

**SAROCLADIUM STRICTUM – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРОДУЦЕНТ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ С ВЫРАЖЕННОЙ
ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

© 2020 г. Е. И. Корниенко^{1,*}, Л. Ю. Кокаева^{1,**}, Е. Н. Биланенко^{1,***}, В. Л. Мокеева^{1,****},
Т. С. Шаркова^{1,*****}, А. А. Осмоловский^{1,2,*****}

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

²Биотехнологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия

*e-mail: aljnka-93@mail.ru

**e-mail: kokaeval@gmail.com

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

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

*****e-mail: sharkova06@mail.ru

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

Поступила в редакцию 05.06.2019 г.

После доработки 15.10.2019 г.

Принята к публикации 20.12.2019 г.

Из культуры гриба-нематофага *Arthrobotrys longa* был выделен гриб-ассоциант, предположительно микофил, идентифицированный по макро- и микроморфологии, а также на основе анализа участка ITS1–5.8S–ITS2 рДНК как *Sarocladium strictum*. При изучении ферментативной активности микромицета было выявлено, что штамм секретирует протеолитические ферменты с незначительной неспецифической протеолитической (казеинолитической) активностью и выраженной фибринолитической активностью, которая заключается в способности как гидролизовать фибриновые пластины в условиях *in vitro*, так и проявлять активаторное действие по отношению к ключевому белку фибринолитической системы человека – плазминогену. Указанные свойства делают *S. strictum* перспективным продуцентом фибринолитических ферментов направленного действия.

Ключевые слова: активаторы плазминогена, микромицеты-микофилы, тромболиз, фибринолитические ферменты

DOI: 10.31857/S0026364820030083

ВВЕДЕНИЕ

Фибринолиз как процесс растворения тромбов предотвращает закупорку кровеносных сосудов сгустками фибрина и является важной защитной реакцией организма. Тромболитические препараты-протеиназы, высокочувствительные к компонентам тромба и расщепляющие его структуру, по-прежнему остаются востребованными патогенетическими средствами лечения сердечно-сосудистых заболеваний и их тромботических осложнений. Среди имеющихся средств все большее внимание привлекают микробные фибринолитические ферменты как наиболее перспективные (Kotb, 2013; Ali et al., 2014; Krishnamurthy et al., 2018).

Продуцентами фибринолитических ферментов являются бактерии рода *Bacillus*, актиномицеты, микроводоросли и грибы (Peng et al., 2005; Sharko-

va et al., 2015). В последние годы была показана способность протеолитических ферментов микромицетов к ограниченному протеолизу факторов свертывания крови и фибринолиза, что позволило рассматривать их как более перспективные компоненты средств тромболитической терапии и диагностики тромбоемболических осложнений (Osmolovskiy et al., 2012; Osmolovskiy et al., 2014; Zvonareva et al., 2015; Sharkova et al., 2016a; Sharkova et al., 2016b).

Одним из хорошо изученных продуцентов протеиназ, обладающих выраженным фибринолитическим действием, является хищный гриб-нематофаг *Arthrobotrys longa* Mечт., хранящийся в коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова (Sharkova, Maksimov, 1999; Sharkova et al., 2016a). Внеклеточные протеолитические ферменты этого штамма из-

вестны как комплекс лонголитин, который обладает фибринолитической и активаторной к плазминогену активностями (Sharkova et al., 2013; Podorolskaya et al., 2014).

При работе с *Arthrotrichum longa* Mecht. в лабораторных условиях была обнаружена морфологическая вариабельность колоний, выросших после моноспорового посева на агаризованной среде Чапека–Докса. В результате, при дальнейших пересевах, был выделен неизвестный гриб-ассоциант, по всей видимости, с микофильными свойствами, также обладающий фибринолитической активностью.

Цель работы – идентификация микромицета-ассоцианта штамма *A. longa* и определение его биотехнологического потенциала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и его поддержание. Объектом исследования служил штамм микромицета, выделенного при моноспоровом посеве из культуры *A. longa*. Поддержание штамма осуществляли в пробирках на скошенном овсяном агаре и на модифицированной среде Чапека–Докса следующего состава (г/л): NaNO_3 – 3.0, KH_2PO_4 – 1.0, KCl – 0.5, MgSO_4 – 0.5, сахароза – 25.0, агар – 30.0. Пробирки со штаммом хранили при 4°C.

Изучение морфологических и культуральных свойств. Идентификацию проводили с использованием микро-, макроморфологических и культуральных признаков с использованием определителей (Gams, 1971; Hoog et al., 2000; Domsch et al., 2007 и др.).

