

На правах рукописи

Насибов Элвин Мубариз оглы

**Разработка биотехнологических процессов получения
коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2023 г

Работа выполнена в отделе медико-биологических проблем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР)

Научный руководитель

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела медико-биологических проблем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

Никитина Зоя Кимовна

Официальные оппоненты

доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией анализа генов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ)

Шилов Илья Александрович

кандидат биологических наук, заместитель декана биологического факультета, доцент кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Осмоловский Александр Андреевич

Ведущая организация

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов"

Защита состоится «27» февраля 2023 года в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 при РХТУ имени Д.И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9) в конференц-зале (ауд. ____).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <https://muctr.ru>.

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
99.0.027.03, к.т.н.

Шакир И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Биотехнологические процессы являются источниками получения биологически активных веществ, критически важных для многих областей жизнедеятельности человека. Протеазы и ингибиторы протеаз не только обеспечивают нормальное функционирование организма и поддержание его гомеостаза, но и влияют на иммунитет, воспаление и развитие болезней (Bond, 2019; Patel, 2018). В связи с этим указанные ферменты используются для прогностических, диагностических, а также терапевтических целей в медицине (Dudani, 2018; Bond, 2019; Kumar, 2018; Agbowuro, 2018).

Среди протеаз, имеющих промышленное значение, особый интерес вызывают коллагенолитические протеазы (коллагеназы), обладающие способностью расщеплять различные типы коллагена (Amaral, 2020; Bhagwat, 2018). Коллаген, субстрат коллагеназы, представляет собой фибриллярный, структурный и нерастворимый белок, который обладает высокой прочностью и присутствует главным образом в коже, хрящах, костях, сухожилиях, зубах и кровеносных сосудах (Кистенев, 2019, Потехина, 2016; Fields, 2013). В связи с этим коллагеназы имеют широкое применение в кожевенной, косметической, биомедицинской и пищевой промышленности в тех случаях, когда объектом воздействия является коллаген (Bhagwat, 2018; Pal, 2016; Silva, 2018).

Особенно перспективным является использование коллагеназ в медицине. В последнее время разрабатываются терапевтические методы, основанные на малоинвазивных подходах, в том числе с использованием ферментов, к числу которых относятся коллагеназы (Alipour, 2016; Архинчеева, 2022; Tandon, 2021). Миграция клеток и ремоделирование коллагена во время восстановления и регенерации тканей является важным этапом в процессе заживления ран, где коллагеназа играет ключевую роль (Waucaster, 2018). Для улучшения процесса заживления используются мази с коллагеназой, которые осуществляют ферментативную очистку и потенциально облегчают процесс эпителизации во время санации (Майорова, 2018; 2019). Другие применения фермента включают лечение грыжи межпозвоночного диска (Zhang D., 2015), фиброза и цирроза печени [Salma, 2020], контрактуры Дюпюитрена и болезни Пейрони (Ziegelmann, 2020), миомы матки (Corder, 2021). Получение с помощью коллагеназ отдельных клеток из тканей печени и поджелудочной железы позволяет использовать их для лечения хронического панкреатита и диабета (Loganathan, 2019; 2020).

Коллагеназы присутствуют в тканях животных, клетках микроорганизмов и корнях некоторых растений (Tandon, 2021; de Albuquerque Wanderley, 2017). Однако микроорганизмы в качестве продуцентов коллагеназ имеют ряд преимуществ: неограниченность источников получения, возможность экзогенной регуляции процессов жизнедеятельности, отсутствие прионов, относительная простота процессов выделения и очистки целевого продукта, возможность генно-инженерных манипуляций (de Albuquerque Wanderley, 2017; Sharkova, 2015; Zhang Y.Z., 2015; Pal, 2016). Первый коммерческий препарат

коллагеназ был получен с использованием *Clostridium histolyticum* (Daboor, 2010; Конон, 2019; Waycaster, 2018; Ziegelmann, 2020). Однако данный микроорганизм обладает рядом недостатков, к которым относится его патогенность, токсигенность и анаэробность (Daboor, 2010; Конон, 2019). Особый интерес в качестве продуцентов коллагенолитических протеаз вызывают микромицеты, так как использование этих микроорганизмов позволяет варьировать различные типы ферментаций, получая различные количества ферментов или даже ферменты с разными свойствами (Osmolovskiy, 2016; Silva, 2018; Souza, 2022; Zhao, 2019). Несмотря на существование многочисленных исследований, посвященных изучению гидролитической активности различных микроорганизмов, в настоящее время поиск новых эффективных продуцентов протеаз с коллагенолитической активностью остается актуальной биотехнологической задачей.

Цель и задачи исследования. Целью исследования является разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов из коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЛАР.

Для достижения указанной цели, необходимо решить **следующие задачи:**

- - провести анализ коллагенолитической активности коллекционных культур при поверхностном и глубинном культивировании на средах с коллагеном для выявления наиболее перспективных штаммов;
- - оценить параметры роста, протеолитическую и коллагенолитическую активность внеклеточных ферментов, секретируемых микромицетами при погруженном культивировании;
- - изучить механизмы экзогенной регуляции биосинтетической активности микромицетов и разработать способы ее повышения;
- - разработать методы очистки ферментных препаратов и изучить их физико-химические и биологические свойства;
- - провести сравнительный анализ секреции коллагенолитических протеиназ при глубинном и твердофазном культивировании;
- - изучить жизнеспособность и ферментативную активность мицелиальных грибов в процессе различных способов хранения.

Научная новизна работы.

