

Федеральное бюджетное государственное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и
ароматических растений

На правах рукописи

Насибов Элвин Мубариз оглы
**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
ПОЛУЧЕНИЯ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОМИЦЕТОВ**

1.5.6. – биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор,
Никитина Зоя Кимовна

Москва - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 6 |
| ВВЕДЕНИЕ | 8 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | |
| 1.1. Особенности структуры, свойства и применение коллагена | 20 |
| 1. 2. Коллагеназы. | 20 |
| 1.2.1. Общие сведения о протеолитических ферментах. | 20 |
| 1.2.2. Коллагеназы и источники их получения. | 21 |
| 1.2.2.1. Коллагеназы животных | 22 |
| 1.2.2.2. Коллагеназы растений | 26 |
| 1.2.2.3. Микробные коллагеназы | 27 |
| 1.2.3. Скрининг и определение активности коллагеназ | 30 |
| 1.2.4. Оптимизация условий получения микробных коллагеназ | 32 |
| 1.2.5. Очистка и характеристика фермента | 37 |
| 1.2.6. Особенности получения грибных коллагеназ | 38 |
| 1.3. Использование коллагеназ в различных областях жизнедеятельности человека | 42 |
| 1.3. 1. Коллагеназы в медицине и фармации | 42 |
| 1.3.2. Применение коллагеназ в пищевых отраслях | 53 |
| 1.3.3. Применение коллагеназ в других областях | 56 |
| 1.4. Способы хранения микроорганизмов | 59 |
| 1.5. Заключение по обзору литературы | 66 |
| ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | |
| 2.1. Объекты исследований | 67 |
| 2.2. Поддержание культур микромицетов | 67 |
| 2.3. Методы хранения микромицетов | 67 |
| 2.3.1. Хранение на среде Чапека-Докса | 67 |
| 2.3.2. Хранение на среде с индуктором (коллагеном) | 67 |
| 2.3.3. Хранение под вазелиновым маслом | 67 |
| 2.3.4. Криохранение при температуре жидкого азота (-196 ⁰ С) | 68 |

| | |
|--|----|
| 2.3.5. Лиофилизация | 68 |
| 2.3.6. Определение жизнеспособности культур после хранения | 69 |
| 2.4. Погруженное культивирование микромицетов | 69 |
| 2.4.1. Культивирование в колбах на шейкере | 70 |
| 2.4.1.1. Инокуляция спорами | 70 |
| 2.4.1.2. Инокуляция вегетативным мицелием | 70 |
| 2.4.2. Культивирование в ферментере | 71 |
| 2.5. Твердофазное культивирование <i>Aspergillus fumigatus</i> | 71 |
| 2.6. Определение протеолитической активности в культуральной жидкости | 72 |
| 2.7. Определение коллагенолитической активности | 73 |
| 2.7.1. Оценка коллагенолитической активности микромицетов при поверхностном культивировании | 73 |
| 2.7.2. Определение коллагенолитической активности в фильтратах культуральной жидкости и других растворах | 74 |
| 2.8. Методы выделения и очистки коллагенолитических ферментов | 75 |
| 2.8.1. Гель-фильтрация | 75 |
| 2.8.2. Аффинная хроматография | 75 |
| 2.9. Методы анализа полученных ферментных препаратов | 76 |
| 2.9.1. Электрофорез в ПААГ | 76 |
| 2.9.2. Определение оптимума pH и температуры ферментных препаратов | 78 |
| 2.9.3. Ингибиторный анализ | 79 |
| 2.10. Определение концентрации белка | 79 |
| 2.11. Определение аминокрупп аминокислот | 79 |
| 2.12. Определение сахаров антроновым методом | 80 |
| 2.13. Статистическая обработка результатов | 81 |
| РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | |
| ГЛАВА 3. ОТБОР МИКРОМИЦЕТОВ-ПРОДУЦЕНТОВ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ | |
| 3.1. Оценка коллагенолитической активности микромицетов при поверхностном культивировании на средах с коллагеном | 82 |

| | |
|--|-----|
| 3.2. Выбор перспективных культур для дальнейшего изучения при погруженном культивировании | 88 |
| 3.3. Изучение секреции протеолитических и коллагенолитических ферментов при глубинном культивировании микромицетов | 89 |
| ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СЕКРЕЦИИ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> | |
| 4.1. Выявление факторов экзогенной регуляции, влияющих на секрецию внеклеточных коллагенолитических протеаз | 97 |
| 4.1.1. Влияние состава питательной среды | 97 |
| 4.1.2. Влияние концентрации спор в посевном материале на секрецию коллагенолитических протеаз | 100 |
| 4.1.3. Зависимость коллагенолитической активности секретируемых ферментов от числа пассажей микромицета на среде с индуктором (коллагеном) | 102 |
| 4.1.4. Влияние способа инокуляции на секрецию коллагенолитических протеаз при глубинном культивировании <i>A. fumigatus</i> | 106 |
| 4.2. Масштабирование процесса культивирования <i>A. fumigatus</i> | 110 |
| ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ СЕКРЕЦИИ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> | |
| 5.1. Разработка способа твердофазного культивирования микромицета | 112 |
| 5.2. Влияние различных носителей и субстратов на секрецию коллагенолитических протеаз | 114 |
| 5.3. Сравнение коллагенолитической активности и продуктивности культуры при SmF и SSF-ферментации | 116 |
| ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> | |
| 6.1. Разработка методов выделения и очистки коллагенолитических ферментов из культуральной жидкости | 117 |
| 6.2. Изучение физико-химических и биохимических свойств полученных ферментных препаратов | 120 |

| | |
|---|-----|
| ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ МЕТОДА ХРАНЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ | |
| 7.1. Хранение на среде Чапека-Докса под слоем минерального масла | 123 |
| 7.2. Жизнеспособность <i>A. fumigatus</i> в процессе хранения при температуре жидкого азота и после лиофилизации | 126 |
| 7.3. Коллагенолитическая активность <i>A. fumigatus</i> после хранения при температуре жидкого азота и после лиофилизации | 127 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 128 |
| ВЫВОДЫ | 133 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 135 |

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АА – акриламид

АПФ – ангиотензин-превращающий фермент

БАВ – биологически активные вещества

БАД – биологически активная добавка

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВМД – врожденная мышечная дистрофия

ДДС-Na – додецилсульфат натрия

ДМСО - диметилсульфоксид

ДТТ – дитиотриэтол

КЛА – коллагенолитическая активность

КОЕ – колониеобразующие единицы

МБА – N, N метилен бисакриламид

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

ПЕ – протеолитическая активность

ПААГ – полиакриламидный гель

ТЕМЕД – N, N, N,`N –тетраэтилэтилендиамин

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФР – трансформирующий фактор роста

ТХУ – трихлоруксусная кислота

УКА – удельная коллагенолитическая активность

ФМСФ – фенилметансульфонилфторид

ЧСА – сывороточный альбумин человека

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СА – цистеиновый домен

САТ – каталитический домен

Су – цитозинный домен

DEAE – диэтиламиноэтил

ЕСМ – внеклеточный матрикс

FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств¹ США

Fi – фибронектиновый домен

FITC - флуоресцинизиотионат

Fn – фуриновый домен

GPI - гликозил-фосфатидилинозитоловый домен

HPX – гемопексин

IAA – йодуксусная кислота

IgG – иммуноглобулиноподобный домен

IL - интерлейкины

MMP – матричная металлопротеиназа

QFAT – однофакторный метод оптимизации питательных сред

RSM – метод поверхности отклика

TgF – трансформирующий фактор роста

TIMP – тканевой ингибитор металлопротеиназ

TM – трансмембранный домен

TNF – фактор некроза опухолей

ВВЕДЕНИЕ

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 [96, 242]. В связи с этим указанные ферменты используются для прогностических, диагностических, а также терапевтических целей в медицине [126]. Протеазы играют решающую роль в жизненном цикле всех организмов, в том числе инфекционных агентов, становясь основой новых лекарственных средств для лечения инфекций, вызванных вирусом иммунодефицита человека, коронавирусом и т.п. [173, 299]. Эти ферменты применяются для профилактики и терапии сердечно-сосудистых и воспалительных заболеваний, расстройств пищеварения, а также активация процессов регенерации [96, 186].

Среди протеаз, имеющих промышленное значение, особый интерес вызывают коллагенолитические протеазы (коллагеназы), обладающие способностью расщеплять различные типы коллагена [78, 91]. 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 [27, 49, 138]. В связи с этим коллагеназы имеют широкое применение в кожевенной, косметической, биомедицинской и пищевой промышленности в тех случаях, когда объектом воздействия является коллаген [91, 240, 283].

Особенно перспективным является использование коллагеназ в медицине. В последнее время разрабатываются терапевтические методы, основанных на малоинвазивных подходах, в том числе с использованием ферментов, к числу которых относятся коллагеназы [5, 77, 296]. Миграция клеток и

ремоделирование коллагена во время восстановления и регенерации тканей является важным этапом в процессе заживления ран, где коллагеназа играет ключевую роль [313]. Для улучшения процесса заживления используются мази с коллагеназой, которые осуществляют ферментативную очистку и потенциально облегчают процесс эпителизации во время санации [35, 36]. Другие применения фермента включают лечение грыжи межпозвоночного диска [324], фиброза и цирроз печени [271], контрактуры Дюпюитрена и болезни Пейрони [330], миомы матки [107]. Получение с помощью коллагеназ отдельных клеток из тканей печени и поджелудочной железы позволяет использовать их для лечения хронического панкреатита и диабета [210, 211].

Коллагеназы присутствуют в тканях животных, клетках микроорганизмов, корнях некоторых растений [116, 313]. Однако микроорганизмы в качестве продуцентов коллагеназ имеют ряд преимуществ: неограниченность источников получения, возможность экзогенной регуляции процессов жизнедеятельности, отсутствие прионов, относительная простота выделения и очистки целевого продукта, возможность генно-инженерных манипуляций [116, 240, 281, 327]. Первый коммерческий препарат коллагеназ был получен с использованием *Clostridium histolyticum* [28, 113, 313, 330]. Однако данный микроорганизм обладает рядом недостатков, к которым относятся его патогенность, токсигенность и анаэробность [28, 113]. 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 [238, 283, 290, 328]. 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.

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.

Научная новизна.

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.

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.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.6. – Биотехнология, а именно пункту 1: «Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии»; пункту 2: «Оптимизация процессов биосинтеза» и пункту 3: «Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения».

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 (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 странице 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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Особенности структуры, свойства и применение коллагена.

Коллаген — основной структурный белок межклеточного матрикса. Он составляет 25–33 % от общего количества белка в организме. У человека 50 % всего коллагена содержится в костях, где он составляет 90 % органического матрикса. Вторая половина сосредоточена в коже, соединительной ткани, хрящах, стенках сосудов, базальных мембранах и т. д. В разных тканях преобладают разные типы коллагена. Это определяется ролью коллагена в конкретном органе или ткани. [1, 27, 29, 196].

Основой коллагена является структура, носящая название тропоколлаген, состоящий из трех α -полипептидных цепей. Одна α -цепь коллагена содержит около 1000 аминокислот и отличается однообразным и монотонным аминокислотным составом. Примерно одну треть аминокислот составляет глицин; каждой пятой аминокислотой являются иминокислоты - пролин или гидроксипролин, а каждой десятой – аланин. В молекуле коллагена присутствует около 1% гидроксизина, содержится очень мало незаменимых аминокислот, полностью отсутствуют цистеин и триптофан. Наряду с аминокислотами в его составе присутствует от 0,4 до 12% углеводных остатков. Первичную структуру цепи коллагена можно представить в виде повторяющихся триплетов: Gly-X-Y, где X – чаще всего пролин, а Y – гидроксипролин [1, 49, 80, 196]. Три α -цепи перевиваются друг с другом, образуя плотный жгут (тропоколлаген). Все три цепи ориентированы параллельно, т.е. на одном конце молекулы имеются N-концы цепей, на другом, соответственно, C-концы [49].

Молекулы тропоколлагена объединяются с образованием фибрилл протоколлагена, которые состоят из повторяющихся тропоколлагеновых структур, уложенных вдоль волокна в виде параллельных пучков по типу «голова к хвосту». В параллельных рядах молекулы тропоколлагена сдвинуты относительно друг друга на расстояние 64 нм. Фибриллы в свою

очередь образуют коллагеновое волокно, а затем коллагеновый пучок из волокон (рис. 1) [25, 27, 83].