Микроморфологию микромицета изучали с помощью световой (микроскоп Leica DM 500) и сканирующей электронной микроскопии.

Для световой микроскопии препараты мицелия микромицета с овсяного агара или из глубокой культуры прижизненно окрашивали красителем нейтраль-рот (1:2000) (Беккер и соавт., 1957) и микроскопировали при увеличении $\times 1000$.

Для приготовления препарата для электронной микроскопии вырезали участок колонии, выращенной на среде Чапека–Докса, и фиксировали в 2.5%-м глутаровом альдегиде в течение 4 ч. Затем последовательно отмывали образец в фосфатном буфере (pH 7.4) и дистиллированной воде. Для дегидратации осуществляли проводку образца через растворы с постепенно увеличивающейся концентрацией этанола (30, 50, 70 и 96%). Затем постепенно заменяли этанол на ацетон (в соотношении этанол/ацетон 3 : 1, 1 : 1 и 1 : 3). Полученный препарат высушивали при критической точке, наклеивали на столик и напыляли тонким слоем инертного металла. Микроскопию проводили на микроскопе JSM-6380LA (JEOL Ltd., Япония) в

Лаборатории электронной микроскопии ЦКП МГУ имени М.В. Ломоносова.

Молекулярно-генетическая идентификация. Для работы брали небольшой фрагмент мицелия микромицета, выращенного на среде Чапека–Докса, и растирали с жидким азотом в стерильной керамической ступке. Выделение ДНК проводили с использованием СТАВ буфера [0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 2% (w/v) СТАВ] по стандартному протоколу экстракции (Griffith, Shaw, 1998). Для амплификации рДНК, включающей фрагмент гена 18S, внутренний транскрибируемый спейсер ITS1, ген 5.8S, внутренний транскрибируемый спейсер ITS2 и фрагмент гена 28S, были использованы универсальные праймеры ITS1 и ITS4 (TCCGTTAGGTGAACCTGCGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC) с применением стандартных ПЦР-протоколов (White et al., 1990).

ПЦР проводили на готовых наборах “PCR core” компании Изоген. Режим амплификации: 96°C – 3 мин, 30 циклов: 1) 94°C – 30 с, 2) 55°C – 30 с, 3) 72°C – 30 с; 72°C – 3 мин. Хранение материала осуществлялось при 4°C. Разделение фрагментов ДНК, полученных в результате амплификации, проводили стандартным электрофорезом в 1.5%-м агарозном геле с добавлением EtBr. В качестве буферной системы использовали Tris-борат-ЭДТА-буфер (ТВЕ). После электрофореза гели анализировали в УФ-свете. Ампликон экстрагировали из геля с помощью набора CleanUp компании “Евроген”. Секвенирование последовательностей ДНК проведено компаниями “Евроген”. Секвенировали с использованием набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, США) на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 \times 1 (Applied Biosystems, CA, США). Полученные последовательности нуклеотидов использовали для поиска соответствия в GenBank для видового определения с использованием программы BLASTn.

Выявление способности к продукции внеклеточных ферментов. Проводили поверхностное культивирование микромицета в чашках Петри на средах, содержащих белковые субстраты или углеводные компоненты, следующего состава (г/л): 1) KH_2PO_4 – 0.5, MgSO_4 – 0.25, пептон – 5.0, казеинат натрия/желатин/крахмал/эластин – 10.0, агар – 15.0; 2) пептон – 5.0, KH_2PO_4 – 5.0, растворимый крахмал – 2.0, агар – 15.0; 3) KH_2PO_4 – 0.5, MgSO_4 – 0.25, порошковая целлюлоза – 2.0, агар – 15.0.

Посев производили уколом в центр чашки, посе́вы выращивали 7 сут при 37°C. По истечении срока выращивания в чашки Петри со средами с белковыми субстратами добавляли 5 мл 0.08% раствора Кумасси бриллиантового голубого G-250 в 3.5%-й хлорной кислоте, в чашки Петри с крахмалсодержащей средой – свежеприготовленный 0.5%-й раствор Люголя, а с целлюлозой – 1% рас-

твор Конго красного. Затем измеряли диаметр колоний (D , мм) и зон гидролиза (d , мм) для определения энзиматического индекса (EI), который рассчитывали по следующей формуле: $EI = (D + d)/D$ (Gupta et al., 2012; Behera et al., 2014).