Новизна работы заключается в том, что предложен комплекс критериев, позволяющих проводить отбор перспективных продуцентов коллагенолитических ферментов. Выявлен и охарактеризован коллекционный штамм *Aspergillus fumigatus* F 22 в качестве продуцента коллагенолитических ферментов. Оптимизирован состав питательной среды для культивирования и условия ферментации микромицета. Разработана оригинальная двух стадийная схема выделения протеазы, позволяющая провести очистку коллагенолитических ферментов в 25 раз и получить электрофоретически гомогенный препарат. Охарактеризованы некоторые физико-химические и биологические свойства коллагенолитической протеазы *A. fumigatus*. Впервые проведен сравнительный анализ коллагенолитической активности 47

коллекционных штаммов микромицетов до и после хранения на агаризованных средах. Разработаны условия криоконсервации и лиофилизации, позволяющие сохранять жизнеспособность, высокую продуктивность и коллагенолитическую активность продуцента.

Практическая значимость работы.

Изученные биотехнологические процессы позволили определить критерии для создания универсальной технологии и эффективного получения коллагенолитических ферментов с использованием микромицетов. Разработанный комплекс показателей дал возможность провести скрининг коллекционных культур из биокolleкции ВИЛАР и отобрать перспективный продуцент коллагеназ. Показано, что пассирование на культуральной среде с индуктором может являться перспективным подходом для увеличения коллагенолитической активности микромицетов. На основе изучения влияния качественного и количественного состава питательных сред и посевного материала оптимизированы условия культивирования продуцента. Разработанные методы выделения и очистки фермента до гомогенного состояния обеспечивают возможность проведения доклинических исследований с целью определения эффективности и биобезопасности препарата для использования в медицине.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработан комплекс показателей для выявления культур микромицетов с высокой активностью секретируемых коллагенолитических протеаз.
2. Микромицет *Aspergillus fumigatus* F 22 может рассматриваться в качестве перспективного продуцента коллагенолитических протеаз.
3. Ведущими факторами экзогенной регуляции биосинтетической активности *Aspergillus fumigatus* F 22 являются состав культуральной среды, пассирование на среде с индуктором – коллагеном и условия культивирования.
4. Разработан метод выделения и очистки нейтральной коллагенолитической протеазы серинового типа из культуральной жидкости *Aspergillus fumigatus* F 22.
5. Твердофазное культивирование *Aspergillus fumigatus* F 22 увеличивает продуктивность коллагенолитических протеаз.
6. Разработанные биотехнологические процессы, включающие методологию отбора продуцентов, оптимизацию условий культивирования и хранения, методы выделения и очистки фермента, могут служить основой для создания лабораторного регламента получения коллагенолитических протеаз.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует пунктам 1, 2 и 3 паспорта специальности «Биотехнология» (1.5.6.).

Методология и методы исследования. В работе использованы физические (микроскопия, центрифугирование, лиофилизация, криоконсервация), физико-химические (жидкостная хроматография, электрофорез), химические (определение ферментативной активности, концентрации БАВ), а также биологические методы исследования (поверхностное, погруженное,

твердофазное культивирование микромицетов, определение биомассы, расчет удельной скорости роста, определение КОЕ). Статистическая обработка экспериментальных данных проведена с использованием программы Microsoft Excel, сравнение групп данных - с применением критерия Стьюдента.

Апробация результатов. Материалы диссертации были представлены на следующих научных конференциях и форумах. Международная конференция молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Москва, 2019, 2020, 2021, 2022). XII Международная научно-практическая конференция Всероссийского общества научно-исследовательских разработок "PTSCIENCE" (Сочи, 2020). Юбилейная Международная научная конференция «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы», (Москва, 2021). Международная научно-практическая конференция «Вопросы образования и науки», (Тамбов, 2021). Международная научная конференции «От биохимии растений к биохимии человека» (Москва, 2022). V съезд микологов России (Москва, 2022).

Публикации. По результатам исследования опубликовано 18 печатных работ, в числе которых 5 работ из списка изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и входящих в базу данных RSCI на платформе WoS, из них 1 работа из базы данных Scopus.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке методов исследования, в реализации этих методов на протяжении всех этапов исследования, в анализе результатов.

Достоверность результатов исследования подтверждается их воспроизводимостью и корреляцией с применением независимых взаимодополняющих методов, а также их согласованностью с известными литературными данными.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.б.н., профессору Никитиной З.К., руководителю Центра биомедицинских технологий д.б.н. Краснову В.В., а также сотрудникам ФГБНУ ВИЛАР за помощь и поддержку, ценные замечания и предложения.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 172 страницах печатного текста, состоит из введения, семи глав, заключения, выводов, списка литературы. Работа содержит 26 таблиц, 46 рисунков и фотографий. Список использованной литературы включает 332 работы, в том числе 67 отечественных и 265 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы и определены основные направления исследования. Сформулированы положения, выносимые на защиту, новизна и практическая значимость работы.

Глава 1. Обзор литературы. Проведен анализ литературных данных по теме диссертации. Рассмотрены следующие вопросы. Структура и свойства коллагена. Коллагеназы, источники получения, свойства. Микробные коллагеназы, преимущества их получения, способы селекции продуцентов. Методы выделения и очистки ферментов, основные параметры для

характеристики их свойств. Практическое использование коллагенолитических протеаз. Роль способов консервации микроорганизмов для сохранения их жизнеспособности и биосинтетической активности.

Глава 2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись микромицеты из коллекции ФГБНУ ВИЛАР. Коллекция насчитывает 47 штаммов, относящихся к 38 видам и 8 родам: *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Monilia*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialophora*. Культуры микромицетов выращивали в течение 7-ми суток на поверхности скошенного агара, содержащего: а) среду Чапека-Докса; б) минеральный фон среды Чапека-Докса с заменой сахарозы на 2% коллаген (модифицированная среда).

Использовали следующие методы хранения культур: а) на поверхности скошенного агара Чапека-Докса, при 4-5⁰С с периодическими пересевами 1 раз в 6 месяцев (Бекмухамедова. 2021; Кривушина. 2019); б) на агаризованной среде с коллагеном вместо сахарозы при тех же условиях с пересевами 1 раз в месяц; в) на поверхности агаризованной среды Чапека-Докса под вазелиновым маслом при 4-5⁰С с пересевами через 2-4 года (Бекмухамедова. 2018; Sirbu, 2017).