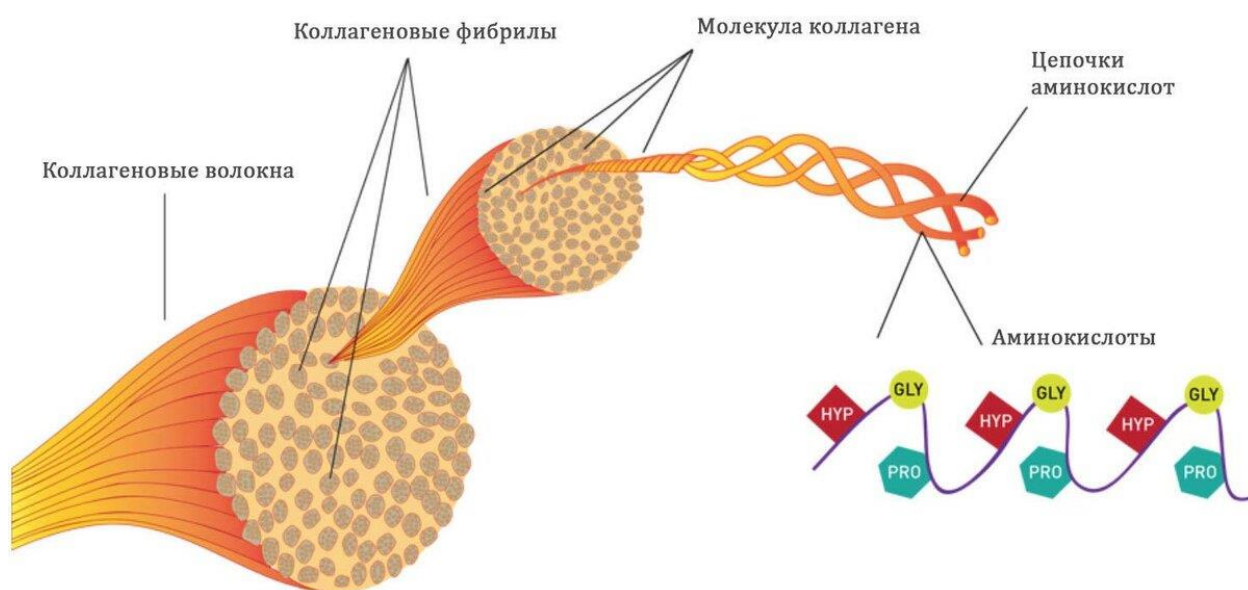


Рис. 1. Схема организации структуры коллагена [62]

Коллаген — ярко выраженный полиморфный белок. Он синтезируется разными клетками соединительной ткани (фибробластами, хондробластами, остеобластами), эпителиоцитами и эндотелиоцитами. В настоящее время известно 19 типов коллагена, которые отличаются друг от друга первичной структурой пептидных цепей, функциями и локализацией в организме (табл. 1). Вариантов α -цепей, образующих тройную спираль, около 30 [49]. Каждая из тройных спиралеобразных структур обозначается римской цифрой (I, II, III и т. д.). Каждая коллагеновая субъединица имеет обозначение как субъединица α , а ее типу присвоен номер ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ и т. д.) [39]. В организме человека составляют 95 % всего коллагена коллагены I, II и III типа, которые образуют очень прочные фибриллы. Поэтому эти типы коллагена часто называют интерстициальными. [25].

Существующие типы коллагена могут быть сгруппированы в четыре класса (табл. 2). Фибриллярный коллаген является наиболее распространенным коллагеном у позвоночных. Он играет структурную роль, внося вклад в молекулярную архитектуру, форму и механические свойства

тканей, такие как прочность на разрыв в коже и устойчивость к растяжению в связках [89, 252].

Таблица 1. Распределение коллагена в тканях и органах [16, 229, 292]

| Тип коллагена | Гены α -цепи | Ткани и органы |
|---------------|---------------------|---|
| I | COL1A1, COL1A2 | Кожа, сухожилия, кости, роговица, плацента, артерии, печень, дентин |
| II | COL2A1 | Хрящи, межпозвоночные диски, стекловидное тело, роговица |
| III | COL3A1 | Артерии, матка, кожа плода, строма паренхиматозных органов |
| IV | COL4A1-COL4A6 | Базальные мембраны |
| V | COL5A1-COL5A3 | Минорный компонент тканей, содержащих коллаген I и II типов |
| VI | COL6A1-COL6A3 | Хрящи, кровеносные сосуды, связки, кожа, матка, лёгкие, почки |
| VII | COL7A1 | Амнион, кожа, пищевод, роговица, хорион |
| VIII | COL8A1-COL8A2 | Роговица, кровеносные сосуды, культуральная среда эндотелия |
| IX | COL9A1-COL9A3 | Ткани, содержащие коллаген II типа |
| X | COL10A1 | Хрящи (гипертрофированные) |
| XI | COL11A1-COL11A2 | Ткани, содержащие коллаген II типа |
| XII | COL12A1 | Ткани, содержащие коллаген I типа |
| XIII | COL13A1 | Многие ткани |
| XIV | COL14A1 | Ткани, содержащие коллаген I типа |
| XV | COL15A1 | Многие ткани |
| XVI | COL16A1 | Многие ткани |
| XVII | COL17A1 | Гемидесмосомы кожи |
| XVIII | COL18A1 | Многие ткани, печень, почки |
| IXX | COL19A1 | Клетки рабдомиосаркомы |

Фибрилл-ассоциированные коллагены с прерывистыми тройными спиралями сами по себе не образуют фибрилл, но они связаны с поверхностью коллагеновых фибрилл. Коллаген типов IV, VIII, X, XV и XVIII входит в состав базальных мембран. Коллаген типа XV обнаружен в скелетной и сердечной мышцах, а коллаген типа XVIII является компонентом

печени. Другие типы коллагена находятся в очень низкой концентрации [136, 252].

Таблица 2. Основные структуры, образованные коллагеном [39, 89, 160]

| Группы | Тип коллагена | Органы локализации |
|------------------------|------------------------|------------------------|
| Фибриллярные | I, II, III, V, XI | Кость, кожа, сухожилия |
| Связанные с фибриллами | IX, XII, XIV, XVI, XIX | Хрящи |
| Образующие сеть | IV, VIII, X | Базальная мембрана |
| Микрофибриллы | VI | Межпозвоночные диски |
| «Заякоренные» фибриллы | VII | Кожа |
| Трансмембранные | XIII, XVII | Гемидесмосома |
| Прочие | XV, XVIII | Сердце, печень |

При многих патологических состояниях происходит нарушение метаболизма коллагена. Соотношением синтеза и распада белка во многом определяется степень фиброза легких и печени при воспалительных процессах различной этиологии [38, 175]. Синтез коллагена заметно увеличивается при заживлении ран. Фибробласты мигрируют в рану и начинают активно синтезировать в ней основные компоненты межклеточного матрикса. Результат этих процессов - образование на месте раны келоидного рубца, содержащего большое количество хаотично расположенных фибрилл коллагена [14, 21]. Подобным образом происходит замещение погибающих клеток соединительной тканью в печени при циррозе, в стенках артерий при атеросклерозе, в мышцах при дистрофии [38, 53]. Например, при повреждении эндотелия сосудов, гладкомышечные клетки под влиянием ТФР мигрируют во внутреннюю оболочку сосудов, пролиферируют, синтезируя коллагеновые, эластические волокна, протеогликаны, т.е. создают основу для формирования атеросклеротической фиброзной бляшки [5]. Болезнь Ульриха, возникающая вследствие мутации в одном из 3 генов (COL6A1, COL6A2, COL6A3) коллагена VI (COL6), является самой распространенной формой врожденной мышечной дистрофии (ВМД) в Европе [264].

Повышенный распад коллагена имеет место при так называемых коллагенозах: ревматизме, ревматоидном артрите, системной красной волчанке, а также при остеоартрозе, хроническом пародонтозе, злокачественных опухолях, усиленной резорбции костей, аневризме артерий и сердца и других заболеваниях [6, 20, 34, 51, 67].

Коллагены имеют промышленное применение, так как обладает рядом свойств, которые позволяют использовать его как биоматериал в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности [9, 16, 26, 166, 240]:

- физико-механические – высокая прочность на разрыв, низкая растяжимость, ориентация волокон;

- физико-химические – контролируемое поперечное соединение дубящими веществами, влияющими на растяжимость, набухание, резорбцию; ионообменные функции;

- биологические – низкая антигенность, стимуляция репарации поврежденных тканей, гемостатический эффект, способность к прямой адгезии клеток.

Белок может использоваться в качестве вспомогательных веществ при получении лекарственных средств [2, 10, 60]. При этом важным фактором является возможность получения коллагена в различных формах: листы [75, 106], трубки [98], пленки [309], мембраны [229], композиты [331], инъекционные растворы [224], дисперсии [226].

Коллаген часто служит матрицей для иммобилизации различных БАВ и лекарственных веществ, обеспечивая их направленную доставку при лечении ран, глазных и стоматологических заболеваний [26, 73, 152]. Описано применение белка в реконструктивной хирургии при дефектах кожи, ожогах, шрамах, травмах сухожилий и мышц [44, 152, 241]. Разработано и применяется много различных лекарственных форм на основе коллагена с гемостатическим действием для лечения кровотечений и ран [2, 9, 26, 152, 241]. Показано, что коллаген стимулирует рост и дифференцировку клеток,

регулируя различные клеточные функции, обеспечивая регенерацию тканей и органов, содержащих белок (хрящи, кости, кожа, связки) [73]. В связи с этим, коллаген и его гидролизаты широко используются при получении БАДов для укрепления связок, суставов, ногтей, увеличения эластичности кожи [3, 34, 196, 216]. В косметологии коллагенсодержащее сырье стимулирует выработку собственного коллагена, восстанавливая коллагеновый каркас кожи [284].

Показано, что пищевые продукты, дополненные коллагеном, могут обладать огромным потенциалом и пользой для здоровья [294]. Применение коллагена было предложено в продуктах питания, напитках, кондитерских изделиях, десертах [97. 198]. Коллагеновые пленки или покрытия помогают продлить срок годности продуктов, а также выполняют функцию носителей активных веществ. При этом в последние годы для этих целей используются нетрадиционные источники коллагена, такие как отходы переработки мясного сырья, коллагены рыб [16, 29].

Таким образом, коллаген – белок, содержащийся в различных органах и тканях человека и животных, обладающий специфичным аминокислотным составом, сложной вторичной и третичной структурой. Он участвует во многих физиологических и патологических процессах, обеспечивая функционирование различных систем жизнедеятельности организма. Это вызывает интерес к изучению структуры и свойств белка и различных способов его модификации: ферментативных, химических, физико-химических.

1.2. Коллагеназы.

1.2.1. Общие сведения о протеолитических ферментах.

Протеазы представляют собой обширную группу ферментов, гидролизующих пептидные связи, соединяющие соседние аминокислотные остатки в белковой молекуле, что приводит к образованию более коротких пептидов и аминокислот [261]. Протеазы обнаружены у всех эукариот и прокариот: растениях, животных, грибах, бактериях и археях. Некоторые

вирусы синтезируют свои собственные протеазы [90]. Согласно Международной классификации ферментов, протеазы относятся к классу 3 (гидролазы), подклассу 4, где каждому протеолитическому ферменту присвоен уникальный номер ЕС 3.4.xx [106].

Протеазы классифицированы на основе различных параметров, таких как: тип катализируемой реакции, субстрат реакции, оптимальный диапазон рН, механизм действие с участием конкретной аминокислоты, присутствующей в активном центре [149, 150]. В зависимости от места гидролиза в молекуле белка эти ферменты можно классифицировать как эндопептидазы и экзопептидазы. Первые действуют на неконцевые пептидные связи, что приводит к образованию более коротких пептидов, в то время как последние гидролизуют пептидные связи, расположенные на N- или C-концах субстрата (аминопептидазы и карбоксипептидазы соответственно) [232]. Другой подход к классификации протеаз основан на наличие специфического аминокислотного остатка (остатков) в активном центре. Исходя из этого подхода, основными классами протеаз являются сериновые, цистеиновые, треониновые, глутаминовые, аспарагиновые протеазы, металлопротеиназы (наличие металла в активном центре), смешанные протеазы и т. д. [106]. В настоящее время сформирована база данных MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) — ресурс, предоставляющий сведения о различных типах протеаз [259, 260]. Кроме того, протеазы подразделяются на щелочные, кислые и нейтральные протеазы на основе оптимального диапазона рН для их каталитической активности [297].

1.2.2. Коллагеназы и источники их получения.

Коллагеназы – это эндопротеазы, гидролизующие трех-цепочечную молекулу фибриллярного белка коллагена [77, 91, 240, 327]. Активное изучение коллагеназ началось в конце прошлого века с выделением внеклеточного фермента, синтезируемого патогенной бактерией *Clostridium histolyticum* [219]. Затем было проведено выделение, идентификация и

характеристика ряда других коллагеназ из прокариотических и эукариотических организмов [77, 116, 240]

Ферменты можно разделить на две группы в зависимости от способности гидролизовать нативный или денатурированный коллаген: истинные коллагеназы (обычно это металлопротеазы) и коллагенолитические протеазы соответственно [77, 91, 116]. Истинные коллагеназы расщепляют спиральные области молекул коллагена при физиологических условиях pH и температуры.

1.2.2.1. Коллагеназы животных.

Коллагеназы животных (ЕС 3.4.24.7, ЕС 3.4.24.34) представляют собой Ca^{2+} и Zn^{2+} зависимые матриксные металлопротеазы (ММП), которые расщепляют молекулы фибриллярного коллагена типа I, II, III, IV и XI в определенном месте тройной спирали по связи Gly-Leu/Pro, расположенной примерно на три четверти длины молекулы от N-конца, на два характерных фрагмента: 1/4 С-концевой и 3/4 N-концевой [140, 190, 213, 240]. Образовавшийся при этом денатурированный коллаген может быть дополнительно разрушен желатиназами. Этот процесс происходит в два этапа: сначала ММП нарушает тройную спираль коллагена, а затем фермент гидролизует пептидные связи (рис. 2) [91].

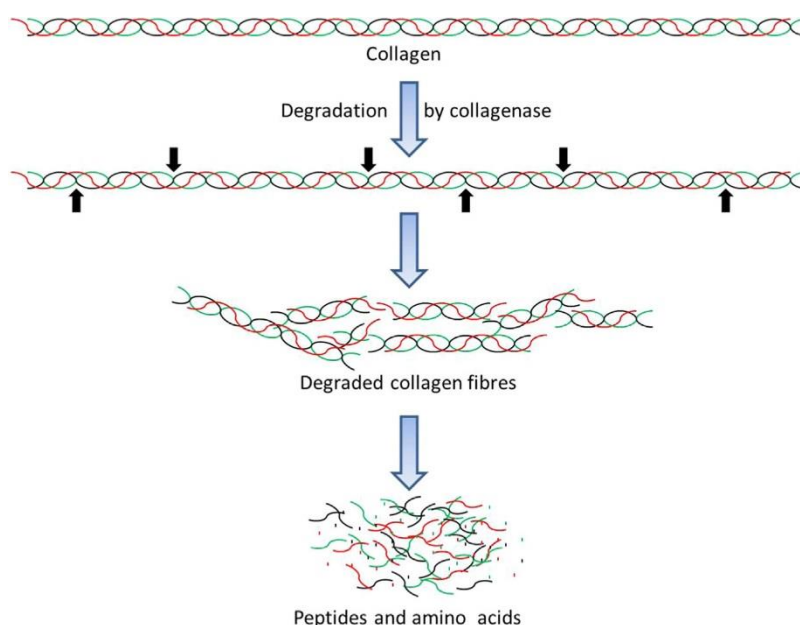


Рис. 2. Схема гидролиза коллагена [91].