Изучение протеолитической активности внеклеточных ферментов. Для определения внеклеточной протеолитической активности микромицет выращивали в условиях глубинного культивирования в качалочных колбах объемом 750 мл в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия) при 28°C и 220 об./мин в две стадии. На первой стадии выращивали посевной мицелий (48–72 ч), на второй (ферментационной) происходила собственно секреция фибринолитических ферментов (96–120 ч). Ферментационная среда содержала (в г/л): K_2HPO_4 – 4.4, $NaNO_3$ – 19.0, KNO_3 – 2.5, сахароза – 40, pH 6.5. Среда для посевного мицелия была аналогичного состава, концентрация всех компонентов которой была меньше в 2 раза. Активность определяли в культуральной жидкости, предварительно отделяя ее от мицелия центрифугированием при 4°C и 3000 g.

Общую протеолитическую, фибринолитическую и фибриногенолитическую активности определяли модифицированным методом Ансона–Хагихары (Hagihara et al., 1958; Osmolovskiy et al., 2016) по гидролизу 1%-го раствора казеина по Хаммерштейну, бычьего фибрина и бычьего фибриногена, соответственно, приготовленных на 0.1 М Трис–HCl буфере, pH 8.0–8.2. Реакции проводили с 200 мкл пробы и 400 мкл растворов белковых субстратов. Смеси инкубировали 30 мин при 37°C на термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия), после чего останавливали реакцию 600 мкл 10%-м ТХУ. Полученные пробы центрифугировали при 12400 g в течение 5 мин и измеряли оптическую плотность при 275 нм на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® kinetic (Eppendorf, Германия). Активность выражали в мкмольх тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости ($E_{Tир}$).

Плазминоподобную и активаторную по отношению к плазминогену активность на фибриновых пластинах определяли по методу Аструпа–Мюллерца–Лассена (Sharkova et al., 2015). Для приготовления фибриновых пластин в чашках Петри смешивали 900 мкл 3%-го раствора бычьего фибриногена в физиологическом растворе и добавляли 200 мкл 0.1%-го раствора тромбина. После стабилизации фибринового геля часть чашек прогревали в течение 30 мин при температуре 86°C.

Для измерения плазминоподобной и активаторной к плазминогену активностей на пластины наносили по 30 мкл пробы и помещали чашки в термостат на 4 часа. По истечении указанного времени на пластинах измеряли площадь зоны лизиса в мм². Разность в размерах зон на непрогретых

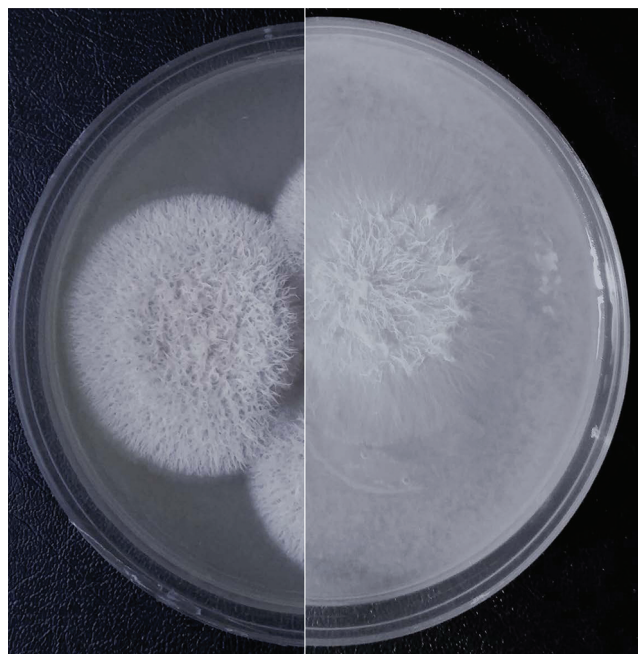


Рис. 1. Колонии *Sarocladium strictum* (14 суток) на среде Чашека–Докса (слева) и на овсяном агаре (справа).

и прогретых чашках служила показателем способности фермента не только к плазминоподобной (прямой фибринолитической) активности, но и его способности активировать плазминоген. Полученные результаты выражали в усл. ед./см³.

Эксперименты проводили в трех повторностях, ошибка приведенных результатов не превышала 5–7%. 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

Изучение макро- и микроморфологии микромицета-микотифила, ассоцианта штамма *Arthrobotrys longa* указывает на принадлежность данного гриба к роду *Sarocladium* (рис. 1–3). Молекулярно-генетическая идентификация по участку нуклеотидной последовательности ITS1–5.8S–ITS2 рДНК позволила определить микромицет как *Sarocladium strictum* (рис. 4). Последовательность была депонирована в GenBank под номером MF192758.