Для хранения продуцента коллагенолитических протеаз – *Aspergillus fumigatus* был использован метод консервации смывов спор с агаризованных сред Чапека-Докса в присутствии 20% глицерина в криохранилище «Хронос» («Messer», Германия) при температуре жидкого азота (Prakash, 2012; Luciana, 2019; Kuchkevich, 2021). Для лиофильного высушивания спор гриба использовали 20% обезжиренное молоко (Sirbu, 2017; Prakash, 2012). До хранения и на различных его этапах определяли в пробах количество жизнеспособных клеток (ОФС 1.7.2. 0008.15, 2015) и коллагенолитическую активность, как это будет описано ниже.

Погруженное культивирование микромицетов проводили двумя способами. В колбах объемом 600 мл со 100 мл питательной среды на орбитальном шейкере при скорости вращения 220 об/мин при 26⁰С. Использовали разные варианты инокуляции посевного материала: а) засев спорами (от 10⁶ до 10⁷ спор/мл среды) в культуральную жидкость, содержащую солевой фон среды Чапека-Докса с частичной заменой сахарозы на коллаген; б) культивирование грибов на среде Чапека-Докса в течение 2 суток, а затем вегетативный посевной материал в разных количествах (5 и 10%) переносился на модифицированную среду (солевой фон среды Чапека-Докса, 0,5% сахарозы и 1,5% коллагена).

Во втором варианте глубинного культивирования микромицетов использовали ферментер MD-250-2,6 («Marubisi», Япония) объемом 2,7 л с 1 л модифицированной среды. Условия аэрации составляли 0,5 л/мин, скорость перемешивания – 150 об/мин. Для инокуляции использовали 5% мицелия, выращенного на среде Чапека-Докса в течение 2 суток.

При всех вариантах культивирования через определенные промежутки времени отбирали пробы, которые центрифугировали или фильтровали через мембранные фильтры. На основании определения количества биомассы

рассчитывали удельные скорости роста (Шлегель, 1987). В фильтратах или надосадочной жидкости определяли концентрацию белка, сахаров, протеолитическую и коллагенолитическую активность.

Твердофазное культивирование проводилось с мицелиальным грибом *Aspergillus fumigatus* F 22 в соответствии с рекомендациями, изложенными в ряде работ (Osmolovskiy, 2021; Souza, 2022). В качестве носителей использовали вермикулит («Morris Green», РФ) и шрот цветков пижмы (экспериментально-технологический отдел ФГБНУ ВИЛАР), к которым добавляли суспензию спор гриба ($2,4 \times 10^7$ КОЕ/мл) и такое количество модифицированной среды Чапека-Докса (солевой фон среды, 0,5% сахарозы, 1,5% коллагена), чтобы вся добавленная жидкость была связана (Osmolovskiy, 2021). Культивирование проводили в стационарных условиях при 28⁰С. Через определенные промежутки времени к колбам добавляли 0,05 М Трис-НСl буфера, рН 8,2 и инкубировали на роторном шейкере при 150 об/мин в течение 45 мин. Отделение биомассы и носителя проводили фильтрованием, определяя в фильтратах активность коллагенолитических протеаз. Биомассу определяли гравиметрически.

Коллагенолитическую активность микромицетов при поверхностном культивировании на модифицированной среде Чапека-Докса с заменой сахарозы на 2% коллаген (АО «Реахим», РФ) оценивали в соответствии с ранее описанными методами с некоторыми модификациями (Яковлева, 1994; Lima, 2009; Bhagwat, 2015; Blieva, 2020), определяя диаметры зон лизиса, радиальную скорость роста и индексы лизиса. Индексы лизиса (Ил) рассчитывали по формуле: $Ил = Dл^2 / Dк^2$, где $Dл$ и $Dк$ – средние диаметры зон лизиса и колоний соответственно (Яковлева, 1994).

Для определения коллагенолитической активности (КЛА) в растворах фермента к 1 мл фильтрата, супернатанта после центрифугирования или элюента приливали 1 мл 1% суспензии коллагена (коллаген тип I, Sigma-Aldrich, США) в 0,01М фосфатном буфере рН 7,4, содержащем 0,2 мкМ CaCl₂. Длительность гидролиза составила 2 часа при температуре 37⁰С. Контролем служила смесь 1 мл буфера и 1 мл 1% суспензии коллагена (контроль субстрата), а также смесь 1 мл раствора с 1 мл буфера (контроль фермента). Реакцию останавливали кипячением в течение 20 мин. Осадок отделяли центрифугированием, КЛА в надосадочной жидкости определяли по накоплению аминокрупп и выражали в мкМ свободных аминокрупп аминокислот, образующихся в течение 1 минуты 1 мл раствора фермента (Е/мл). Удельную коллагенолитическую активность (УКА) рассчитывали, как отношение КЛА к содержанию белка в образце (Е/мг). Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр «Shimadzu MPS – 2000» (Япония).

Для выделения и очистки фермента образцы фильтрата или супернатанта, полученные после отделения биомассы и обладающие максимальной КЛА, наносили на колонку, заполненную гелем Toyopearl HW-40 («Tosoh», Япония). Материал, обладающий максимальной КЛА, собирали и подвергали

дальнейшей очистке, используя аффинную хроматографию на сорбенте, полученным иммобилизацией желатина («Sigma», США) на CNBr-активированной сефарозе («GE Healthcare Life Sciences», США) (Tillib, 2014).

Оценку гомогенности и молекулярной массы полученного фермента проводили с помощью диск-электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-На (додецилсульфата натрия) (Шелудько, 1975), используя в качестве маркерных белков лизат сердечной мышцы (Zak, 1972).

