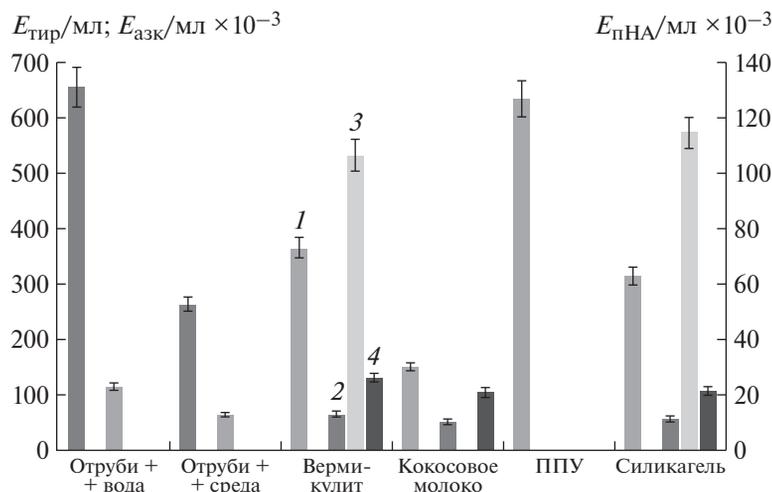


Рис. 5. Влияние природы субстрата на образование протеиназ штаммом *Aspergillus ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования: 1 – казеинолитическая активность, 2 – фибринолитическая активность, 3 – эластинолитическая активность, 4 – коллагенолитическая активность.

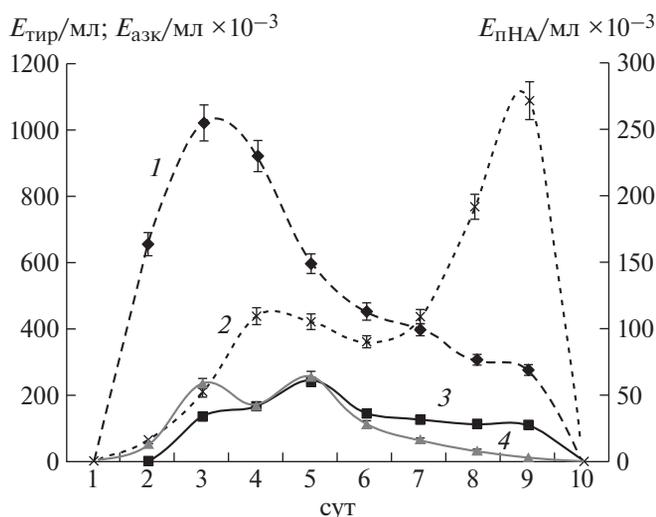


Рис. 6. Динамика накопления протеиназ штаммом *Aspergillus ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования: 1 – кэзеинолитическая активность, 2 – фибринолитическая активность, 3 – эластинолитическая активность, 4 – коллагенолитическая активность.

культивировании ($62.25 E_{\text{тир}}/\text{мл}$). Максимум коллагенолитической активности ($242.75 E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) был обнаружен на 5-е сутки и его значение превышало таковое для глубинного культивирования ($121.31 E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) в 2 раза. Во время роста микромицета наблюдали два пика образования фибринолитических протеиназ, на 3-и ($237.35 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) и на 5-е ($254.4 E_{\text{тир}}/\text{мл}$) сутки культивирования. В первом случае наибольшее значение совпадало по времени с максимумом общей протеолитической активности, во втором – с максимумом проявления коллагенолитической активности. Данные значения активности превышали полученные в условиях глубинного культивирования более, чем в 9 раз. Максимумы эластинолитической активности были выявлены на 4-е ($109.2 E_{\text{пна}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) и на 9-е ($271.76 E_{\text{пна}}/\text{мл} \times 10^{-3}$) сутки культивирования и они оказались от 6.8 до 16.9 раза больше значения, полученного при глубинном культивировании продуцента ($16.01 E_{\text{пна}}/\text{мл} \times 10^{-3}$). Стоит отметить, что пик общей протеолитической активности был разделен во времени с пиками коллагенолитической и фибринолитической активности. Такую особенность можно рассматривать как потенциальное технологическое преимущество для направленного получения ферментов, высокоактивных в отношении фибриллярных белков, образуемых *A. ustus* 1.

Учитывая все полученные данные, представляются интересными закономерности образования эластаз микромицетом *A. ustus* 1. Условия, оказавшиеся оптимальными для продукции данного

фермента отличаются от таковых, необходимых для образования других протеиназ. Также, в динамике накопления протеолитических ферментов в условиях ТФК можно заметить, что на 9-е сутки, максимальные по эластинолитической активности, другие изученные активности составляют менее 30% от своих максимумов (общая протеолитическая – 26.8%, коллагенолитическая – 10.72%, фибринолитическая – 3.29%). Эти данные позволяют предположить, что *A. ustus* 1 способен к образованию высокоспецифичной эластазы.