Известно, что род *Sarocladium* включает виды, занимающие разные экологические ниши. В большинстве это патогены растений, которые были выделены из мест поражений, с поверхности живых или мертвых частей растений или из почвы. Вид *S. mycophilum* известен как единственный микопаразит в этом роде.

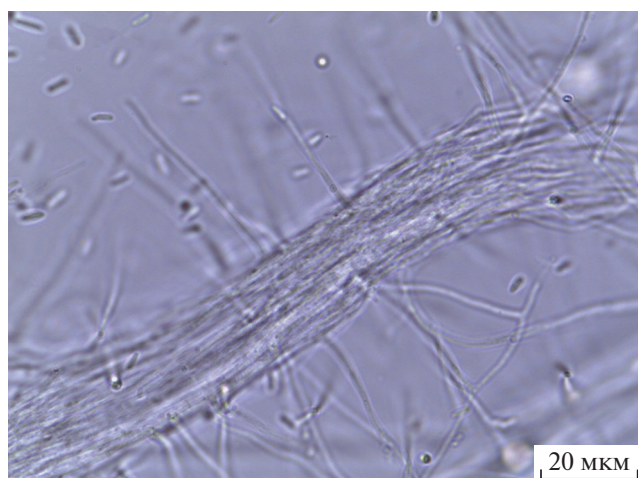


Рис. 2. *Sarocladium strictum*: фиалиды, отходящие от тяжелой мицелия, палочковидные конидии (14 суток, культура на овсяном агаре, световой микроскоп).

Род *Sarocladium* (*Hypocreales*) был выделен из большого полифилетического рода *Acremonium* на основании мультилокусного филогенетического анализа ДНК (Summerbell et al., 2011). В дальнейшем на основании фенотипических данных и филогенетических построений концепция рода *Sarocladium* была пересмотрена, был описан ряд новых видов (Giraldo et al., 2015). В настоящее время признается 19 видов этого рода с типовым видом *S. oryzae*.

Морфологически роды *Acremonium* и *Sarocladium* очень близки, но филогенетически удалены друг от друга, *Acremonium* родственен *Bionectriaceae*, таксономическое положение *Sarocladium* до сих пор остается неясным (Summerbell et al., 2011).

Sarocladium может быть морфологически дифференцирован от *Acremonium* как имеющий более длинные фиалиды, отходящие одиночно от вегетативных гиф или конидиеносцев, которые иногда могут обильно ветвиться, образованием аделофиалид, не отделенных базальной септой от гифы, с хорошо заметными воротничками, образованием более удлиненных конидий. *Acremonium* имеет в основном неразветвленные или слабо разветвленные конидиеносцы, конидии изменчивы по форме (полушаровидные, обратнойцевидные, эллипсоидальные), аделофиалиды обычно отсутствуют (Summerbell et al., 2011).

Филогенетические исследования показывают близкое родство *S. strictum* с *S. pseudostrictum* и *S. bactrocephalum*, виды образуют хорошо поддерживаемую кладу (Giraldo et al., 2015). Морфологические параметры этих трех видов также очень близки. *S. strictum* по морфолого-культуральным признакам бывает трудно отличить и от *S. kiliense* (Gams, 1971).