У позвоночных идентифицировано 28 различных типов ММР, из которых по меньшей мере 23 экспрессируются клетками различных тканей человека. Ферменты представлены двумя типами в зависимости от их клеточного расположения: “секретируемые” и “связанные с мембраной”. ММР также подразделяются на 6 групп в соответствии с их структурой, функцией и субстратной специфичностью [190, 213, 240, 296]:

- коллагеназы (ММР-1, -8, -13, -18);
- желатиназы (ММР-2, -9);
- мембранного типа ММР (ММР-14, -15, -16, -17, -24, -25);
- стромелизины (ММР-3, -10, -11);
- матрилизины (ММР-7, -26);
- другие (ММР-12, -19, -21, -22, -23, -26 и -28).

Структура многих ММР в настоящее время довольно хорошо изучена (рис. 3). Все ферменты имеют продомен, каталитический домен с консервативным цинк-связывающим активным центром, а также содержат уникальные домены, которые отвечают за различные функции [180, 190, 213, 240, 327].

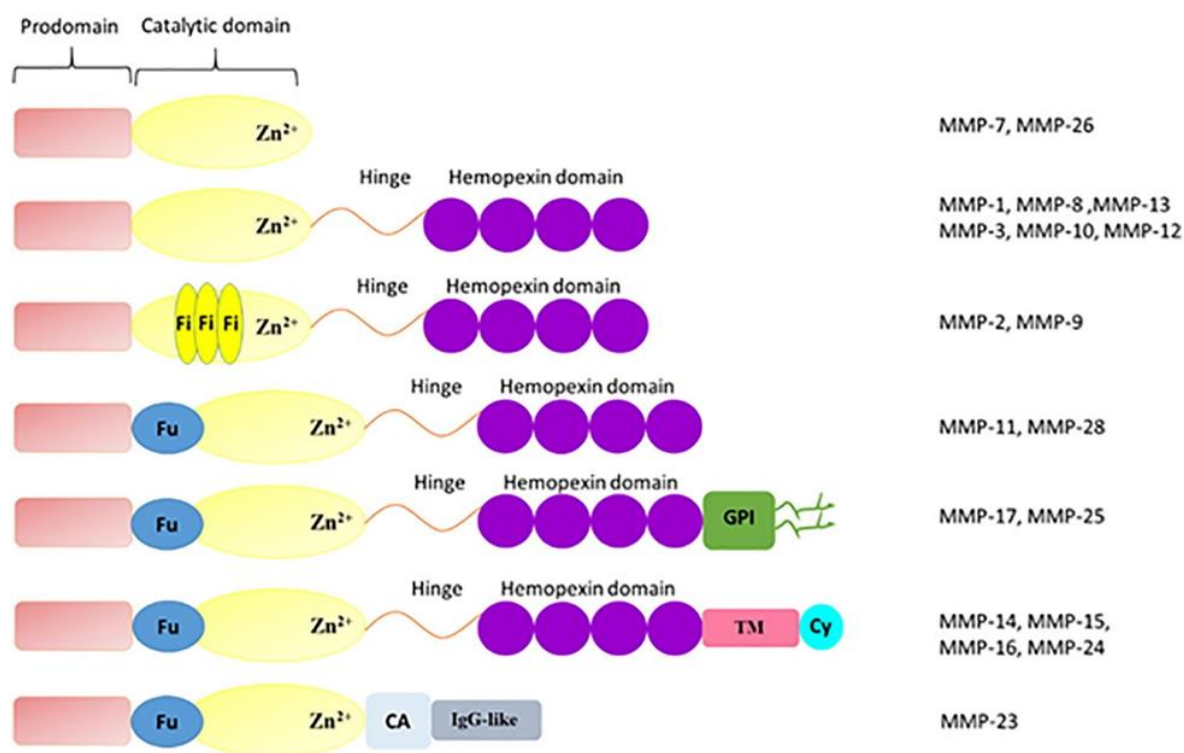


Рис. 3. Схематическая структура ММР [157, 180]. (Пояснения в тексте).

Продомен функционирует как аутоингибитор и поддерживает ММР в неактивном состоянии. Каталитический домен обеспечивает необходимую ферментативную активность за счет активного центра, содержащего последовательность аминокислот, ответственную за связывание с Zn^{2+} . Гемопексин-подобный домен (Hemopexin, HPX) отвечает за конфронтацию и связывание субстрата и соединен с каталитическим доменом посредством конформационно мобильной шарнирной части молекулы [217]. Домен гемопексина необходим для расщепления нативного фибриллярного коллагена, в то время как каталитический домен может расщеплять неколлагеновые субстраты [190, 213]. Некоторые классы ММР не содержат HPX-подобных доменов, некоторые из них имеют дополнительные домены, такие как фибронектин (Fi), фурин (Fu), трансмембранный (TM), цитозольный (Cy), цистеиновый (CA), иммуноглобулиноподобный (IgG-подобный) и гликозил-фосфатидилинозитоловый участки (GPI), а также якорные домены (для прикрепления к мембране) [157].

ММР играют важную роль в физиологических процессах, таких как эмбриогенез, дифференцировка клеток, ангиогенез, апоптоз, а также при некоторых патологиях, включая ревматоидный артрит, фиброз, онкологические заболевания [180, 190, 213]. Обнаружено, что ММР играют ключевую роль в метастазировании, так как повышение активности этих протеаз приводит к неконтролируемой миграции клеток, росту опухоли, метастазированию и ангиогенезу [127, 190, 213].

Активность ферментов в физиологических условиях жестко регулируется экспрессией генов, активацией или инактивацией с помощью ингибиторов, таких как эндогенные тканевые ингибиторы (TIMP). TIMP - специфические ингибиторы ММР, локализованные в тканях, нековалентно связываются с активным центром ферментов для предотвращения их активации. В плазме крови также присутствуют неспецифические ингибиторы ММР, такие как $\alpha 2$ -макроглобулин и $\alpha 1$ -антипротеаза [180, 190, 213, 296]. В свою очередь экспрессия TIMP регулируется цитокинами и факторами роста: фактор

некроза опухоли-альфа (TNF- α), интерлейкин-1 и -6 (IL-1 и IL-6) [190, 213, 332]. Активация MMP связана с некоторыми аутоиммунными заболеваниями: ревматоидный артрит, болезнь Крона, рассеянный склероз [303]. Баланс между активностью MMP и TIMP в тканях имеет решающее значение для гомеостаза, поскольку потеря контроля над протеазами может вызвать такие заболевания, как атеросклероз, фиброз и рак [190, 197, 213].

В последнее время с помощью ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа активно проводятся работы по моделированию молекулярной динамики взаимодействия MMP и коллагена для выяснения деталей процесса лизиса белка. Обнаружено, что в тройной спиральной структуре коллагена имеются локальные «области гибкости» с модуляцией межцепочечных солевых мостиков и водородных связей, способствующих доступности отдельных участков белка для фермента. НРХ-домен первоначально связывается с тройной спиралью белка и обеспечивает презентацию этих «областей гибкости» в активном центре каталитического (CAT) домена фермента [179].

Гидролиз различных типов коллагена зависит от вида коллагеназ, однако все ферменты расщепляют фибриллярный белок на фрагменты размером 3/4 и 1/4 молекулы и также проявляют активность в отношении других компонентов ЕСМ и растворимых белков. При этом одни и те же MMP могут синтезироваться различными клетками животных [228] (табл. 3).

Физико-химические свойства и гидролитическая активность коллагеназ, а также их способность лизировать различные типы коллагена в значительной степени зависят от вида животного, у которого синтезируются ферменты [72, 113, 123, 124]. В настоящее время изолированы, очищены и охарактеризованы коллагеназы из тканей различных животных [113, 123, 145] или продуктов их переработки [305]. Однако получение коллагеназ из тканей животных сложный и дорогостоящий процесс, обусловленный трудностями выделения, очистки и идентификации фермента, а также обычно крайне низкими концентрациями коллагеназ в исходном сырье [172].

Таблица 3. Классификация матриксных металлопротеаз (ММР)

| Тип ММР/ коллагеназа | Субстрат | Источники фермента | Литературный источник |
|----------------------------|---|---|------------------------------|
| ММР-1/ коллагеназа I | Коллаген I, II, III, VII, VIII, X, желатин, казеин, ламинин, фибронектин, витронектин, про- ММР-1, -2, -9 | Фибробласты, эндотелиальные клетки, кератиноциты, макрофаги, остеобласты, опухолевые клетки | [180, 190, 213, 240, 296] |
| ММР-8/ коллагеназа II | Коллаген I, II, III, V, VII, VIII, X, желатин, фибронектин, овостатин, протеогликан, матриксный гликопротеин | Хондрициты, моноклеарные фибробластные клетки, эпителиальные клетки и моноциты бронхов, кератиноциты, клетки меланомы | [180, 190, 213, 240, 296] |
| ММР-13/ коллагеназа III | Коллаген I, II, III, IV, VII, IX, X, желатин, казеин, фибронектин, плазминоген, остеонектин, ингибитор сериновых протеаз | Хондрициты, синовиальные клетки, клетки опухоли | [180, 190, 213, 240, 296] |
| ММР-18/ коллагеназа IV | Коллаген, желатин | Органы: молочные железы, плацента, легкие, поджелудочная железа, яичники, кишечник, селезенка, тимус, предстательная железа, толстая кишка и сердце | [190, 213, 240, 296] |

1.2.2.2. Коллагеназы растений.

Долгое время считалось, что протеазы из растительных источников не обладают коллагенолитической активностью, однако затем было показано, что и коллагеназы растений оказывают специфическое действие на нативный коллаген [184, 258]. При этом способность вырабатывать коллагеназы в растениях играет важную роль в защите от вредителей и экологических стрессов [147]. Выделены и охарактеризованы коллагеназы из смоковницы обыкновенной (*Ficus carica*), корневищ имбиря аптечного (*Zingiber officinale*) [184, 258]. В то же время, следует отметить, что биологические системы растений также сложны, как и метаболизм животных, что еще больше

ограничивает производство коллагеназ из растений в больших масштабах [91, 172].

1.2.2.3. Микробные коллагеназы.

Помимо животных, коллагеназы обнаружены у различных микроорганизмов [240]. Микробные коллагенолитические протеазы включают истинные коллагеназы (ЕС 3.4.24.3) и другие протеазы, обладающие коллагенолитической активностью. Коллагеназами обычно считаются ферменты, которые расщепляют спиральные области фибриллярного коллагена в физиологических условиях, тогда как для протеаз, которые могут гидролизовать только денатурированный коллаген или, по крайней мере, один из типов коллагена, предложено использовать термин “микробные коллагенолитические протеазы” [240, 327]. В отличие от ферментов животных, расщепляющих коллаген в ограниченном количестве специфических сайтов нативной трех-спиральной структуры белка [190, 213], коллагеназы микроорганизмов демонстрируют широкую субстратную специфичность и более сложный механизм действия [240, 257, 327].

Значительный интерес к протеазам микроорганизмов связан с рядом преимуществ их использования в качестве продуцентов этих ферментов [151]: неограниченные источники получения, высокие скорости роста, определяющие темпы производства и отсутствие влияния климатических факторов [94]. Кроме того, учитывая различные условия среды, из которой получены изоляты, можно получать ферменты с желаемыми характеристиками [253]. Например, для выделения термостабильных протеаз, перспективно использование термофильных бактерий, растущих в горячих источниках [267]. Короткое время генерации и относительно простой геном облегчают генетические манипуляции с микроорганизмами [76], что, в свою очередь, открывает перспективы для разработки технологий получения «индивидуальных» ферментов с желаемыми свойствами. Одной из проблем при работе с животными является соблюдение этических норм, которые отсутствуют в случае протеаз микробного происхождения [109, 110, 133].

Способность микроорганизмов продуцировать внеклеточные протеазы упрощает способы их получения, как в лабораторных условиях, так и в производственном процессе [261]. Возможность использования относительно дешевых субстратов или даже отходов при культивировании продуцентов также обеспечивает дальнейшее повышение экономичности технологий получения коллагеназ [158, 206].

Интерес к коллагеназам микроорганизмов связан также с тем, что ферменты считаются важными факторами вирулентности из-за их способности вместе с другими ферментами, такими как эластаза, разрушать внеклеточные структуры в организме хозяина. Это приводит к эффективной колонизации клеток хозяина, проникновению микроорганизмов в анаэробные участки, содействуя распространению инфекции и усугубляя воспалительный процесс [117, 240, 296, 301]. Детальные исследования биохимических и структурных свойств этого класса ферментов способствовали дальнейшему осознанию роли бактериальных коллагеназ [69, 165, 123, 240, 327]. Более того, бактериальные коллагеназы были исследованы как многообещающие мишени для ингибирования бактериальной инвазии [178, 185, 278].