Таким образом, в результате проведенной работы было изучено влияние условий культивирования и источников азота в составе среды на образование микромицетом *A. ustus* 1 протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков: фибрина, коллагена, эластина. Показано, что для максимально эффективной продукции коллагенолитических протеиназ необходимо наличие источников как аминного, так и минерального азота в составе ферментационной среды. Максимальные значения общей протеолитической, коллагенолитической и фибринолитической активности были получены при начальном значении pH ферментационной среды 7.0 и 28°C. Для образования эластинолитических протеиназ наиболее подходящими условиями являлись pH 5.0 и 24°C. Также было установлено, что максимальная секреция протеиназ, образуемых *A. ustus* 1, происходит в конце логарифмической фазы роста. Были подобраны наиболее подходящие условия при твердофазном культивировании *A. ustus* 1: максимальные значения общей протеолитической, коллагенолитической и фибринолитической активности были выявлены при использовании вермикулита в качестве носителя. Была изучена динамика накопления протеолитических ферментов микромицетом *A. ustus* 1 в условиях ТФК на ферментационной среде № 1 (pH 7.0 и 28°C), с использованием вермикулита в качестве носителя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barrios-González J.* Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochem.* 2012. V. 47. N2. P. 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.016>
- Barrios-González J., Tarragó-Castellanos M.R.* Solid-State Fermentation: Special Physiology of Fungi. In: *J.M. Merillon, K. Ramawat* (eds). *Fungal Metabolites*. Springer, Cham, 2015, pp. 319–347.
- Barthomeuf C., Pourrat H., Pourrat A.* Collagenolytic of a new semi-alkaline protease from *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Bioeng.* 1992. V. 73. N 3. P. 233–236. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90168-T](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90168-T)
- Bieth J., Wermuth C.G.* The action of elastase on p-nitroanilide substrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973. V. 53. N 2. P. 383–390. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)90673-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)90673-6)

- Chavira R.Jr., Burnett T.J., Hageman J.N. Assaying proteinases with Azocoll. Anal. Biochem. 1984. V. 136. N 2. P. 446–450.
https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90242-2
- Ferreira C.M.O., Correia P.C., Brandão-Costa R.M.P., Albuquerque W.W.C., Lin Liu T.P., Campos-Takaki G.M., Porto A.L. Collagenase produced from *Aspergillus* sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue. Biomed. Chromatography. 2017. V. 31. N 5. e3882.
https://doi.org/10.1002/bmc.3882
- Holker U., Hofer M., Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 64. N 2. P. 175–186.
https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3
- Osmolovskiy A.A., Baranova N.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Egorov N.S. Solid-state and membrane-surface liquid cultures of micromycetes: specific features of their development and enzyme production. Appl. Biochem. Microbiol. 2014. V. 50. N 3. P. 219–227.
https://doi.org/10.1134/S0003683814030107
- 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. Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. N 5. P. 488–492.
https://doi.org/10.1134/S0003683812050109
- 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. Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. V. 71. N 1. P. 62–66.
https://doi.org/10.3103/S0096392516010053
- 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. V. 86. N 4. P. 512–516.
https://doi.org/10.1134/S0026261717040105
- Pandey A. Solid-state fermentation. Biochem. Eng. J. 2003. V. 13. N 2–3. P. 81–84.
https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3
- Panikov N.S. Microbial growth kinetics. Moskva, 1991 (in Russ.).
- Popova E.A., Bednenko D.M., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kotova I.B., Egorov N.S. Secretion of extracellular proteinases active against fibrillar proteins by micromycetes. Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. V. 72. N 4. P. 206–210.
https://doi.org/10.3103/S0096392517040101
- Rhodes J.C., Amlung T.W., Miller M.S. Isolation and characterization of an elastinolytic proteinase from *Aspergillus flavus*. Infection and Immunity. 1990. V. 58. N 8. P. 2529–2534.
- 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. V. 84. N 3. P. 359–364.
https://doi.org/10.1134/S0026261715030182
- Wanderley M.C., Neto J.M., Filho J.L., Lima C.A., Teixeira J.A., Porto A.L. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. Braz. J. Microbiol. 2017. V. 48. N 1. P. 13–24.
https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.001
- Zanoelo F.F., Giannesi G.C., Cabral H. Proteolytic enzymes: biochemical properties, production and biotechnological application. In: M.L.T.M. Polizeli, M. Rai (eds). Fungal enzymes. Boca Raton: CRC Press, 2013, pp. 94–112.
- Паников Н.С. (Panikov) Кинетика роста микроорганизмов. М.: Наука, 1991. 309 с.

Production by *Aspergillus ustus* Strain of Proteinases Highly Active Against Fibrillar Proteins

E. A. Popova^a, A. A. Osmolovskiy^{a, #}, V. G. Kreier^a, I. B. Kotova^a, and N. S. Egorov^b

^a Biological faculty of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^b International Biotechnology Center at M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[#] E-mail: aosmol@mail.ru

Abstract—The influence of cultivation conditions and the composition of the fermentation medium on the production of proteinases, which is highly active to fibrillar proteins, by micromycete strain *Aspergillus ustus* 1 was studied. It was shown that, compared to submerged fermentation, under solid-state fermentation with vermiculite and medium (pH 7.0) containing both amine and mineral nitrogen sources at 28°C, micromycete *A. ustus* 1 produces proteinases with the greatest activity – total proteolytic (1018.95 E_{Tyr}/mL), collagenolytic (242.75 E_{Azk}/mL × 10⁻³), fibrinolytic (254.4 E_{Tyr}/mL), and elastinolytic (271.76 E_{pNA}/mL × 10⁻³).

Keywords: collagenases, micromycetous enzymes highly active against fibrillary proteins, proteinases