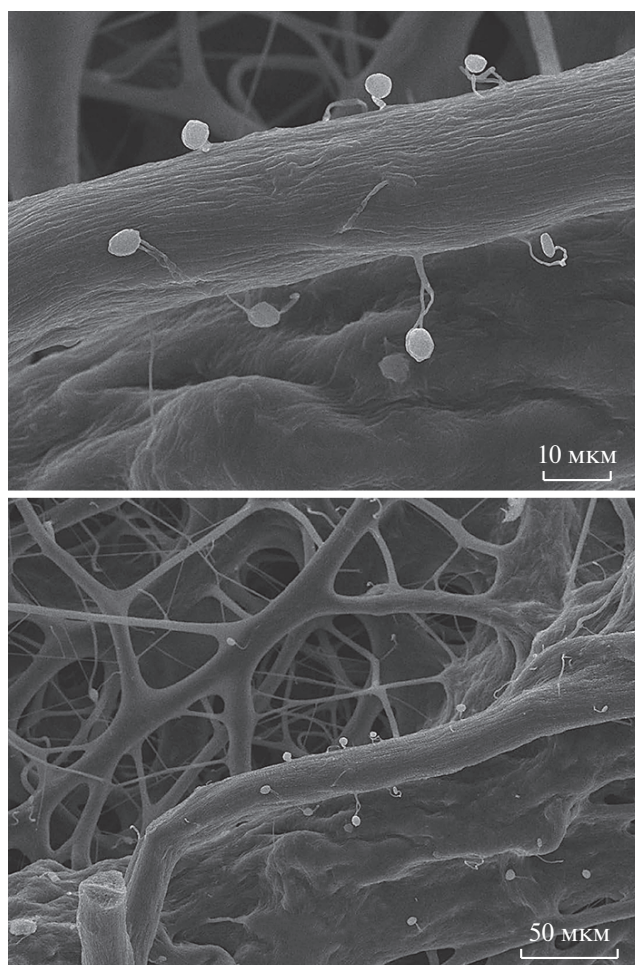


Рис. 3. *Sarocladium strictum*: фиалиды, отходящие от тяжелой мицелия, округлые головки конидий (5 суток, культура на среде Чапека–Докса, СЭМ).

Экологическая амплитуда *S. strictum* очень широка (Domsch et al., 2007). Изоляты вида были выделены из почвы, с обработанной древесины, из ризосферы различных растений, со стен и других влажных поверхностей теплиц, с мертвых и живых растений, из пораженной волосистой части головы человека, гриб обнаружен у пациентов с хроническими легочными заболеваниями (Gams, 1971; Hoog et al., 2000). По патогенным свойствам гриб относят к первому базовому уровню биобезопасности (BSL-1) и, по-видимому, он является участником инвазивной инфекции иммунодепрессивных пациентов (Hoog et al., 2000). Известны многочисленные случаи выделения *S. strictum* с грибов разных таксономических групп, как аско-, так и базидиомицетов – *Inonotus* (чага), *Hypoxylon*, *Fomitopsis*, *Microsphaera*, со склероциев *Botryotinia* (Domsch et al., 2007). Характер взаимоотношений *Sarocladium strictum* с другими грибами точно не установлен и может быть различен – от сапротрофии до микопаразитизма. Мы предполагаем, что

TTGGGGGTTTCACGGCGTGGCCGAGCCGCTCTCCGGTGCAGGGTGTGCTACT
 ACGCAGGGGAGGCTGCGGCGCGACCGCCACTCAATTTGGGGGACAGGGGCC
 CGGAGGCCGCTGATCCCCAGCACCAGGTCCCCCGAAAGGGGGTCTCTGAG
 GGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCGGAGTGCCGGCGGGCGCA
 ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATC
 GCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAA
 GTTTTGATTCATTTTGTTTTCGGGCTTTCGCCCCTCAGAGATTCACAATAAAATC
 AGAGTTTGGTTGTCCCCGGCGGACGCCCGGAGCCCGGAGGCACCCGCGCGCT
 GAGCCCCCGGAGGGAACGATAGGTATGTTTACAATGGGTTGGAGAGCCTAGG
 GCACTCTGGTAATGATCCCTCCGCA

Рис. 4. Нуклеотидная последовательность участка гена ITS1–5.8S–ITS2 рДНК *Sarocladium strictum*.

имеющийся у нас изолят паразитировал на грибе *Arthrotrys longa*.

Выявление способности выделенного микромицета к продукции внеклеточных ферментов на основе определения энзиматических индексов при росте на агаризованных средах с белками или углеводами в своем составе показало, что *Sarocladium strictum* проявляет высокую протеолитическую активность и обладает незначительной амилитической активностью (рис. 5, табл. 1). Среди использованных в составе сред белковых субстратов микромицет лучше всего использовал желатин и казеин. Соответствующие значения энзиматических индексов оказались на 52% больше значений EI при росте на среде с эластином и на 35% больше, чем на среде с крахмалом. Целлюлазная активность у микромицета обнаружена не была.

В связи с высокими значениями энзиматических индексов при росте на средах с белковыми субстратами протеолитическая активность *S. strictum* была изучена в условиях глубинного культивирования.

В глубинной культуре на синтетической среде, с использованием источников азота в окисленной форме, при низком соотношении углерода и азота и значениях pH, близким к нейтральному, *S. strictum* рос в виде мелкодисперсной массы, состоящей из тяжелой слабо ветвящегося мицелия, с многочисленными фиалидами и овально-палочковидными одноклеточными конидиями, длиной 3–5 мкм (рис. 6).