В настоящее время большинство изученных микробных коллагенолитических ферментов отнесено к различным семействам: металлопротеазы семейства M9, сериновые протеазы семейств S1, S8 и S53, а также некоторые члены семейства U32. Члены семейства M9 - коллагеназы клостридий и вибрионов содержат консервативный цинк-связывающий участок с аминокислотной последовательностью (HEYTH), (HEFTH) или (HEYVN), который функционирует как каталитический домен [91, 125, 327]. Семейство S1 имеет в активном центре остатки His-Asp-Ser, в то время как семейство S8 характеризуется каталитической триадой Asp-His-Ser [91, 319, 327]. Члены семейства S53 обладают уникальной каталитической триадой в виде Glu-Asp-Ser [91, 302, 327]. Семейство U32 содержит множество коллагеназ неизвестного каталитического типа [91, 260, 327]. Основные

сведения о классификации коллагеназ микроорганизмов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Классификация коллагеназ микроорганизмов [91, 327]

| Семья | Класс | Название | Источник | Активный центр* | Субстрат |
|-------|-------|----------|---|------------------------|--|
| M9B | I | ColG | <i>Clostridium histolyticum</i> | HEYTH | Коллаген тип I, II, III |
| | I | ColA | <i>Clostridium perfringens</i> | HEFTH | Коллаген тип I, азокол |
| | II | ColH | <i>Clostridium histolyticum</i> | HEYTH | Коллаген тип I, II, III |
| M9A | II | VMC | <i>Vibrio mimicus</i> | HEYTH | Коллаген тип I, II, III, желатин, Cbz-GPLGP, Cbz-GPGGPA |
| | II | PrtVp | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 93 | HEYTH | Коллаген тип I, II, III, IV FALGPA |
| | III | VAC | <i>Vibrio alginolyticus</i> | HEYVH | Желатин, казеин, коллаген, синт. субстраты |
| | III | VPPC | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 04 | HEYVH | Коллаген тип I, желатин, казеин, Cbz-GPGGPA |
| | III | VPM | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> FYZ 8621.4 | HEYVH | Коллаген тип I, II, III, IV, желатин, казеин, Cbz-GPGGPA |
| S1 | | SOT | <i>Streptomyces omiyaensis</i> | His75, Asp120, Ser210 | Коллаген тип I, IV |
| | | SGT | <i>Streptomyces griseus</i> | His73, Asp118, Ser208 | Коллаген тип I |
| S8 | | | <i>Geobacillus collagenovorans</i> | Asp196, His260, Ser590 | Коллаген тип I, IV |
| | | MCP-01 | <i>Pseudoalteromonas sp.</i> | Asp49, His104, Ser269 | Коллаген тип I, II, IV, желатин, казеин |
| | | | <i>Myroides profundus</i> | Asp129, His174, Ser378 | Коллаген тип I, желатин |
| S53 | | | <i>Alicyclobacillus sendaiensis</i> | Glu78, Asp82, Ser278 | Желатин, коллаген денатурированный |
| U32 | | PrtC | <i>Porphyromonas gingivalis</i> | | Коллаген тип I, азокол |

*- последовательность аминокислот/каталитическая триада в активном центре фермента

1.2.3. Скрининг и определение активности коллагеназ.

В настоящее время представители *Clostridium sp.* в основном используются для производства коллагеназы в промышленных масштабах. Однако патогенная и анаэробная природа этого микроорганизма, а также синтез токсинов, ограничивает применение фермента и увеличивает стоимость его производства [91, 240]. В связи с этим, большое количество исследований направлено на поиск непатогенных или менее патогенных микроорганизмов, как альтернативных источников коллагеназ, которые могли бы обеспечить производство этого фермента экономически более эффективным способом [92]. Скрининг и выделение микроорганизмов с высоким выходом ферментов, разработка и оптимизация компонентов среды и условий ферментации для получения коллагенолитических ферментов с новыми улучшенными свойствами в настоящее время является одним из актуальных направлений биотехнологии [91, 92, 93, 137, 240, 327]. Следует отметить, что эффективность получения микробных протеаз всегда выше, чем использование клеток животных или растений, из-за ограниченных требований к питательным средам, условиям культивирования и более высокой производительности [91, 172]

Для качественного и количественного измерения активности продуцентов коллагеназ применяются различные методы. Качественный анализ активности коллагеназы проводят с помощью теста на гидролиз желатина или коллагена, которые присутствуют в различных питательных средах [91, 116, 240]. Продуценты коллагеназы могут быть идентифицированы в зависимости от зоны гидролиза. Для того, чтобы лучше выявить зону гидролиза, пластины заливают ТХУ, которая осаждает белки и просветляет зону гидролиза [93]. Продуктивность микроорганизмов можно определить с помощью того же метода, при этом учитывается отношение зоны гидролиза к диаметру колонии [92]. В другом варианте - для анализа коллагеназной активности используют бесклеточные экстракты, которые помещают в

лунки, сделанные в твердых средах. Прозрачные зоны вокруг лунок затем используются для количественной оценки активности фермента [203, 204].

Количественная оценка коллагеназы в значительной степени зависит от типа используемых субстратов и метода определения конечного продукта. В основном субстратами, используемыми для определения активности коллагеназы, являются нерастворимый коллаген, растворимый коллаген и желатин. В этом методе анализа соответствующая концентрация субстрата инкубируется с ферментом, и активность коллагеназы рассчитывается путем измерения свободных аминокислот, высвобождающихся под действием фермента. Активность коллагеназы выражается в мкмоль свободных аминокислот, образующихся в минуту на мл раствора фермента или на мг белка в опытной пробе [104, 203, 240, 293, 326]. Во всех этих методах использование кислоторастворимого коллагена и желатина дает быстрые результаты по сравнению с другими субстратами, реакции с которыми требуют большего времени инкубации (3-18 ч) [91, 240, 327].

Для облегчения и стандартизации анализа коллагенолитической активности применяются различные синтетические субстраты: 4-фенилазобензил-оксикарбонил-L-Pro-L-Leu-L-Gly-L-Pro-D-Arg (Pz-пептид); N- [3- (2- фурил-акрилоил)] - L-лейцилглицил-L-пролил-L-аланин (FALGPA); связанный с азокрасителем коллаген (азоколл). В последнем методе активность коллагеназы измеряется как количество фермента/мл, которое приводит к увеличению оптической плотности при 520 нм на 0,1. При этом CaCl_2 используется в качестве кофактора, а время реакции составляет 3-5 ч при максимальной температуре около 37°C [203, 204]. Маркировка белка радиоактивными изотопами или флуоресцирующими веществами также применяется для количественной оценки активности коллагеназы [81, 275, 292, 326]. Эти методы считаются более удобными и чувствительными, однако они требуют дорогостоящего оборудования и приводят к образованию радиоактивных отходов. Кроме того, хотя флуоресцирующие коллагены как субстраты кажутся более привлекательными, но мечение

флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) или биотином - трудоемкий и дорогостоящий процесс [240, 327]. Иммуноферментный анализ также был использован для обнаружения фрагментов коллагена [122].

Разработан и используется чувствительный, быстрый и специфичный метод электрофореза для определения активности коллагеназ. В этом методе коллаген включается в полиакриламидный гель и проводится SDS-электрофорез. Диффундируя через гель, фермент гидролизует коллаген и может быть обнаружен в виде прозрачных зон / полос, окруженных темным фоном окрашенного белка. Метод позволяет определять коллагеназы на уровне до нанограмма. Полосу активности коллагеназы можно визуализировать, окрашивая гель красителем кумасси синим [190].

В настоящее время разрабатываются методы, сочетающие эффективность и надежность анализа ферментативной активности с возможностью дальнейшей адаптации к автоматизированным платформам скрининга с высокой пропускной способностью. Так, на основе высокоспецифичного и чувствительного способа анализа коллагена в биологических образцах с использованием флуорогенного реагента, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, способного селективно обнаруживать N -концевые Gly-содержащие пептиды [321], был разработан метод определения активности коллагеназ в бактериальных лизатах на платформе 96-луночных планшет [301]. Разработанный анализ селективен и позволяет проводить скрининг и идентификацию различных вариантов коллагеназ в лизатах микроорганизмов [301].

1.2.4. Оптимизация условий получения микробных коллагеназ

В настоящее время производство микробных протеаз осуществляется с использованием как твердофазной (SSF), так и погруженной ферментации (SmF) [288]. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки. SSF – обладает большей эффективностью: за счет снижения затрат; более высокой степенью извлечения продукта в более концентрированной форме с высокой производительностью. Однако при

этом способе ферментации основным требованием является отсутствие свободной жидкой фазы в системе и не все микроорганизмы могут расти в условиях пониженной влажности. Кроме того, не полностью обеспечивается доступность компонентов среды, биосинтетические процессы протекают медленнее из-за влияния диффузионных ограничений; трудно контролировать параметры процесса [74, 106, 282]. При проведении SmF отмечается лучшее управление процессом, простое извлечение внеклеточных ферментов; облегченный тепло- и массообмен, диффузия компонентов среды, большая доступность масштабирования процессов ферментации. В то же время, следует отметить, что продукты находятся в разбавленном состоянии и менее стабильны, фиксируются высокие энергозатраты, высокая стоимость, которая определяет и стоимость получаемого продукта, большой выброс сточных вод [72, 106]. Как правило, для производства микробной протеазы с помощью SmF используются различные субстраты, такие как фруктоза, сахароза, лактоза, дрожжевой и кукурузный экстракт, пептон, патока, сложные промышленные побочные продукты [79, 116, 146]. Напротив, при SSF микробный рост происходит на твердой подложке со значительно меньшим количеством свободной воды, необходимой для поддержки метаболической активности и роста микроорганизмов [121, 287]. SSF больше подходит для грибов из-за близости этого способа ферментации к их естественной среде обитания и потребности во влаге по сравнению с бактериями [213]. SSF позволяет использовать многочисленные отходы агропромышленных производств, включая пшеничные отруби, пшеничную солому, шелуху, коровий навоз, жмых сахарного тростника, полимерные частицы и т.д. [121, 175, 183]. Следует подчеркнуть, что нет отработанных условий культивирования и оптимального состава питательных сред для культивирования и продукции микробных протеаз, и каждый штамм имеет свои особые пищевые и физико-химические требования для достижения максимальной выработки ферментов, которые обычно определяются опытным путем при любом способе ферментации [146, 288]. Сравнительные

исследования синтеза протеаз грибами при использовании SmF или SSF ферментации показали, что в последнем случае выход ферментов может в несколько раз превышать продуктивность, зафиксированную при глубинном культивировании [183, 206, 222, 328]. Однако, следует отметить, что в настоящее время примерно 90% промышленного производства ферментов осуществляется с помощью процессов погруженной, глубинной ферментации, используя микроорганизмы дикого типа или генно-инженерные продуценты [288].

Оптимизация компонентов питательной среды важна для повышения выработки коллагеназ. В большинстве литературных источников приводятся данные о получении ферментов с использованием метода погружной ферментации (SmF) [84, 91, 92, 203]. При этом для производства коллагеназы используются различные виды компонентов такие как очищенные субстраты: нативный коллаген, желатин, рыбий коллаген, и неочищенные субстраты: рыба кожа, побочные продукты мясной и рыбной промышленности [91, 240]. Использованный однофакторный метод оптимизации компонентов сред (OFAT), который характеризуется трудоемкостью и длительностью, позволил, однако, увеличить продуктивность некоторых культур. Так, продукцию коллагеназы штаммом *Bacillus cereus* MBL13 удалось увеличить до 35 Ед/мл [208], а *Bacillus cereus* и *Klebsiella pneumoniae* – до 23,07 и 10,53 Ед/мл соответственно [293]. Дальнейший прогресс в этом направлении был достигнут с помощью методологии поверхности отклика (RSM), которая позволяет преодолеть ограничения классической техники оптимизации сред и учитывать интерактивные эффекты исследуемых переменных. RSM - это метод, в котором статистические и математические системы применяются для оптимизации процессов, имеющих несколько переменных, которые могут повлиять на интересующую реакцию, и единственной целью является оптимизация этой реакции [92, 204]. Так, изучение продукции внеклеточной коллагеназы *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 методом RSM использовалось для выявления эффектов концентрации соевой муки,

начального рН среды, температуры и скорости перемешивания. Максимальная производительность коллагеназы (164 Ед/мл) наблюдалась при следующих условия производства: 0,75% соевой муки, рН 8,0; 28°C и 200 об/мин [202]. В другом исследовании для определения критических компонентов, влияющих на выработку коллагеназы, метод был использован с тремя критическими факторами: концентрация соевой муки; начальный рН среды и температура. Максимальная активность коллагеназы (283,36 Ед/мл) была обнаружена в среде, содержащей 1,645% соевой муки при рН 7,21. По сравнению с первоначальными результатами выход коллагеназы в этом исследовании был увеличен в 5 раз [205].

Все приведенные выше исследования касались влияния методов экзогенной регуляции на синтез микробных протеиназ. Отдельным направлением является использование методов генной инженерии для получения новых продуцентов [91, 240]. Микробные коллагеназы были очищены из ограниченного числа видов бактерий и их соответствующие гены были секвенированы и клонированы [70, 129, 131, 132, 170, 298, 318]. Коллагеназы и гены, кодирующие коллагеназы, были идентифицированы у многих видов *Clostridium*: *C. histolyticum*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. tetani* и *C. difficile* [123, 327]. Каталитический домен коллагеназы G из *C. histolyticum* был клонирован [132], экспрессирован в *E. coli* и очищен с использованием методов аффинной и эксклюзионной колоночной хроматографии [139]. Системы экспрессии *E. coli* были использованы для генных конструкций коллагеназы T из *C. tetani* и коллагеназы G и H из *C. histolyticum* [125, 235]. Ген коллагеназы из *Vibrio hollisae* также был клонирован, определена его полная нуклеотидная последовательность с последующей апробацией продукции рекомбинантного фермента в системе экспрессии *Brevibacillus* [298]. Клонирование генов коллагеназы G и H упростили разработку систем экспрессии микробной коллагеназы *C. perfringens* и облегчили проблемы трансляции и синтеза ColH [236].

Важным источником для производства рекомбинантных ферментов являются клетки дрожжей [37, 255]. Дрожжи – просто организованные эукариоты, обладают преимуществами в плане фолдинга и посттрансляционных модификаций целевого белка [37, 254]. В последние годы большой интерес привлекает *Pichia pastoris* в качестве систем экспрессии рекомбинантных коллагеназ. Так, на основе этих дрожжей была создана конструкция с высоким уровнем экспрессии в ней чужеродного гена пептидазы М9 *Aeromonas salmonicida* с последующим успешным клонированием гена пептидазы в вектор. На электрофореграмме белков культуральной жидкости, полученной от рекомбинантных клонов *Pichia pastoris* со вставкой гена пептидазы М9, выделен целевой белок в 120 кДа, который проявляет коллагенолитическую активность в отсутствие общей протеолитической активности [37, 40, 41]. Аналогичным образом была получена рекомбинантная аспарагиновая протеаза из *Rhizomucor miehei*, экспрессируемая в *Pichia pastoris*, которая, однако, обладала высокой общей протеолитической активностью (3480,4 Ед/мл) [288].