Коллагенолитическую активность полученного фермента в различных областях рН анализировали, как это описано выше, используя 0,01М фосфатный буферный раствор рН: 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0. Температурный оптимум при гидролизе коллагена определяли таким же образом при температурах: 20⁰; 30⁰; 40⁰; 50⁰; 60⁰С. В обоих случаях полученные результаты выражали в процентах от максимальной активности.

Для проведения ингибиторного анализа использовали ЭДТА, ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид), ДТТ (дитиотреитол). КЛА определяли после предварительной инкубации 1 мкг фермента в течение 30 мин при 37⁰С с ингибиторами, вносимыми в концентрации 10 мМ (Markarian, 1994). Активность выражали в процентах от контроля без ингибитора.

Концентрацию белка определяли методом Лоури (Кусакина, 2012), свободные аминокислоты аминокислот – нингидриновым методом (Lee, 1996; Саламатов, 2007), сахаров – антроновым методом (Кусакина, 2012).

Статистическую обработку результатов проводили, используя распределение Стьюдента для малых выборок, данные выражали в виде $X \pm \sigma$, где X – среднее значение; σ – стандартное отклонение выборочного среднего. Различия между выборками считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Глава 3. Отбор микромицетов-продуцентов коллагенолитических протеаз

Для скрининга 47 коллекционных штаммов микромицетов использовалось поверхностное культивирование на агаризованных средах Чапека-Докса с заменой сахарозы на коллаген. Большинство изученных грибов росли на модифицированных средах и образовывали зоны лизиса. Однако не все культуры обладали одинаковым потенциалом к росту на таких средах. По результатам проведенных экспериментов были отбракованы следующие культуры: *Monilia implicate* F-15, *Penicillium brevicompactum* F-37, 49, *P. purpurerscens* F-18, *P. vitale* F-60 с низкими скоростями роста или отсутствием зон лизиса. Для остальных культур были рассчитаны средние за время культивирования скорости радиального роста и индексы лизиса.

В связи с тем, что оба показателя могут характеризовать потенциальную коллагенолитическую активность микромицетов (Bhagwat, 2015; Blieva, 2020; Lima, 2009), при их отборе для дальнейшего глубинного культивирования использовались культуры с высокими индексами лизиса и/или скоростями роста (табл. 1).

Таблица 1. Показатели коллагенолитической активности микромицетов при поверхностном (скорость роста, индекс лизиса) и глубинном (КЛА, УКА) культивировании на средах с коллагеном

| Микромицет | Скорость роста, мм/сут | Индекс лизиса | КЛА, Е/мл | УКА, Е/мг |
|---------------------------|------------------------|------------------|-------------------|-----------------|
| <i>A.flavus</i> 52 | 3,96±0,25 | 2,97±0,20 | 0,74±0,08 | 0,15±0,02 |
| <i>A.fumigatus</i> 22 | 5,55±0,43 | 1,35±0,11 | 136,1±12,1 | 20,6±1,7 |
| <i>A.mangini</i> 30s | 4,82±0,37 | 1,55±0,11 | 0,57±0,06 | 0,11±0,01 |
| <i>A.repens</i> 5 | 2,51±0,19 | 5,38±0,46 | 0,79±0,07 | 0,13±0,01 |
| <i>A.repens</i> 6 | 2,10±0,17 | 6,80±0,57 | 0,62±0,07 | 0,13±0,01 |
| <i>A.repens</i> 31 | 2,38±0,17 | 6,26±0,55 | 0,23±0,02 | 0,03±0,01 |
| <i>A.sydowii</i> 25 | 2,86±0,19 | 5,18±0,44 | 85,8±6,7 | 11,4±1,7 |
| <i>A.versicolor</i> 20 | 1,83±0,16 | 5,37±0,45 | 1,08±0,09 | 0,12±0,01 |
| <i>A.versicolor</i> 26 | 1,71±0,15 | 5,08±0,40 | 0,91±0,08 | 0,11±0,01 |
| <i>B. terrestris</i> 38 | 3,70±0,26 | 4,10±0,35 | 89,4±8,3 | 12,7±1,3 |
| <i>Cl. herbarum</i> 33 | 4,09±0,37 | 2,52±0,19 | 24,2±3,3 | 1,3±1,7 |
| <i>Cl. herbarum</i> 57 | 4,03±9,33 | 1,90±0,11 | 50,8±5,0 | 3,0±0,2 |
| <i>P. casei</i> 19 | 4,56±0,38 | 4,54±0,39 | 0,59±0,07 | 0,09±0,01 |
| <i>P. chrysogenum</i> 41 | 2,19±0,19 | 6,85±0,51 | 0,99±0,09 | 1,31±0,12 |
| <i>P. chrysogenum</i> 53 | 4,61±0,34 | 2,11±0,19 | 1,03±0,09 | 1,37±0,12 |
| <i>P. decumbens</i> 2 | 1,89±0,33 | 4,98±0,38 | 0,33±0,03 | 0,08±0,01 |
| <i>P. hirsutum</i> 29 | 4,24±0,30 | 2,34±0,20 | 0,61±0,06 | 0,09±0,01 |
| <i>P. italicum</i> 17 | 3,40±0,25 | 5,06±0,43 | 0,39±0,04 | 0,03±0,01 |
| <i>P. martensii</i> 63 | 4,87±0,33 | 2,18±0,18 | 0,47±0,04 | 0,11±0,01 |
| <i>P. purpurogenum</i> 27 | 5,97±0,41 | 1,20±0,09 | 0,15±0,01 | 0,01±0,014 |

Отобранные по результатам поверхностного культивирования мицелиальные грибы были использованы для проведения пилотного глубинного культивирования при условиях, ранее описанных в литературе (Сухосырова, 2007). Следует отметить, что все отобранные культуры секретировали в культуральную жидкость ферменты с коллагенолитической активностью. В то же время выявлено 5 штаммов, ферментативная активность которых

значительно превышала аналогичные показатели других культур (табл. 1): *A. fumigatus* F 22, *A. sidowii* F 25, *Botritis terrestris* F 38, *Cl. herbarum* F 33 и 57. Указанные микромицеты были использованы для дальнейшего более детального изучения.