Глубинное культивирование показало, что он активно образует протеолитические экзоферменты (табл. 2), которые способны расщеплять нативные белки, как глобулярные, так и фибриллярные. У данного штамма *S. strictum* была обнаружена казеинолитическая, фибринолитическая, фибриногенолитическая и активаторная к плазминогену активность. Интересно отметить, что внеклеточные протеиназы, содержащиеся в культуральной жидкости микромицета, как и протеиназы *Arthrotrys*

longa, проявили активаторную к плазминогену активность, что может характеризовать его как новый и весьма перспективный продуцент фибринолитических ферментов непрямого действия. Активаторная к плазминогену активность доходила до 32% от фибринолитической активности, что сопоставимо и несколько превышает данное соотношение по активности у протеиназ *A. longa* (Sharikova et al., 2016a).

Таким образом, из культуры гриба-нематофага *A. longa* был выделен микофильный гриб-ассоциант, фенотипически и генотипически идентифицированный как *Sarocladium strictum*. При изучении его ферментативной активности было выявлено, что штамм *S. strictum* секретирует протеолитические ферменты с выраженной фибринолитической ак-

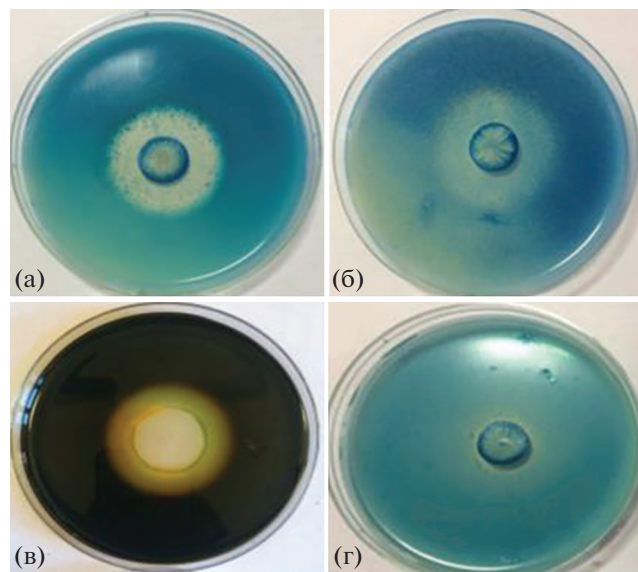


Рис. 5. Рост *Sarocladium strictum* на средах: а – с казеином, б – с желатином, в – с крахмалом, г – с эластином.

Таблица 1. Протеолитический потенциал *Sarocladium strictum*

Субстрат	Зона гидролиза (d, мм)	Диаметр колонии (D, мм)	Энзиматический индекс (EI)
Казеин	16.5	33.0	2.0
	15.0	32.0	
Крахмал	27.5	46.0	1.5
	29.0	39.0	
Эластин	16.0	18.0	1.2
	15.0	17.0	
Желатин	16.0	43.0	2.7
	15.5	42.0	
Целлюлоза	0.0	0.0	0.0

тивностью, которая заключается в способности как гидролизовать фибриновые пластины в условиях *in vitro*, так и проявлять активаторное действие по отношению к ключевому белку фибринолитической системы человека – плазминогену. Определение фибринолитической активности в культуральной жидкости показало, что ее значение сопоставимо и даже превышает таковую у других микромицетов (Sharkova et al., 2015). Например, фибринолитическая активность *S. strictum* в 2 раза выше, чем у *Absidia glauca* M-1, в 2.5 раза,

чем у *Aspergillus niger* 29, и в 1.7 раз выше, чем у *Acremonium basili sporum* 12. В культуральной жидкости гриба обнаруживается также и неспецифическая протеолитическая (казеинолитическая) активность, что может указывать как на комплекс протеолитических ферментов, образуемых *Sarocladium strictum*, так и на их специфичность по отношению к компонентам фибринолитической системы человека. Следует отметить, что проявление активаторной к плазминогену активности встречается среди протеиназ микромицетов нечасто, и такие ферменты считаются наиболее предпочтительными для разработки фибринолитических средств непрямого действия, чрезвычайно востребованных в современной медицине. Указанные свойства делают *S. strictum* перспективным продуцентом фибринолитических ферментов направленного действия, которые могут найти свое применение в составе терапевтических средств лечения тромбоэмболических осложнений. Способность к секреции таких ферментов при росте на простой и достаточно дешевой питательной среде может оказаться экономически выгодным для разработки биотехнологического процесса получения протеиназ у *S. strictum*.