Изучена гетерологичная экспрессия коллагенолитической аспарагиновой протеазы из *Thermomucor indicae-seudaticae* в *Escherichia coli* и *Pichia pastoris*. Рекомбинантные ферменты, продуцируемые микроорганизмами, проявляют максимальную активность при рН 5,0 и 50°C и рН 5,0 и 60°C соответственно. Оба фермента были стабильны при рН 6,0 и 6,5 в течение 24 ч при 4°C и чувствительны к пепстатину А, β-меркаптоэтанолу и Hg²⁺. Показана возможность их потенциального применения в промышленных секторах, в которых используются коллагенолитические ферменты [245].

Терапия личинками *Lucilia sericata* получила широкое распространение в связи с увеличением числа хронических язв разной этиологии. Использование рекомбинантных секретируемых ферментов из этих личинок является новым неинвазивным методом лечения [283]. Коллагеназа *L. sericata* (ММР-1) экспрессируется и секретируется в слюнных железах личинок. Проведены исследования для получения рекомбинантного

фермента в клеточной культуре насекомых *Spodoptera frugiperda* (Sf9), используя систему экспрессии бакуловируса. Донорскими плазмидами, содержащими кодирующие последовательности коллагеназы *L. sericata*, трансфицировали клеточную линию Sf9, которая экспрессировала рекомбинантную коллагеназу (ММР-1). Биологическая активность очищенного фермента составляла 67 Ед/мл. [245].

Следует отметить, что, несмотря на появление новых работ, большая часть исследований по молекулярному клонированию была проведена с использованием генов клостридиальных коллагеназ. В связи с этим, в настоящее время существует потребность в клонировании, структурной и функциональной характеристике многих других микроорганизмов, обладающих коллагенолитической активностью [91].

1.2.5. Очистка и характеристика ферментов.

Очистка микробных коллагеназ затруднена из-за наличия множественных форм и других протеаз со схожими физическо-химическими характеристиками [240]. Однако она является необходимым этапом для изучения биохимических свойств фермента, его структуры, механизма катализа, взаимосвязи структура-функция и возможности практического применения. Разработаны способы очистки микробных коллагеназ из *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas* sp., *Rhizoctonia solani*, *Pseudomonas marinoglutinos*, *Porphyromonas gingivalis*, *Rathayibacter* sp., *Penicillium aurantiogriseum*, *Bacillus cereus*, *Vibrio vulnificus*, *Thermoactinomyces* sp., *Alicyclobacillus sendaiensis*, *Bacillus pumilus* [84, 91, 93, 203, 208, 240, 302]. При этом использовались многочисленные процедуры, такие как: осаждение белков сульфатом аммония с последующим диализом, ультрафильтрация, гель-фильтрация, ионообменная хроматография, аффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными металлам, или амилазой [91, 93, 125]. С помощью подобных процедур выделены и очищены некоторых рекомбинантные коллагеназы [91, 125, 240, 245, 298].

Степень очистки коллагенолитических протеаз варьирует в широких пределах. Так, ферменты из *Pseudomonas sp.* и *Bacillus cereus* были очищены в 15,4 и 20,4 раза соответственно [93, 325], тогда как термостабильная коллагеназа из *Thermoactinomyces sp.* была получена со 101-кратной очисткой [240].

Характеристика биохимических и физико-химических свойств очищенной коллагеназы важна для определения возможности и условий ее практического применения. Основные показатели, которые при этом изучаются, достаточно разнообразны: молекулярная масса, которая обычно колеблется от 30 до 120 кДа. Оптимальный диапазон pH варьирует от 4 до 10, в то время как оптимальная температура находится в диапазоне 30-65°C. Актуальным также является изучение активаторов и ингибиторов активности фермента. В большинстве случаев активность коллагеназ повышается в присутствии ионов Ca^{2+} и ингибируется ионами металлов Fe^{2+} и Hg^{2+} [77, 91, 116, 240, 296, 327].

1.2.6. Особенности получения грибных коллагеназ.

Среди микроорганизмов, продуцирующих коллагенолитические ферменты, мицелиальные грибы имеют ряд преимуществ, таких как высокая продуктивность, небольшое время генерации, способность к росту на относительно простых и дешевых средах, обеспечивающие высокий выход целевого продукта и низкую стоимость производства [116]. Кроме того, важным моментом является возможность посттрансляционной модификации и получения ферментов в биологически активной форме [202]. При использовании мицелиальных грибов в качестве продуцентов, синтезируемые коллагеназы чаще всего накапливаются внеклеточно, что облегчает их последующее выделение и очистку [272].

На основе систематического анализа литературных данных были установлены грибы - продуценты коллагенолитических протеаз, из которых большая часть относилась к 10 различным родам мицелиальных грибов (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Arthrotrichum*, *Monacrosporium*, *Trichophyton*,

Microsporium, Lecanicillium, Entomophthora, Micromycetes и *Lagenidium*), два рода были классифицированы как диморфные (*Coccidioides, Paracoccidioides*), и только у одного была морфология дрожжей (*Zygosaccharomyces*) [116]. С промышленной точки зрения патогенность отрицательно влияет при выборе микроорганизмов для последующего биотехнологического процесса, и более половины цитируемых работ посвящены изучению непатогенных штаммов. Классические возбудители различных заболеваний использовались в основном для того, чтобы лучше понять механизмы патогенеза и не были направлены на само производство ферментов [126, 169].

Выбор питательной среды имеет большое значение для получения коллагеназы, поскольку напрямую влияет на конечный результат и стоимость процесса. Культуральная среда в большинстве литературных источников, содержит в своем составе коллаген или желатин [218, 281, 304, 308]. При этом использование разных партий или типов коллагена влияют на активность ферментов. В некоторых исследованиях использовались другие источники углерода и азота с хорошими результатами [118, 202, 205, 212]. Таким образом, состав питательной среды является важным фактором экзогенной регуляции биосинтетической активности микромицетов и может существенно влиять на секрецию коллагенолитических протеаз.

Выбор условий культивирования может значительно увеличивать выход коллагеназы и снижать производственные затраты [156, 202, 205]. Исходный pH питательной среды влияет на многие метаболические процессы у микроорганизмов, такие как экспрессия внеклеточных ферментов, перенос субстратов через мембраны, которые влияют на синтез протеаз [262]. В литературе данные об оптимальном pH питательной среды колебались от 5,5 до 8,0 [118, 202, 205, 212, 281]. Температура также регулирует ферментативный синтез, секрецию ферментов, продолжительность фазы синтеза фермента [116]. Обычно используется температуры от 24 до 30⁰C [118, 202, 205, 212]. В некоторых случаях температуру повышали до 35-37⁰C

[218, 308], однако, обнаружено, что стимуляция роста мицелиальных грибов в этих случаях меняет метаболизм и ингибирует выработку протеаз [118]. Сообщается, что лучшими условиями для получения максимальной коллагенолитической активности с единицы объема культуральной жидкости и производства биомассы были 24⁰С и рН 7,0 [118, 202, 205].

Время ферментации до выработки коллагеназы мицелиальными грибами варьирует от 24 часов [202, 205] до 14 дней [304], при этом чаще всего указанный показатель находится в диапазоне 4 - 9 дней [212, 218, 281]. Влияние скорости качания на продукцию ферментов исследовалось значительно меньше. Обычно используются 150–200 об/мин. Попытки выявить оптимальную скорость качания в этом диапазоне показали, что 175 об/мин были лучшими для получения целевого продукта, хотя разница была небольшой по сравнению с другими условиями перемешивания [91].

Способы определения коллагенолитической активности грибов не отличаются от методов анализа, которые применяются для других микроорганизмов. Используются реакции нингидрина со свободными аминокеттогруппами [116, 212, 218]. В качестве субстратов может применяться коллаген, нативный или меченный флуорофорами или радиоизотопами, синтетические пептиды [325], азоколл [118, 166]. Не всегда в работах определяется удельная активность полученного фермента, так как эффективность производства обычно оценивается по объемной коллагенолитической активности из-за промышленного значения этого параметра [91, 116, 205].

Для очистки коллагеназ микромицетов из фильтратов или центрифугатов культуральной жидкости существуют традиционные методы выделения ферментов, такие как осаждение сульфата аммония, ультрафильтрация, экстракция трис–НСl буфером, буфером бикарбоната натрия, с последующим использованием хроматографических методов: гель-фильтрация, ионный обмен, гидрофобная и аффинная хроматография [116, 265, 281]. Однако при

этом многие авторы отмечают снижение ферментативной активности почти до половины от первоначальной [91, 218].

Анализ очищенных или частично очищенных коллагеназ мицелиальных грибов показал, что по многим показателям они аналогичны характеристикам тех же типов ферментов из других микроорганизмов. Так, оптимальный pH для активности коллагенолитических протеаз наблюдался в диапазоне 5-9, а температурный максимум варьировал от 35 до 70⁰C [116, 202, 205, 218].

Одним из важных направлений для характеристики коллагеназ микромицетов является применение ингибиторного анализа [116]. Некоторые соединения могут необратимо инактивировать коллагеназы, например, дитиотреитол (DTT) и меркаптоэтанол за счет восстановления S-S связей. Другими испытанными ингибиторами являются фенилметилсульфонилфторид (PMSF) для сериновых протеаз, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) для металлопротеаз и ионы Hg²⁺, йодуксусная кислота (IAA) для цистеиновых протеаз [113, 205]. Большинство исследованных коллагеназ относятся к сериновым протеазам, однако, были сообщения о смешанных типах ингибирования. Так, активность коллагенолитической протеазы из *Rhisoctonia solani* ингибировался йодацетатом и ЭДТА [91].

Специфичность коллагеназ по отношению к различным субстратам является одним из наиболее важных параметров, которые следует учитывать для определения возможности практического применения ферментов, таких как медицина, косметология, пищевая промышленность. Количество таких исследований крайне ограничено. Так, сравнительное исследование протеазы из *Rhisoctonia solani* в реакциях с коллагеном, казеином и желатином зафиксировало большую активность для коллагена [91]. В тестах на ферментативную специфичность, проведенных с сериновой коллагенолитической протеазой из *P.aurantiogriseum* на азоколле, коллагене тапа I, желатине и азоказеине, максимальная степень гидролиза зафиксирована для первого субстрата [202].

1.3. Использование коллагеназ в различных областях жизнедеятельности человека.

Большой интерес к коллагеназам микроорганизмов вызван возможностью их использования в различных областях жизнедеятельности человека (рис. 4).



Рис. 4. Применение коллагеназ [35, 40, 41, 77, 91, 240, 327]

1.3.1. Коллагеназы в медицине и фармации.

В последнее время в медицине большое внимание уделяется разработке терапевтических методов, основанных на малоинвазивных подходах, включающих применение различных ферментов [77]. Ферменты обладают высокой специфичностью, что позволяет им различать субстраты со сходной структурой и осуществлять процессы катализа биохимических реакций при очень мягких условиях температуры и pH [71]. Существует два основных направления использования ферментов в медицинской практике. При некоторых заболеваниях наблюдается снижение выработки ферментов или нарушение их структуры с изменением функциональной активности, которые часто вызваны врожденными или приобретенными мутациями [101]. В этом случае целью для действия многих лекарств является устранение

дисфункции ферментов [117]. Альтернативный подход предполагает использование этих БАВ в качестве собственно лекарственных средств, так называемых «терапевтических ферментов», влияющих на патологические процессы в организме [117, 296]. В этом случае ферменты используются для лечения ряда патологий: инфекционные, опухолевые, сердечно-сосудистые заболевания [103, 256].

В связи с растущим спросом на ферментативные методы лечения актуальным становится промышленное производство этих препаратов, объем которого постоянно увеличивается, в том числе с использованием экспрессии в клетках растений, млекопитающих и микроорганизмов (грибах, дрожжах или бактериях) [119]. Это отражается в увеличении числа разрешенных для применения в медицине ферментных препаратов в последние годы [117].

Коллагеназы рассматриваются в качестве одного из «терапевтических ферментов», которые используются в медицинской практике или находятся на различных этапах доклинических и клинических исследований при лечении целого ряда заболеваний [117, 296]. Эти ферменты в составе различных лекарственных средств довольно давно и успешно используются для лечения ран различной этиологии. При этом первым этапом является санация - удаление девитализированных (некротизированных) тканей и контаминаций из раны для улучшения последующего заживления [28]. Эта процедура, которая является жизненно важным фактором при подготовке раневого ложа, может быть выполнена хирургическим, химическим, механическим или ферментативным удалением ткани. Многие исследования подтвердили, что коллагеназа является безопасным и эффективным средством для этих целей [99, 223, 243, 246, 313]. Процесс санации с использованием коллагеназы применяется также для лечения пролежней, язв на ногах, хронических, незаживающих или вялых ран, которые считаются остановившимися в фазе воспаления [77, 159].

Следующим этапом при лечении ран является стимуляция процессов регенерации. Экспериментальные и клинические исследования показали, что

коллагеназы усиливают пролиферацию, ангиогенез и миграцию клеток кожи в процессе заживления ран [115, 243]. При этом стимулируется образование грануляционных и эпителиальных клеток, обеспечивая ускоренное заживление повреждений [113, 223, 243].