Показано, что у всех культур к 3-4 суткам культивирования наблюдалась полная утилизация сахарозы и начало активного накопления внеклеточного белка. Обнаружено, что мицелиальный гриб *A. fumigatus* F 22 обладал наибольшей удельной скоростью роста и количеством образовавшейся биомассы (табл. 2).

Таблица 2. Параметры роста, максимальная протеолитическая (ПЕ) и коллагенолитическая (КЛА) активность микромицетов при глубинном культивировании

| Микромицет | Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | Биомасса, г/л | КЛА, Е/мл | Время, сутки |
|---------------------------|--|---------------|------------|--------------|
| <i>A. fumigatus</i> F 22 | 0,025±0,002 | 30,0±0,2 | 127,3±10,7 | 6 |
| <i>A. sidowii</i> F 25 | 0,013±0,001 | 11,0±0,1 | 81,4±7,8 | 8 |
| <i>B. terrestris</i> F 38 | 0,014±0,001 | 10,0±0,2 | 83,6±8,1 | 7 |
| <i>Cl. herbarum</i> F33 | 0,012±0,001 | 6,0±0,1 | 22,6±2,0 | 7 |
| <i>Cl. herbarum</i> F 57 | 0,013±0,001 | 9,2±0,2 | 47,5±5,1 | 7 |

У этого же микромицета зафиксированы более высокие значения коллагенолитической активности на всех этапах культивирования. Максимальные значения КЛА также обнаружены у *A. fumigatus*, которые наблюдаются на более ранних этапах культивирования (табл. 2). В связи с полученными результатами микромицет *A. fumigatus* F 22 был выбран для дальнейших исследований в качестве перспективного продуцента коллагенолитических протеаз.

Глава 4. Изучение секреции коллагенолитических протеаз при глубинном культивировании *Aspergillus fumigatus*

Известно, что количественный и качественный состав индукторов синтеза протеаз в питательной среде может существенно влиять на выработку соответствующих ферментов (Osmolovskiy, 2016; Zhang, 2015; Pal, 2016; Liu, 2019). В связи с этим было изучено влияние соотношения сахарозы и коллагена в питательной среде на выработку микромицетом

коллагенолитических протеаз (рис. 1, табл. 3). Можно видеть, что максимальная коллагенолитическая активность наблюдалась при соотношении сахара:коллаген равным 0,5:1,5 (вариант № 4).



Рис. 1. КЛА *A. fumigatus* при различных условиях культивирования (сахара:коллаген - 1(0,1:1,9); 2(0,5:1,5); 3(1,0:1,0); 4(1,5:0,5); 5(2,0:0)).

Таблица 3. Максимальна КЛА *A. fumigatus* в зависимости от состава питательной среды.

| Сахароза: коллаген | КЛА, Е/мл | Время, сутки |
|--------------------|-------------|--------------|
| 0,1:1,9 | 38,08±5,01 | 4 |
| 0,5:1,5 | 133,77±1,67 | 6 |
| 1,0:1,0 | 105,71±1,17 | 8 |
| 1,5:0,5 | 51,77±0,67 | 9 |
| 2,0:0 | 3,51±0,33 | 9 |

Состав источников углерода и азота в питательной жидкости существенно влияет на секрецию ферментов при культивировании микроорганизмов (Osmolovskiy, 2016; Liu, 2019; da Silva, 2013). Показано, что наибольшая активность коллагенолитических протеаз *A. fumigatus* в культуральной жидкости фиксировалась при использовании сахарозы. Введение в среды фруктозы и глюкозы снижало КЛА на 33 и 25% соответственно. Варьирование различных белковых субстратов в составе питательных сред показало, что максимальная КЛА наблюдалась при использовании коллагена, замена в среде белка на альбумин или казеин снижала коллагенолитическую активность в 15 и 8 раз соответственно. Введение в среды вместо коллагена дрожжевого экстракта и пептона также снижало КЛА в 6,6 и 2 раза соответственно. В дальнейшей работе в качестве основной питательной среды использовалась модифицированная среда, содержащая солевой фон среды Чапека-Докса, 0,5% сахарозы и 1,5% коллагена.

Важным фактором оптимизации биосинтетических процессов при культивировании микроорганизмов является количество посевного материала (Liu, 2019; da Silva, 2013). Как показали проведенные эксперименты, при изменении количества спор в диапазоне от 1×10^6 до 10×10^6 в мл среды максимальная секреция коллагенолитических протеаз наблюдалась при

концентрации 5×10^6 спор/мл, что позволило увеличить активность ферментов в 2,7 раза.

Одним из приемов, используемых для увеличения ферментативной активности микроорганизмов, является пассирование продуцентов на средах с индуктором выработки фермента (de Albuquerque Wanderley, 2017). В проведенных экспериментах использовался пересев *A. fumigatus* на средах Чапека-Докса с полной заменой сахарозы на коллаген. При последующем глубинном культивировании показано статистически значимое увеличение удельной скорости роста микромицета после 3 и 4 пассажа на среде с коллагеном (табл.4). Одновременно фиксировалась и стимуляция секреции внеклеточных коллагенолитических протеаз (рис. 2). При этом не обнаружено статистически значимых различий максимальных значений КЛА у культуры 3 и 4 пассажа (табл. 4), однако время достижения максимальных значений ферментативной активности уменьшалось с 6 до 4 суток.