Исследование проводилось в рамках Государственного задания, часть 2, раздел 01 10 (проекты № АААА-А16-116021660088-9, АААА-А16-116021660084-1), с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием “Лаборатория электронной микроскопии биологического факультета МГУ

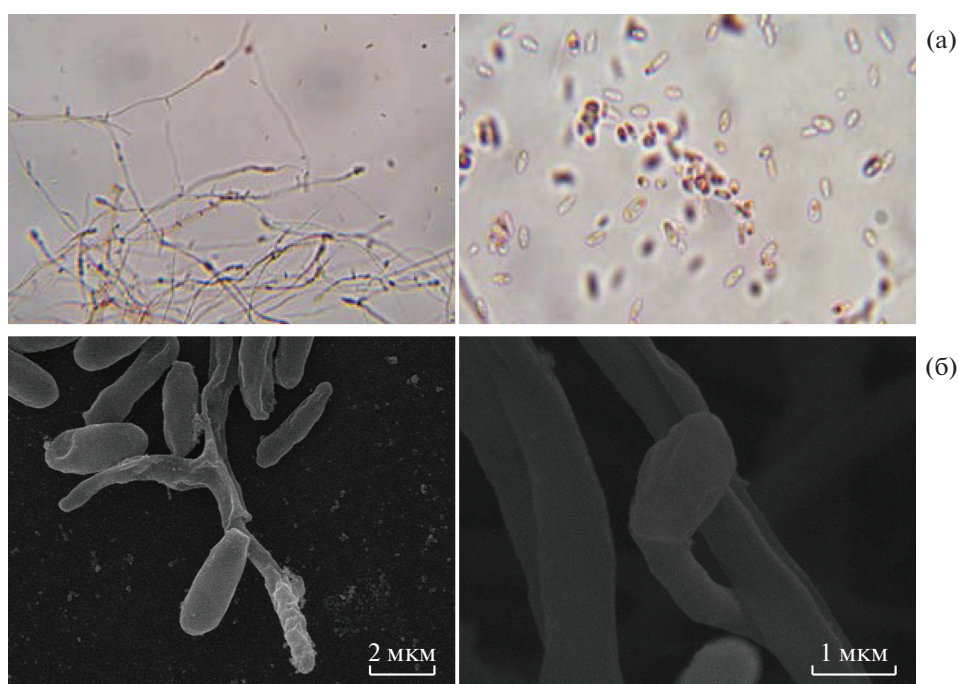
**Рис. 6.** Глубинная культура *Sarocladium strictum*: а – световая микроскопия, б – сканирующая электронная микроскопия.

Таблица 2. Протеолитическая активность протеиназ *Sarocladium strictum*

Активность	Субстрат	Значение активности
Казеиноподобная активность, E _{Тир}	казеин	29.2
Фибринолитическая, E _{Тир}	фибрин	17.8
Фибриногенолитическая, E _{Тир}	фибриноген	8.7
Фибринолитическая, усл. ед./см ³	фибрин	843.0
Активаторная к плазминогену, усл. ед./см ³	фибрин, плазминоген	574.3