Ожоговые раны, вызванные пожарами, горячими жидкостями, паром, электричеством, являются одной из важных проблемой здравоохранения, так как могут приводить к инвалидности и гибели пострадавших [77]. При сравнительном исследовании эффективности использования различных ферментов было показано, что коллагеназа эффективна при ожогах ниже 25% поверхности тела, особенно в амбулаторных условиях [270]. В настоящее время стандартное лечение обожженных тканей с помощью этого фермента уже одобрено FDA [77]. Показано, что мазь с коллагеназой вызывает заживление ожоговой раны быстрее, чем стандартное хирургическое лечение. Так, 78 пациентов с ожогами, получавших мазь с коллагеназой *S. histolyticum*, были сравнены с 41 пациентом, у которых ткани вокруг ожоговых ран были удалены хирургическим путем [246]. Использование коллагеназы обеспечивало снижение времени госпитализации и сокращение общей потребности в хирургическом вмешательстве и переливании крови.

В процессе заживления ран в ряде случаев возникают осложнения, заключающиеся в образовании келоида, который возникает в результате чрезмерного роста грануляционной ткани (коллаген III типа) в месте излеченной травмы кожи [199, 207]. Их не следует путать с рубцами, которые не выходят за пределы исходной раны, тогда как келоиды образуются за пределами первоначального повреждения кожи [17, 207]. Келоиды трудно поддаются лечению из-за их склонности к рецидиву после иссечения. Показано, что коллагеназа является безопасным и достаточно эффективным средством лечения келоидных заболеваний [85, 207].

В настоящее время на фармацевтическом рынке присутствует некоторое количество препаратов на основе коллагеназ для лечения ран различной этиологии: лиофилизированные порошки, гели, мази, повязки [35, 36, 45, 46].

При этом активно ведутся работы по улучшению эффективности, стабильности и удобству применения таких средств с использованием иммобилизованных ферментов и наночастиц [57]. Таким образом, в настоящее время лекарственные средства, содержащие коллагеназы, с успехом используются для санации и лечения ран, ожогов, борьбы с келоидами и рубцами [35, 77, 99, 207, 243, 270, 313].

Как уже отмечалось выше, при некоторых патологических состояниях, а также после травм или хирургического вмешательства, происходит увеличение синтеза коллагена с нарушением структуры коллагеновых фибрилл, приводящее к образованию контрактур. Так, при болезни Дюпюитрена - доброкачественном фибропролиферативном заболевании ладонной фасции отмечается избыточное отложение внеклеточного матрикса, что приводит к фиксированным пальцевым контрактурам сгибания. Хирургическая фасциэктомия - это золотой стандарт лечения, но она инвазивна и сопряжена с осложнениями, и рецидивами заболевания. Инъекции коллагеназы *C. histolyticum* - это новый нехирургический вариант лечения с клинически доказанным снижением контрактуры [273, 274, 306]. Избыточное отложение коллагена является также причиной таких заболеваний, как болезнь Пейрони, ладонный и подошвенный фиброматоз [86, 105, 142, 194, 306, 330]. Утвержденный в настоящее время протокол лечения коллагеназой *C. histolyticum* включает до трех (при фиброматозе ладоней и подошвы) или до восьми (при фиброматозе полового члена) инъекций [194, 306]. Необходимость многократного введения доз этого фермента может быть связана с его быстрым разрушением в тканях. Разработана новая стратегия использования коллагеназы, основанная на синтезе полимерных нанокапсул, содержащих инкапсулированный фермент и обеспечивающих его высвобождение в течение более длительного времени и значительное снижение необходимого количества инъекций [306].

Контрактуры суставов, которые могут развиваться при различных заболеваниях, включая врожденные нарушения, артриты, травмы,

осложнения артропластики, длительный период неподвижности, нарушают здоровый образ жизни человека [315]. Наиболее распространенным лечением является физиотерапия с ручным растяжением и наложением шин, а также хирургическая операция, которая хотя и эффективна, технически сложна, рискованна из-за важных кровеносных сосудов и нервов в непосредственной близости от сустава и может вызвать осложнения [161]. Получены экспериментальные доказательства возможности лечения данной патологии с помощью внутрисуставных инъекций коллагеназы. Так, на модели иммобилизационной сгибательной контрактуры коленного сустава крыс иммунохимическими методами показано изменение соотношения коллагена III и I типа с увеличением диапазона пассивных движений после внутрисуставного введения фермента [315].

Одним из осложнений после проведения маммопластики является развитие капсульной контрактуры со значительным накоплением коллагена. В экспериментах на животных с силиконовыми имплантатами проводили инъекции коллагеназы (группа лечения) или физиологического раствора (контрольная группа) [139]. Через 10 и 60 дней после инъекций выполняли магнитно-резонансную томографию и ультразвуковое исследование высокого разрешения. Обнаружено, что толщина капсулы значительно уменьшилась в группе лечения по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). По мнению авторов, полученные результаты, свидетельствуют о перспективности использования коллагеназ для лечения контрактур после маммопластики [139].

При некоторых патологических состояниях, сопровождающихся гибелью нормальных клеток, происходит их замещение соединительной тканью, содержащей большое количество хаотически расположенных фибрилл коллагена, приводя к развитию фиброза и цирроза печени, фиброза легких, атеросклероза. В здоровой печени гомеостаз внеклеточного матрикса поддерживается матриксными металлопротеиназами (MMPs), и их специфическими ингибиторами - тканевыми ингибиторами

металлопротеиназ (TIMPs). Нарушение соотношения между ферментами и их ингибиторами может приводить к развитию фиброза и цирроза, которые являются одним из факторов риска развития гепатоцеллюлярной карциномы [221]. В модельных экспериментах на кроликах показано, что введение коллагеназы через портальную вену печени приводило к реверсии фиброза и цирроза [271].

В фиброзной печени компоненты внеклеточного матрикса, в том числе, коллаген, сверхэкспрессированы. В модельных экспериментах у мышей показано, что покрытые хондроитинсульфатом многослойные 50-нм наночастицы с инкапсулированной коллагеназой, разрушают плотную коллагеновую строму [215]. Наночастицы поглощались звездчатыми клетками печени в гораздо большей степени, чем нормальными гепатоцитами, и подавляли выработку коллагена I типа. Разработанные подходы облегчают проникновение лекарств в фиброзную печень, снижая вероятность развития сопутствующих заболеваний, таких как цирроз и рак печени [215].

В доклинических исследованиях на животных показана возможность использования коллагеназ для борьбы с хронической тотальной окклюзией сосудов при атеросклерозе [319]. Атеросклероз - коронарная проблема, включающая в себя множество степеней фиброза, атероматозных эмболов и тромбов. Заболевание зависит от степени закупорки сосудов, длительности окклюзии и наблюдается у 30% пациентов [314, 319]. Коллаген является основным структурным компонентом атеросклеротических бляшек [319]. Кроме того, в патогенезе заболевания важна роль принадлежит матриксным металлопротеиназам. Так, эксперименты на генномодифицированных мышах с дефицитом матриксной металлопротеиназы MMP I обнаружили увеличение аортальных бляшек, уменьшению количества гладкомышечных клеток с увеличением содержания коллагена по сравнению с контрольными животными [134]. Современные методы лечения тяжелого атеросклероза травмируют артериальную стенку и часто приводят к рецидивам.

Разработаны новые методы терапии, сочетающие хирургические подходы с ферментативным воздействием для атравматического уменьшения объема атеросклеротических бляшек [311].

Коллаген является основным компонентом хрящевой ткани. Нарушение нормального метаболизма белка, сопровождающееся изменением соотношения матричных металлопротеиназ и их ингибиторов, приводит к разрушению хряща при грыжах межпозвоночного диска [307]. Проведенные исследования показали, что введение ферментов, таких как коллагеназа, может улучшить состояние пациентов [200, 324]. Так, 24 пациентам с постоянной болью в пояснице и седалищной области с диагнозом грыжа межпозвоночных дисков вводили коллагеназу в аномальное дисковое пространство. После консервативного лечения в течение 2 месяцев у 6 пациентов (21%) наблюдалось полное купирование боли, в то время как у 12 (42%) и 6 (21%) - заметное и легкое облегчение боли соответственно [162, 324].

Разрушение хрящевой ткани также является ведущим фактором при развитии таких патологий, как артриты и артрозы суставов. Использование внутрисуставных инъекций коллагеназы приводит к значительному увеличению плотности хондроцитов в зоне поражения и восстановлению хряща [54, 77, 125, 174]. Кроме того, для лечения дефектов суставного хряща используется имплантация аутологичных хондроцитов в качестве клеточной терапии [144, 319]. Успешность имплантации зависит от высокого количества и качества используемых клеток. Для восстановления хряща используют также культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) [132, 144, 319]. При этом для получения аутологичных хондроцитов или ММСК из различных источников чаще всего используют коллагеназы [132, 144, 319].

В настоящее время применяются многочисленные методы для лечения опухолей: хирургия, химиотерапия, использование ионизирующего излучения, гормональная терапия, гипо- и гипертермия. В то же время

актуальна разработка альтернативных подходов, и том числе с использованием «терапевтических ферментов», таких как колагеназы. Сложное микроокружение опухоли представляет собой множество барьеров для доставки лекарственных средств и приводит к чрезвычайно низкому накоплению препаратов в солидных опухолях [141]. Разработаны наночастицы, содержащие противоопухолевый препарат цисплатин, модифицированные колагеназой, для улучшения проникновения и удержания лекарственного средства в глубоких тканях опухоли. На частицы в качестве покрытия нанесен хондроитинсульфат для предотвращения инактивации колагеназы в крови. В кислой среде опухоли гидрофобные участки частиц становятся гидрофильными, что приводит к диссоциации и последующему высвобождению колагеназы. Это способствует лизису коллагеновых волокон в опухолевой ткани, увеличивая проникновение наночастиц, вызывая значительный противоопухолевый эффект [141]. Обнадеживающие результаты были получены с использованием бактериальной колагеназы *C. histolyticum* при разработке методов лечения миом матки, доброкачественной опухоли, содержащей избыточное количество неупорядоченных волокон коллагена [107]. Была проведена иммобилизация фермента на термореактивной полимерной системе доставки LipoGel с последующей однократной внутриматочной инъекцией. Реологические и гистохимические исследования подтвердили увеличение лизиса коллагена в тканях опухоли. Предложенный метод лечения обеспечивает уменьшения размера миомы, предотвращение необходимости ее хирургического удаления и сохранение фертильности [107]. В экспериментальной модели на крысах оценивали безопасность и эффективность внутрибрюшинного введения колагеназы, отдельно или с последующим использованием митомицина, для лечения колоректальных перитонеальных метастазов. Обнаружено, что в обоих случаях наблюдалось макроскопическое уменьшению объема опухоли [143].

Коллагеназа широко используется для выделения множества специализированных типов клеток из сопутствующей соединительной ткани, где коллаген является основным компонентом [295]. Получение изолированных клеток необходимо для изучения их функции в фундаментальных исследованиях, а также является важным элементом терапевтических процедур в трансплантационной и регенеративной медицине [87, 148, 266, 279, 319]. Выделение раковых стволовых клеток используется для изучения патофизиологии рака в клинических исследованиях [59]. В настоящее время наиболее перспективным и интересным является получение с помощью коллагеназы *C. histolitycum* или ее рекомбинантных аналогов островков Лангерганса из поджелудочной железы для дальнейшей ауто- или аллотрансплантации при лечении панкреатита и сахарного диабета [87, 148, 210, 247, 295]. Островки Лангерганса входят в состав эндокринной части железы и связаны с окружающей экзокринной тканью обширным внеклеточным матриксом (ЕСМ) [211, 231]. Внеклеточный матрикс содержит в своем составе фибриллярные белки, включая коллаген типов I, III, V и VI [171]. Все эти белки имеют общую структуру тройной спирали, которая служит мишенью для коллагеназы, используемой для выделения островков [148]. Успешность трансплантации связана с генетическими особенностями поджелудочной железы человека-донора, а также с составом и количеством ферментов диссоциации [148, 171, 231]. Указанная процедура получила широкое признание как единственный надежный и эффективный вариант лечения для сохранения эндокринной функции поджелудочной железы [148].

В доклинических и клинических исследованиях подтверждена перспективность использования коллагеназ для улучшения состояния пациентов с ожирением [102] и целлюлитом [233], лечения глаукомы и других глазных заболеваний [33, 162, 180]. В последнее время пытаются использовать ферменты для оптимизации доставки терапевтических генов в генной терапии опухолей [77].

Приведенные выше литературные данные свидетельствуют о большом интересе к использованию коллагеназы в качестве терапевтических молекул. Инъекции коллагеназы - это современное лечение многих заболеваний [77, 240, 327]. К сожалению, белки обладают низкой стабильностью, что требует проведения несколько циклов инъекций для достижения желательного эффекта. В связи с этим перспективным является использование иммобилизованных форм коллагеназы, разработанных для устойчивого высвобождения инкапсулированного фермента, который поддерживает ферментативную активность в течение длительного периода времени [57, 135, 141, 167, 168, 215, 271, 306]. Состав и технология получения таких лекарственных средств отличаются значительным разнообразием. Так, желатин добавляли к термочувствительным гидрогелям динатриевой соли хитозана- β -глицеролфосфата с образованием желатин-хитозан-глицерофосфата, который в модельных экспериментах на кроликах использовался в качестве носителя коллагеназы для ускорения заживления трансплантата передней крестообразной связки колена [168]. В других экспериментах для лечения солидных опухолей применяли наночастицы сложного состава, содержащие поли-этиленгликоль, поли- β -аминоэфир с концевыми малеимидными группами, поли- ϵ -капролактон, конъюгированный с поли-этиленоксидом и коллагеназой, для увеличения доставки противоопухолевых препаратов [141]. Графен – двумерная аллотропная модификация углерода является перспективным материалом для использования в биомедицине. Например, на основе различных физико-химических и биохимических методов анализа показано, что наночастицы из графена, покрытые хитозаном обеспечивали сохранение активности фермента в процессе инкубации с протеиназами *in vitro* в течение 6 часов. При этом свободная коллагеназа полностью теряла активность за 1 час [135].