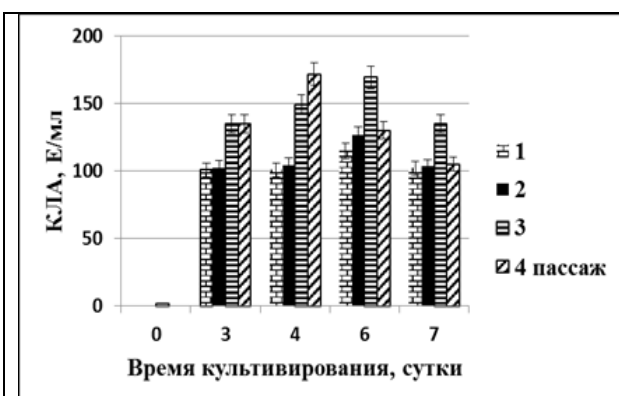


Рис. 2. Влияние количества пассажей на секрецию коллагенолитических протеаз *A.fumigatus*

Таблица 4. Влияние числа пассажей на скорость роста и максимальную КЛА *A. fumigatus*

| № пассажа | Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | КЛА, Е/мл |
|-----------|--|------------|
| 1 | 0,019±0,02 | 115,2±8,4 |
| 2 | 0.018±0,02 | 126,6±9,3, |
| 3 | 0,028±0.03 | 169,5±11,2 |
| 4 | 0.036±0.03 | 172,0±11,2 |

Альтернативным вариантом инокуляции посевного материала при погруженном культивировании микромицетов является использование вегетативного мицелия (Osmolovskiy, 2016; Зиганшин, 2020). В связи с этим на следующем этапе проводилось сравнительное исследование параметров роста и ферментативной активности *A. fumigatus* при засеве спорами и вегетативным мицелием (табл.5).

Можно видеть, что удельная скорость роста была выше при использовании для инокуляции 10% мицелия, тогда как наибольшие значения КЛА и УКА фиксировались в случае использования 5% мицелия. Исходя из полученных результатов, для дальнейших экспериментов был выбран способ инокуляции 5% вегетативным материалом.

Таблица 5. Скорость роста и максимальная коллагенолитическая активность *A. fumigatus* при разных вариантах внесения посевного материала

| Посевной материал | Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | КЛА, Е/мл | УКА, Е/мг | Время, сутки КЛА/УКА |
|---------------------------------|--|--------------|-------------|----------------------|
| 5% мицелий | 0,020±0,002 | 198,40±15,03 | 90,18±10,61 | 6/6 |
| 10% мицелий | 0,028±0,003 | 156,15±13,82 | 63,96±5,34 | 5/5 |
| Споры 5x10 ⁶ спор/мл | 0,018±0,002 | 103,77±10,60 | 29,89±3,21 | 6/6 |

Пилотное масштабирование процесса культивирования *A. fumigatus* в ферментере показало, что удельные скорости роста при культивировании в ферментере и в колбах статистически значимо не отличались и составляли 0,027 и 0,029 ч⁻¹ соответственно, также как и максимальные значения УКА (рис 3, табл. 6).

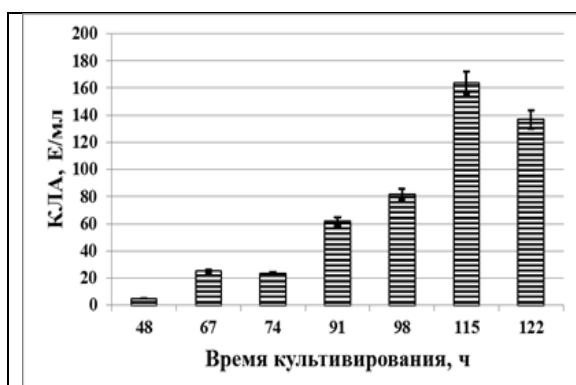


Рис. 3. КЛА *A. fumigatus* при культивировании в ферментере

Таблица 6. Максимальная коллагенолитическая активность *A. fumigatus* при разных способах культивирования.

| Способ ферментации | КЛА, Е/мл | УКА, Е/мг |
|--------------------|------------|-----------|
| Ферментер | 163,7±14,4 | 90,2±7,4 |
| Колбы на качалке | 198,4±15,0 | 90,9±10,6 |

Глава 5. Изучение секреции коллагенолитических протеаз при твердофазном культивировании *Aspergillus fumigatus*

При твердофазной ферментации (SSF) микробный рост происходит на твердой подложке со значительно меньшим количеством свободной воды (dos Santos, 2019; Soccol, 2017) и больше подходит для грибов из-за близости этого способа ферментации к их естественной среде обитания (Lucian, 2022). На основании имеющихся литературных данных (Osmolovskiy, 2021; Никитина, 2019) для проведения SSF в наших экспериментах были выбраны вермикулит и шрот цветков пажитки.

На всех этапах твердофазного культивирования *A. fumigatus* секреция коллагенолитических протеаз была выше при использовании шрота пажитки, по сравнению с вермикулитом. Максимальная КЛА увеличивалась в 3 и 5 раз при культивировании на вермикулите и шроте соответственно, по сравнению с

глубинным культивированием (табл. 7). При этом продуктивность так же увеличивалась в 3 раза, что хорошо совпадает с данными других авторов (da Silva, 2013; Osmolovskiy, 2021; Souza, 2022).

Таблица 7. Максимальная коллагенолитическая активность и продуктивность *A. fumigatus* при различных способах ферментации.

| Тип ферментации | КЛА, Е/мл | Продуктивность, Е/мг биомассы |
|------------------|-------------|-------------------------------|
| SSF, вермикулит | 591,3±48,7 | 39,71±2,33 |
| SSF, шрот пажиты | 1022,1±95,8 | 39,97±2,45 |
| SmF | 198,4±15,1 | 12,21±0,98 |

Глава 6. Разработка методов выделения и очистки коллагенолитической протеазы *Aspergillus fumigatus*

В проведенных исследованиях на первом этапе была выбрана гель-фильтрация на сорбенте с пределом исключения около 15 кДа. Как показали проведенные исследования, более 80% материала с коллагенолитической активностью после проведения хроматографии, обнаруживалось в первой фракции, которая соответствовала свободному объему колонки. Уже на этом этапе удалось очистить целевой белок почти в 6 раз (табл. 8).