(Electron microscopy laboratory of Moscow State University Biology Faculty)". Поддержано грантом РФФИ, проект № 18-29-25073.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ali M.R., Salim Hossain M., Islam M.A., Saiful Islam Arman M., Sarwar Raju G., Dasgupta P., Noshin T.F. Aspect of thrombolytic therapy: a review. *Scientific World J.* 2014. P. 586510.
- Behera B.C., Parida S., Dutta S.K., Thatoi N.H. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from angorve soil of Mahanadi river delta and their cellulose production ability. *Am. J. Microbiol. Res.* 2014. V. 2. N 1. P. 41–46.
- Bekker Z.E., Smirnova A.D., Mikheenkov P.S. Microscopic control of penicillin fermentation using various producer strains. *Antibiotiki.* 1957. N 2. P. 23–29 (in Russ.).
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. *Compendium of soil fungi.* IHW-Verlag, 2007.
- Gams W. *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes).* Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. 1971.
- Giraldo A., Gené J., Sutton D.A., Madrid H., de Hoog G.S., Cano J., Decock C., Crous, P.W., Guarro J. Phylogeny of *Sarocladium (Hypocreales)*. *Persoonia.* 2015. V. 34 (1). P. 10–24.
- Griffith G.W., Shaw D.S. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Appl. Environment. Microbiol.* 1998. V. 64 (10). P. 4007–4014.
- Gupta P., Samant K. Sahu A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *Int. J. Microbiol.* 2012. V. 22. P. 1–5.
- Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K. Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* 1958. V. 45. P. 185–194.
- Hoog de G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. *Atlas of clinical fungi.* 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Universitat Rovira i Virgili, 2000.
- Kotb E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97 (15). P. 6647–6665.
- Krishnamurthy A., Belur P.D., Subramanya S.B. Methods available to assess therapeutic potential of fibrinolytic enzymes of microbial origin: a review. *J. Analyt. Sci. Technol.* 2018. V. 9 (10). P. 1–11.
- 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 (5). P. 488–492.
- 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 (1). P. 62–66.
- Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. The effect of micromycete extracellular proteases of *Aspergillus* genus on the proteins of haemostatic system. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2014. V. 40 (6). P. 634–639.
- Pen Y., Yang X., Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 69 (2). P. 126–132.
- Podorolskaya L.V., Serebryakova T.N., Sharkova T.S. The effect of longolithin, a thrombolytic drug from the lower saprotrophic fungus *Arthrotrix longa*, on fibrinolysis and hemostasis in rats after oral administration. *Thrombosi, hemostasis and rheologia.* 2014. V. 4 (60). P. 67–73 (in Russ.).
- Sharkova T.S., Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Morphological and physiological properties of the micromycete *Arthrotrix longa*, a producer of longolytin, a proteolytic complex with a thrombolytic effect. *Microbiology.* 2016a. V. 85 (2). P. 180–184.
- 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 (3). P. 359–364.
- Sharkova T.S., Maksimov V.N. The study of the physiology of the predatory fungus *Arthrotrix longa* – a producer of longolithin in connection with long-term storage of the culture in the laboratory. *Mikologiya i fitopatologiya.* 1999. V. 33. P. 338–339 (in Russ.).
- Sharkova T.S., Matveeva E.O., Kreier V.G., Osmolovskiy A.A., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinase-plasminogen activator by micromycete *Tolyopcladium inflatum* k1. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016b. V. 52 (1). P. 31–35.
- Sharkova T.S., Serebryakova T.N., Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Podorolskaya L.V. The effect of a complex of fungal proteinases – longolithin – on platelet and plasma hemostasis *in vivo* and *in vitro* experiments. *Uspekhi meditsinskoy mikologii.* 2013. V. 10. P. 371–373 (in Russ.).
- Summerbell R.C., Gueidan C., Schroers H.J., de Hoog G.S., Starink M., Rosete Y.A., Guarro J., Scott J.A. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Stud. Mycol.* 2011. V. 68. P. 139–162.

White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990. V. 18 (1). P. 315–322.

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. V. 41 (5). P. 500–505.

Беккер З.Э., Смирнова А.Д., Михеенков П.С. (Bekker et al.) Микроскопический контроль ферментации пени-

цилина с использованием различных штаммов-продуцентов // Антибиотики. 1957. № 2. С. 23–29.

Шаркова Т.С., Серебрякова Т.Н., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Подорольская Л.В. (Sharkova et al.) Влияние комплекса грибковых протеиназ – лонголитина – на гемостаз тромбоцитов и плазмы в экспериментах in vivo и in vitro // Успехи медицинской микологии. 2013. Т. 10. С. 371–373.

Шаркова Т.С., Максимов В.Н. (Sharkova, Maksimov) Изучение физиологии хищного гриба *Arthrobotrys longa* – продуцента лонголитина в связи с длительным хранением культуры в лаборатории // Микология и фитопатология. 1999. Т. 33. С. 338–339.

***Sarocladium strictum* – a Perspective Producer of Proteolytic Enzymes with Expressed Fibrinolytic Activity**

**E. I. Kornienko^a, L. Yu. Kokaeva^a, E. N. Bilanenko^a, V. L. Mokeyeva^a,
T. S. Sharkova^a, and A. A. Osmolovskiy^{a,b,#}**

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

^b Biotechnological faculty of Moscow State University named after M.V. Lomonosov Moscow, Russia

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

From the culture of the nematophagous fungus *Arthrobotrys longa* an associative fungus was isolated. The fungus was presumably mycophile, identified by macro- and micromorphology, as well as on the basis of an analysis of the ITS1–5.8S–ITS2 rDNA site as *Sarocladium strictum*. When studying the enzymatic activity of micromycete, it was revealed that the strain secretes proteolytic enzymes with insignificant non-specific proteolytic (caseinolytic) activity and pronounced fibrinolytic activity, which consists in the ability to both hydrolyze fibrin plates in vitro and to exhibit an activating effect with respect to the key protein of fibrinolytic human systems – plasminogen. These properties make *S. strictum* a promising producer of directed fibrinolytic enzymes.

Key words: fibrinolytic enzymes, mycophilous micromycetes, plasminogen activators, thrombolysis