Для получения иммобилизованной коллагеназы часто используется хитозан - биоразлагаемый полимер, который, по литературным данным, взаимодействует с коллагеном тканей. Наночастицы с хитозаном были

связаны с коллагеназой и использованы для оценки *in vitro* и *in vivo* способности гидролизовать коллаген. Полученные частицы были способны связывать коллагеназу с эффективностью около 60%, а затем высвобождать фермент в активной форме. Эксперименты *in vivo* продемонстрировали способность полученных лекарственных средств доставлять функциональную коллагеназу в ткани [271].

Синтезирован и охарактеризован новый биосовместимый материал на основе полиэтиленамина, модифицированного олеиновой кислотой для получения наночастиц, обеспечивающих доставку коллагеназы в ткани. Для защиты фермента от дезактивации частицы покрывались хондроитинсульфатом. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрировано, что покрытые хондроитинсульфатом многослойные 50-нм наночастицы, инкапсулирующие коллагеназу, разрушают плотную коллагеновую строму фиброзных тканей [215].

В настоящее время в лекарственных средствах для наружного применения также широко используется иммобилизация коллагеназы на волокнообразующих носителях, обеспечивающая сокращение сроков санации и заживления ран [35, 57]. Для этих целей чаще всего проводят активацию поверхности целлюлозного волокна путем обработки окислителями с получением диальдегидцеллюлозы. На поверхности волокна формируются активные альдегидные группы, взаимодействующие с функциональными группами фермента с образованием ковалентных связей, в результате чего происходит его закрепление [50]. Для усиления эффекта часто в качестве сополимера также используется хитозан [65].

Несмотря на явную перспективность использования коллагеназ в качестве «терапевтических ферментов», для их широкого применения необходимо преодолеть ряд проблем: быстрое разрушение и выведение ферментов *in vivo*, нежелательные нецелевые взаимодействия фермент-мишень и иммунный ответ пациента на введение чужеродного белка [117, 296]. В настоящее время разрабатываются и применяются различные подходы для преодоления

указанных недостатков, такие как инкапсуляция и модификация ферментов, а также мониторинг иммунных реакций пациентов, например, с использованием микрочипов. Все эти подходы представляют интерес для развития персонализированной медицины [195].

1.3.2. Применение коллагеназ в пищевых отраслях.

Важную роль играют коллагеназы в пищевой промышленности (рис. 5).

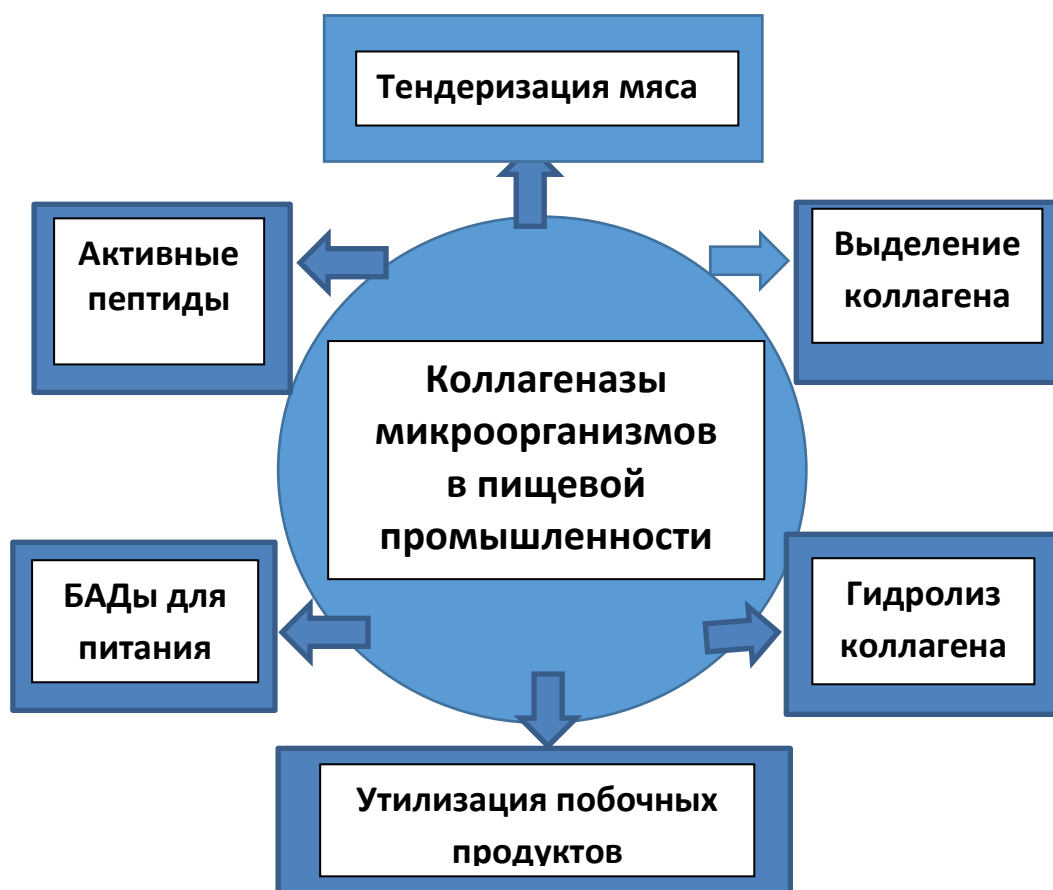


Рис. 5. Применение коллагеназ в пищевой промышленности [91, 240]

Мягкость - одно из важнейших сенсорных качеств мяса, на которое влияет целостность соединительной ткани (фоновая жесткость) и состояние миофибрилл (актомиозиновая жесткость) [104, 163, 164, 181]. Излишняя жесткость мяса является одной из наиболее важных причин снижения его качества [181]. Следует отметить, что в развивающихся странах, таких как Индия, страны Юго-Восточной Азии большинство животных выращиваются для двойного назначения и забиваются только после окончания их производственной способности. Мясо, полученное из таких животных, очень жесткое и обладает пониженной биодоступностью белков.

Для повышения потребительского качества мяса и мясных продуктов необходимо проведение процесса тендеризации, который проводится различными физическими, физико-химическими, химическими и биологическими методами [29]. Биологические методы предполагают использование различных ферментативных систем [164]. Коллаген, который составляет 80% соединительной ткани, обеспечивает жесткость мяса и его гидролиз вызывает процесс размягчения. Ферменты микроорганизмов, которые обладают специфической протеолитической активностью в отношении коллагена по сравнению с другими белками, были предложены в качестве альтернативы неспецифическим растительным протеазам при тендеризации мяса [37, 100, 155]. Коллагеназы из *C. histolyticum* и *Vibrio* В-30 показали многообещающие результаты при их применении для проведения этого процесса [128, 130, 155, 234]. Однако использование ферментов патогенных микроорганизмов требует строго контролировать продукты производства на их возможную патогенность и токсигенность, что ограничивает промышленное применение таких коллагеназ [155]. Идеальным агентом для тендеризации должны быть специфические ферменты из непатогенных и безопасных микроорганизмов с высокой гидролитической активностью при комнатной температуре, легко инактивирующиеся в процессе приготовления мяса / мясных продуктов [104]. Критериями выбора протеаз в таких случаях часто служат оптимумы действия используемых ферментов, которые должны коррелировать с основными технологическими параметрами производства мясных продуктов (рН, температура) [37, 58]. Показано, что адаптированный к холоду коллагенолитический фермент из *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 имеет значительно более высокую эффективность, сохраняя натуральный цвет и влажность мяса, по сравнению с коммерческими препаратами папаина и бромелайна [329]. Коллагенолитический фермент обладает высокой селективностью по отношению к коллагену и белкам миофибрилл, эффективно осуществляя процесс тендеризации [329]. В последние годы получены рекомбинантные

штаммы микроорганизмов на основе *Pichia pastoris* с высоким уровнем экспрессии чужеродного гена протеазы M9 *Aeromonas salmonicida*, секретирующие коллагеназу, которая может быть использована в качестве размягчителя мясного сырья с повышенным содержанием соединительной ткани. [37, 40].

Ферменты, гидролизующие коллаген, часто используются для его получения из различных источников. Традиционно коллаген извлекается из кислого раствора с добавлением или без добавления фермента [239]. Экстракция коллагена может быть увеличена за счет использования низких концентраций микробных коллагеназ, которые облегчают извлечение белка, расщепляя области телопептида [293]. Так, комбинация коллагеназ *B. cereus* и *K. pneumoniae* с кислотной обработкой обеспечивала более высокий выход коллагена из кожи лосося (*Salmo salar*) по сравнению с использованием только кислотной обработки. Авторы считают, что микробные коллагеназы могут использоваться для извлечения коллагена в промышленных целях [293].

Большой интерес вызывает разработка способов приготовления биоактивного гидролизата коллагена и пептидов коллагена [114]. Гидролизат коллагена обычно получают из желатина с использованием протеолитической обработки. Протеазы, такие как трипсин, химотрипсин, пепсин, коллагеназа, бромелайн и папаин - наиболее часто используемые для этих целей ферменты. Средняя молекулярная масса коммерчески доступных гидролизатов колеблется от 0,5 до 20 кДа [114, 188, 189]. Строение, состав, молекулярная масса и функциональные свойства гидролизатов зависят от условий обработки, сырья, а также специфичности фермента, используемого для гидролиза [114, 188, 189]. Препарат гидролизата коллагена был одобрен в качестве безопасного пищевого продукта с биологически активным потенциалом [114]. Гидролизаты и пептиды коллагена, полученные из животных или морепродуктов, представляют большой интерес как ингредиенты в продуктах питания и напитках [188]. Показано, что прием

пептидов коллагена вызывает многочисленные биологические эффекты: уменьшение боли в суставах, морщин на коже, нормализацию обменных процессов и внешнего вида кожи, улучшение метаболизма коллагена в костях [114, 188, 189, 191, 192, 268]. Предполагается, что гидролизат коллагена может быть использован при разработке пищевых продуктов для профилактики и лечения остеоартроза и остеопороза [114]. Коллагеновые пептиды обладают сильным антиоксидантным и антимикробным действием, ингибируют активность ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) [120, 201]. При этом, для получения таких препаратов с помощью микробных коллагеназ часто используются нетрадиционные источники коллагена: кожа акулы (*Carcharodon carcharias*), минтая (*Gadus chalcogrammus*), кальмара (*Onychoteuthis banksi*), медузы (*Chrysaora fuscescens*) и т.д. [16, 120, 153, 230, 310]. Так, из коллагена кожи минтая (*Gadus chalcogrammus*) выделены хелатирующие пептиды, которые обладают значительным потенциалом для применения в качестве функциональных пищевых ингредиентов (БАД-ов) для нормализации минерального обмена [153]. Гидролизаты коллагена из кожи кальмаров (*Onychoteuthis banksi*) содержат антигиалуронидазу, антитирозиназу и обладают антиоксидантной активностью [230].

1.3.3 Применение коллагеназ в других областях.

Коллагеназы играют важную роль и в других областях жизнедеятельности человека. Переход на мало- и безотходные технологические циклы рассматривается в настоящее время как одно из фундаментальных направлений рационального использования сырьевых ресурсов и снижения влияния антропогенного воздействия на окружающую среду [29]. В процессе получения мяса и мясных продуктов образуется значительное количество отходов, содержащих белок и другие БАВ: шкура, мясокостный остаток птицы, спилок крупного рогатого скота и т.д. [29, 42]. Утилизация отходов и использование вторичного сырья мясоперерабатывающей промышленности остается одной из основных задач повышения эффективности работы предприятий, что объясняется рядом причин:

- отходы мясокомбинатов являются благоприятной питательной средой для развития опасных, в том числе и патогенных, микроорганизмов;
- отходы расточительно утилизировать простым методом захоронения на свалках и полигонах для захоронения;
- значительная часть отходов являются ценным вторичным сырьем для получения продукции различного назначения, в частности кормового с высокими потребительскими свойствами [7, 42, 55, 61].

Для утилизации побочных продуктов используются разные методы, в том числе гидролиз микробными коллагеназами. Так, при переработке морских и речных животных (морепродукты) извлекаются только от 20 до 50% продукта в виде съедобных частей, а остальные части (50–80%) выбрасываются как «несъедобные» побочные продукты. В то же время они являются богатыми источниками различных ценных компонентов, таких как белок, масла и липиды, биоактивные пептиды, пигменты, хитин, коллаген, витамины, минералы, ферменты и т. д., полезные для применения в агропромышленном комплексе России. Использование коллагеназ позволяет значительно увеличить выход полезных компонентов [296]. Кроме того, использование побочных продуктов обеспечивает экономичное производство самих ферментов. Так, коллагеназа *Bacillus tequilensis* была получена путем использования отходов мясной промышленности в качестве единственного источника азота и углерода [251].

Производство кожаных изделий связано с загрязнением воды, газовыми выбросами, накоплением твердых отходов, что требует развития новых экологически эффективных процессов производства, в том числе с использованием ферментативных систем, соответствующих современным требованиям [176, 182, 276]. Удаление шерсти - это первый шаг в процессе изготовления кожи, который также создает высокий уровень загрязнения окружающей среды. Ферментативное удаление шерсти может уменьшить степень загрязнения и повреждение коллагена. Однако низкая эффективность

коллагеназ в этом процессе и их высокая стоимость ограничивают их коммерческое применение [286].

Разрабатываются способы использования коллагеназ в качестве биокатализаторов для улучшения окрашивания кож [124, 113]. Синтетические красители, которые используются при этом, являются основным источником загрязнения сточных вод, часто устойчивых к биоремедиации [108]. Использование бактериальных коллагеназ приводит к раскрытию волокнистой сети в кожаном матриксе, улучшая диффузию красителей и увеличивая поглощение красителя до 99%. Одновременно улучшаются свойства кожи, такие как мягкость, гладкость и внешний вид [177].