Таблица 8. Результаты очистки коллагенолитической протеазы из культуральной жидкости *A. fumigatus* (на 100 мл питательной жидкости).

| Стадия очистки | Суммарный белок, мг | Суммарная активность, Е | Выход по активности, % | Удельная активность, Е/мг | Степень очистки, раз |
|------------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|
| Культуральная жидкость | 180 | 16351,14 | 100 | 90,85 | 1 |
| Гель-фильтрация | 24,3 | 13152,92 | 80,4 | 536,24 | 5,9 |
| Аффинная хроматография | 3,8 | 8592,15 | 52,6 | 2261,18 | 24,9 |

Аффинная хроматография раствора, полученного после гель-фильтрации и обладающего КЛА, позволила повысить степень очистки коллагенолитической протеазы еще в 4 раза с выходом более 50% (табл. 8). Проведенный анализ показал, что получен электрофоретически гомогенный препарат с молекулярной массой 40 кДа. Фермент обладал максимальной активностью при 40°C и рН 7,5. Анализ действия ингибиторов на коллагенолитическую активность протеазы *A. fumigatus* обнаружил, что фермент почти полностью терял активность под действием фенилметилсульфонилфторида – ингибитора

сериновых протеаз, и практически не инактивировался этилендиамидтетрауксусной кислотой – ингибитора металлопротеаз, то есть относился к термолабильным нейтральным протеазам серинового типа.

Глава 7. Влияние метода хранения на жизнеспособность и коллагенолитическую активность микромицетов

Метод хранения на агаризованных средах Чапека-Докса под вазелиновым маслом (Бахтиярова, 2018; Бекмухамедова, 2020; Sirbu, 2017) был использован нами в качестве основного для консервации коллекции микромицетов. Обнаружено, что все коллекционные штаммы после 4 лет консервации сохраняли жизнеспособность и росли на средах Чапека-Докса после пересева. В то же время интенсивность роста культур несколько снижалась после хранения и была различной у разных штаммов. Для проверки стабильности коллагенолитической активности микромицетов проводилось сравнение их индексов лизиса до и после консервации. Показано, что у 26 микромицетов не происходило статистически значимого изменения индексов лизиса. Для 10 грибов зафиксировано снижение указанного показателя в диапазоне 20-60%. Повышение показателя наблюдалось у 11 микромицетов, и было более значительным: от 1,4 до 4,5 раз. Полученные результаты делают необходимым использование альтернативных методов консервации по крайней мере для перспективных штаммов-продуцентов.

Известно, что лиофилизация и криоконсервация позволяют длительно сохранять жизнеспособность и биосинтетические свойства микроорганизмов (Бахтиярова, 2018; Кантерова, 2016; Sirbu, 2017). Именно эти два метода были адаптированы для консервации перспективного штамма-продуцента коллагенолитических протеаз *A. fumigatus* (табл. 9).

Таблица 9. Жизнеспособность *A. fumigatus* в процессе хранения при температуре жидкого азота и после лиофилизации.

| Способ хранения | До хранения | | 1 месяц хранения | | 3 месяца хранения | | 6 месяцев хранения | | 1 год хранения | |
|-----------------|-----------------------|-----|-----------------------|----|-----------------------|----|-----------------------|----|-----------------------|----|
| | КОЕ/мл | % | КОЕ/мл | % | КОЕ/мл | % | КОЕ/мл | % | КОЕ/мл | % |
| Криоконсервация | $2,5 \times 10^7 \pm$ | 100 | $1,5 \times 10^7 \pm$ | 60 | $1,4 \times 10^7 \pm$ | 56 | $1,4 \times 10^7 \pm$ | 56 | $1,5 \times 10^7 \pm$ | 60 |
| | $2,4 \times 10^6$ | | $1,6 \times 10^6$ | | $1,2 \times 10^6$ | | $1,3 \times 10^6$ | | $1,4 \times 10^6$ | |
| Лиофилизация | $4,0 \times 10^5 \pm$ | 100 | $3,0 \times 10^5 \pm$ | 75 | $3,4 \times 10^5 \pm$ | 85 | $3,2 \times 10^5 \pm$ | 80 | $3,3 \times 10^5 \pm$ | 83 |
| | $3,8 \times 10^4$ | | $3,1 \times 10^4$ | | $3,5 \times 10^4$ | | $3,0 \times 10^4$ | | $3,1 \times 10^4$ | |

Обнаружено, что процесс криоконсервации при температуре жидкого азота и лиофилизации приводит к снижению количества жизнеспособных клеток на 40

и 25% соответственно. Однако дальнейшее хранение образцов не вызывало статистически значимого изменения КОЕ/мл по крайней мере в течение года (время наблюдения).

Глубинное культивирование микромицета после 1 года хранения при условиях, описанных в главе 4, показало, что *A. fumigatus* секретировал коллагенолитические протеазы. При этом не обнаружено статистически значимых различий в величине максимальной КЛА до и после хранения. Однако на 4-6 сутки культивирования наблюдалась снижение активности секретируемых протеаз культурой после хранения, более выраженное после криоконсервации. В связи с этим изменялось и время достижения максимальных значений КЛА с 6 на 7 сутки.

ВЫВОДЫ

1. Изучение 47 коллекционных штаммов микромицетов при поверхностном и глубинном культивировании на средах с коллагеном, позволило выявить пять культур, обладающих значительной коллагенолитической активностью.

2. Анализ параметров роста и ферментативной активности отобранных культур показал, что наибольшая удельная скорость роста, протеолитическая и коллагенолитическая активность зафиксирована у микромицета *Aspergillus fumigatus* F 22, который был выбран для дальнейшего изучения в качестве перспективного продуцента коллагенолитических протеаз.

3. Изучение факторов экзогенной регуляции биосинтетической активности *Aspergillus fumigatus* F 22, таких как состав питательной среды, количество посевного материала, пассирование на среде с индуктором, способ инокуляции, позволило оптимизировать условия культивирования, повысить продуктивность гриба и провести масштабирование процесса получения коллагенолитических протеаз с использованием ферментера.

4. Разработана двух стадийная схема очистки коллагенолитической протеазы из культуральной жидкости *Aspergillus fumigatus* F 22, позволяющая получать электрофоретически гомогенный препарат с молекулярной массой 40 кДа и степенью очистки 25 раз. Проведенный анализ показал, что фермент относится к нейтральным протеазам серинового типа.

5. Обнаружено увеличение продуктивности микромицета при проведении твердофазного культивирования по сравнению с погруженным при использовании вермикулита и шрота пижмы.

6. Показано, что разработанные способы хранения на агаризованных средах с периодическими пересевами, криоконсервация при температуре жидкого азота и лиофилизация позволяют сохранять жизнеспособность и коллагенолитическую активность исследованных мицелиальных грибов.

7. Разработанные на примере *Aspergillus fumigatus* биотехнологические процессы могут служить основой универсальной технологии получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Изучение коллекционных штаммов микромицетов для поиска культур с коллагенолитической активностью. // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2020. 23(7). 3-8. doi.org/10.29296/25877313-2020-07-00.
2. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Изучение коллагенолитических свойств коллекционных штаммов микромицетов при длительном хранении. // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2021. 24(3). 33-39. doi.org/10.29296/25877313-2021-03-05.
3. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Изучение протеолитической и коллагенолитической активности мицелиальных грибов в процессе глубинного культивирования. // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2022. 25(9). 53-59. doi.org/10.29296/25877313-2022-09-08.
4. Никитина З.К., Насибов Э.М., Гордонова И.К., Савин П.С. Влияние условий культивирования *Aspergillus fumigatus* на секрецию коллагенолитических протеаз // Технологии живых систем -2023, 20(2). 5-17.
5. Насибов Э.М., Никитина З.К. Получение и свойства коллагенолитической протеиназы *Aspergillus fumigatus* // Химико-фармацевтический журнал. 2023. 57(7). 14-19. doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-7-14-19.

Публикации в других изданиях

1. Насибов Э.М., Никитина З.К., Гордонова И.К. Инновационные подходы в изучении микромицетов – продуцентов протеиназ // Сб. н. трудов 7 научной конференции с международным участием «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». М.: ВИЛАР 2019. 405-411.
2. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Скрининг коллекционных штаммов мицелиальных грибов для поиска перспективных продуцентов коллагеназ. // Научный альманах. 2020. № 1-2 (63). С. 91-97.
3. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Видовые и штаммовые различия коллагенолитической активности мицелиальных грибов. // SBN 978-118-74-3667-8, УДК, ББК, г. Сочи, РФ, Сборник тезисов XII Международной научно-практической конференции // Всероссийское общество научно-исследовательских разработок "PTSCIENCE". 2020. 1612-1617.

4. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Влияние длительного хранения на культуральные и биохимические свойства мицелиальных грибов. // *Colloquium–journal*. 2020. No. 20(72). Cz. 1. 4-9. doi.org/ 10.24411/2520-6990-2020-12070.
5. Насибов Э.М., Никитина З.К., Гордонова И.К. Изучение стабильности коллагенолитической активности различных видов и штаммов рода *Penicillium*. // Сб. трудов Международной научной конференции молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». М.: ВИЛАР. 2021. 145-152. doi.org/ 10.52101/9785870190921_2021_8_145.
6. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Изучение стабильности коллагенолитической активности различных видов и штаммов рода *Aspergillus*. // *Colloquium-journal*. 2021. No. 1(88), Cz. 1. 11-16. doi.org/ 10.24412/2520-2480-2021-188-11-16.
7. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Сравнительная характеристика коллагенолитической активности грибов, относящихся к различным родам. // Сб. трудов Юбилейной Международной конференции «От растения до лекарственного препарата». М.: ВИЛАР. 2021. 293-300 doi.org/ 10.52101/9785870191003_2021_293.
8. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Сравнительное изучение жизнеспособности и протеолитической активности микромицетов, относящихся к различным родам. // Научный альманах. 2021. № 5-2(79). 84-89.
9. Насибов Э.М., Никитина З.К., Гордонова И.К. Сравнительное изучение активности коллагеназ мицелиальных грибов рода *Aspergillus*. // В сб. Международной научной конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». М.: ВИЛАР. 169-176. doi.org/ 10.52101/9785870191027_2021_169.
10. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Использование модифицированных белков для оценки коллагенолитической активности грибов. // *Colloquium-Journal*. 2022. No. 1(124). Cz. 2. 9-12. doi.org/ 10.24412/2520-6990-2022-1124-9-12.
11. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Оценка роста и продуктивности мицелиальных грибов в процессе глубинного культивирования. // В сб. Международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека». М.: ВИЛАР. 2022, 112-116. doi.org/ 10.52101/9785870191041_112.
12. Насибов Э.М., Гордонова И.К., Никитина З.К. Синтез протеолитических ферментов микромицетами при культивировании на модифицированных средах // Современная микология в России/ 2022. 9. 392-394.
13. Насибов Э.М., Никитина З.К. Влияние посевного материала на синтез протеаз микромицетом *Aspergillus fumigatus*. // Успехи медицинской микологии. 2023. 25. 219-223. doi.org /10.14427/amm.2023.xxv.13.