Микробные коллагеназы широко используются для получения изолированные клетки, пептидов коллагена, белков для инфузии [23, 47]. Различные ферменты, в том числе коллагеназы, необходимы при работе с культурами животных клеток, которые обеспечивают возможность решения целого ряда научных и прикладных проблем биотехнологии, молекулярной биологии, токсикологии [82]. С помощью коллагеназ были успешно выделены клетки из костной ткани, эндотелиальные клетки, нейроны, клетки островков Лангерганса и др. [23, 47, 82, 124, 148, 225]. Это особенно важно при работе с фиброзными тканями с высоким содержанием коллагена, устойчивого к гидролизу другими ферментами, например, трипсином, использование которого либо малоэффективно, либо при высоких концентрациях приводит к повреждению выделяемых клеток [82, 323].

Важная роль принадлежит коллагеназам в круговороте азота в природе [249, 327]. Одним из белковых отходов, отрицательно влияющим на экологию, является коллаген, который в больших количествах производится предприятиями по переработке рыбы, море- и мясопродуктов. Не достаточно полная утилизация таких отходов, помимо непосредственного риска для здоровья людей и животных, вызывает загрязнение биосферы, что делает необходимым включение в процесс ремедиации окружающей среды

специфических ферментов – коллагеназ [91, 261]. Следует отметить, что помимо патогенных культур, различные микроорганизмы, продуцирующие коллагеназы, выделены из речных, морских и почвенных источников. Хотя огромное количество материала, содержащего коллаген, образуется ежегодно в биосфере, не обнаружено существенного накопления белка, так как коллаген разлагается в процессе естественной биоконверсии за счет действия коллагенолитических микроорганизмов [248, 327]. Дegrадация морского органического азота, который присутствует в донных отложениях в виде устойчивых к биологическому и химическому гидролизу белков, является важной частью глобального азотного цикла [327]. Так, выделена и охарактеризована коллагеназа глубоководной бактерии *Myroides profundus*, изучена структурная характеристика фермента и механизмы гидролиза коллагена, обеспечивающие деградацию глубоководного осадочного органического азота [327].

1.4. Способы хранения микроорганизмов.

Микробные сообщества во многом определяют условия существования жизни на Земле, катализируя биогеохимические реакции и управляя глобальными циклами питательных веществ. Однако, в отличие от растений и животных, сохранению микробного разнообразия не уделяется должного внимания, хотя антропогенное воздействие или изменение климата могут существенно влиять на количественный и качественный состав микрофлоры [245]. Основная проблема заключается в том, что только 1% фактического микробного биоразнообразия представлен как культивируемые организмы, а характеристики и функции остальных 99% неизвестны [245]. В связи с этим создание и пополнение коллекций культур и центров микробных биологических ресурсов имеют решающее значение для сохранения микробного биоразнообразия, необходимого для прогресса наук о жизни [214].

Кроме того, использование микроорганизмов в промышленных масштабах в качестве биотехнологических агентов требует их консервации и

содержания в коллекциях, что обеспечивает долгосрочное сохранение их жизнеспособности и продуктивности. В зависимости от вариантов использования микроорганизмов, применяются методы долговременной консервации: под минеральным маслом, лиофилизация, криоконсервация, сушка на различных инертных носителях, при низких температурах (-80°C) или кратковременные способы хранения: периодический пересев, хранение в стерильной воде и др. [11, 12, 24, 30, 241, 250, 285]. Из-за различий в физиологических потребностях микроорганизмов, методы консервации зависят от вида микроорганизма, имеющихся материалов и оборудования [250, 285]. Независимо от разнообразия техники в выборе метода консервации микроорганизмов, необходимо выполнение следующих условий: поддержание жизнеспособности и стабильности морфологических и культуральных особенностей, обеспечение генетической устойчивости, чистоты культуры, экономической эффективности процесса консервации [214, 250, 285].

Методы непродолжительного хранения являются одними из самых простых, не требующих дорогостоящего оборудования и в то же время незаменимых в повседневной работе с микроорганизмами. К таким методам относится субкультивирование, или периодический пересев на свежие агаризованные среды - старейший и давно уже ставший традиционным метод поддержания и сохранения культур, как в лабораторных, так и в промышленных условиях. Показано, что после многолетнего (от 4 до 12 лет) хранения в коллекции методом субкультивирования семи штаммов гриба *Hormoconis resinae* они сохранили свою способность расти за счет углеводов авиационного топлива. Однако существенно увеличилась лаг-фаза – с 1 до 3 мес. При этом не обнаружено корреляции между временем хранения и длительностью задержки роста в топливе. У повторно реизолированных культур признаки роста появлялись в течение первых двух недель, что соответствовало контрольным значениям до хранения [30].

Установлено, что среди огромного разнообразия актиномицетов и грибов большое место занимают штаммы, образующие антибиотические вещества с фунгицидной активностью. Изучена антагонистическая и ростостимулирующая активность 20 штаммов рода *Streptomyces* и 17 микроскопических грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium* к фитопатогенам хлопчатника *Verticillium dahliae*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*. Показано, что с помощью субкультивирования удается сохранять фунгицидную активность культур в течение 8 лет [12].

С помощью сравнительно простого и дешевого метода – хранения под вазелиновым маслом, удастся весьма успешно сохранять месяцами или даже годами многие виды микроорганизмов [8, 11, 285]. Для этого используют стерильное минеральное масло медицинского назначения (например, вазелиновое масло). Масло стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 170⁰С в течение 1–2 ч. Культуры выращивают в пробирках на скошенном питательном агаре. В пробирки с выросшими микроорганизмами стерильно наливают слой минерального масла высотой не менее 2 см от верхней границы агара [8, 11]. Используя указанный метод, удалось сохранить жизнеспособность и ингибирующую активность по отношению к фитопатогенам пяти промышленно-важных штаммов грибов *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* в течение 4 лет [11]. Тем же способом удастся длительно сохранять более 100 штаммов микроорганизмов-деструкторов в коллекции ФГУП «ВИАМ» [8]. При этом подбор питательной среды проводится индивидуально для каждого штамма микроорганизма [31].

Еще одним способом кратковременной консервации микроорганизмов является хранение в воде, физиологическом растворе и других жидкостях [12, 285]. При этом клетки с плотностью в суспензии не более 10⁹ КОЕ/мл вносят в пробирки с жидкостью, которые хранят при температуре 4–8⁰С. Таким способом удалось сохранять жизнеспособность и ингибирующую

активность к фитопатогенам трех штаммов актиномицетов при использовании дистиллированной воды и глицерина [12].

Большинство микробных культур гибнет при высыхании в лабораторных условиях. Однако некоторые культуры, особенно спорообразующие, если были высушены на подходящих для них носителях, сорбирующих влагу, сохраняются годами. При этом используются самые разнообразные носители: почва, песок, силикагель, бумага, смолы, желатин, активный уголь, зерна злаков и многие другие [11, 12, 285]. Указанным методом удавалось сохранять в течение 4 – 8 лет не только жизнеспособность культур, но и способность образовывать зоны угнетения фитопатогенов [11, 12].

Одним из наиболее часто используемых способов длительной консервации микроорганизмов является лиофилизация, обеспечивающая сохранение культуры в течение 30-50 лет. Лиофилизация состоит из процесса сублимационной сушки, основанного на удалении воды из замороженного клеточного материала путем вакуумной сублимации. Жизнеспособность лиофилизированных микробных культур зависит от вида микроорганизма, условий культивирования, концентрации исходного материала, состава защитных веществ, продолжительности процесса [249, 285].

Для повышения эффективности процесса сохранения микроорганизмов необходимо оптимизировать их выращивание, защиту и регенерацию. Основную роль в лиофилизации микроорганизмов играет защитная среда, которая предохраняет их от действия осмотического и теплового удара. Защитными средами могут служить: спирты, углеводы, полисахариды, белковые вещества, желатин, растворы минеральных солей и др. [214, 250, 286]. Выбор защитной среды учитывает таксономическую группу микроорганизмов и их биосинтетический потенциал. Существует несколько предположений о механизме действия защитных веществ. Низкомолекулярные соединения, проникая внутрь клетки, создают высокие осмотическое давление, тем самым предотвращая образование кристаллов льда и разрушение клеточной стенки при замораживании. Белки и другие

высокомолекулярные полимеры не диффундируют в клетку, но образуют внеклеточное осмотическое давление, благодаря которому клеточная стенка плотно прилегает к цитоплазме, защищая клетки при последующей регидратации [285].

Регидратационные процедуры и условия регенерации микроорганизмов после лиофилизации оказывают большое влияние на их жизнеспособность. Регидратация сухих клеток происходит при увеличении температуры, повышении концентрации электролитов, неконтролируемых колебаниях pH. Все эти факторы существенно влияют на жизнеспособность исследуемых микроорганизмов [249, 285].

Сравнительное исследование сохранности коллекционных штаммов микромицетов в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Молдовы показало, что для штаммов, представляющих биотехнологический интерес, наиболее безопасным методом консервации является лиофилизация, позволяющая сохранять жизнеспособность, морфофункциональные и биохимические свойства продуцентов в течение 10 лет [285]. Лيوфилизация с успехом использовалась при длительном хранении грибов-деструкторов [8], 21 штамма фитопатогенных бактерий, относящихся к родам *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Ewingella*, *Xanthomonas*, *Rahnella* [24], 5 промышленно-важным штаммам грибов, обладающих фунгицидной активностью по отношению к вредителям хлопчатника [11].

Еще одним методом, позволяющим длительно сохранять микроорганизмы, является криоконсервация. Термин криоконсервация относится к сохранению биологических материалов при криогенных температурах, как правило, -80°C (сухой лед) или -196°C (жидкий азот). Низкая температура защищает белки и ДНК от денатурации, повреждений и замедляет внутриклеточные процессы. Следовательно, биохимическая и физиологическая активность клеток по существу прекращается, и клетки защищены в течение длительного периода времени. В процессе криоконсервации микроорганизмы могут храниться погруженными в жидкий

азот (при температуре -196°C) или в его паровую фазу (от -135 до -150°C). Хранение в паровой фазе считается лучшим, поскольку оно предотвращает попадание жидкофазного азота в биоматериалы, в то же время, защищая их от денатурации и вирусного заражения [8, 24, 249].

Различные типы и комбинации криопротекторов являются неотъемлемой частью методов криоконсервации и могут сильно влиять на ее результаты. Основная задача криопротекторов - защитить клетки от возможного повреждения, которое может быть вызвано осмотическим стрессом из-за присутствия внешнего льда, и от опасного образования внутренних кристаллов льда. Кроме того, они могут защищать клетки от высыхания, а белки от термического повреждения [8, 187, 249]. Наиболее распространенными криопротекторами являются растворы глицерина, сахарозы, этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и диметилсульфоксида (ДМСО). Другими криопротекторами могут выступать метанол, глюкоза, 1,2-пропандиол, пролин, глицин, фруктоза, галактоза и лактоза [187, 222]. В большинстве случаев при этом методе консервации в качестве криопротекторов используется 10-15% глицерин и/или 5-10% ДМСО.

Хотя методы криоконсервации давно известны и дают хороший результат с точки зрения жизнеспособности и генотипической целостности микроорганизмов, для большинства микробов, необходима оптимизация условий использования метода [187, 249, 291]. Так, скорость охлаждения и оттаивания является важным фактором для сохранения и реанимации клеток во время криоконсервации. Если скорость охлаждения слишком высока, образуются внутриклеточные кристаллы льда. При медленном охлаждении повреждения клеток связаны с внешним гипертоническим действием раствора [8, 188, 250]. Обычно контролируемая скорость охлаждения (от 1 до $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) и быстрое оттаивание (водяная баня при 37°C) являются оптимальными для сохранения жизнеспособности клеток [8, 24, 187, 249].

Используя метод криоконсервации, удалось длительное время сохранять многие коллекции микроорганизмов [8, 24, 214].

Все описанные выше методы консервации биообъектов давно и успешно применяются для сохранения микроорганизмов. Однако в последние годы появились сведения о новых нетрадиционных подходах к решению данной проблемы. Так, апробирован новый метод консервации биологического материала фитопатогенных грибов *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Botritis cinerea* (живой мицелий и споры) на адсорбирующих стекловолоконных мембранах Grade 8964 (Ahlstrom). Проведенные эксперименты, показали сохранение жизнеспособности адсорбированного живого мицелия и спор в течение 3 месяцев при комнатной (22⁰C) и 6 месяцев при низкой положительной (4-6⁰C) температуре [13].

Обнаружено, что иммобилизация клеток в геле из поливинилового спирта может быть успешно применена для одновременной иммобилизации, криоконсервации и длительного хранения клеток различных фототрофных микроорганизмов (зеленые и красные микроводоросли, диатомовые водоросли и цианобактерии). Для 12 различных иммобилизованных клеток микроводорослей было показано, что они могут храниться замороженными не менее 18 месяцев, сохраняя высокий уровень жизнеспособности (90%). Кроме того, иммобилизованные клетки могут быть использованы в качестве инокулята после размораживания. Установлено, что возможно как минимум 5 циклов повторного использования одних и тех же иммобилизованных клеток [280].

Следует отметить, что большинство исследователей, работающих с коллекциями микроорганизмов, считает необходимым для гарантированного сохранения биообъектов использовать, по крайней мере, два альтернативных метода консервации [8, 11, 24, 187, 214, 249].

1.5. Заключение по обзору литературы.

Суммируя все сказанное выше, можно сделать заключение о важности и необходимости получения и изучения коллагенолитических протеаз микроорганизмов. Этот интерес вызван с одной стороны возможностью широкого применения этих ферментов, в медицине, фармации, косметологии и других областях жизнедеятельности человека. С другой стороны, вероятно, существует много неоткрытых до сих пор коллагеназ, которые могут иметь новые необычные структурные особенности и механизмы действия. Изучение этих протеаз может обеспечить дальнейшее понимание микробной деградации коллагена и выявить перспективные ферменты с высоким биотехнологическим потенциалом. Кроме того, понимание структуры и механизмов деградации коллагена коллагеназами из патогенных микроорганизмов будут полезны для разработки методов лечения заболеваний, вызванных соответствующими возбудителями. Все указанные соображения подтверждают актуальность исследований, направленных на поиск перспективных штаммов-продуцентов и разработку биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз на их основе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследований.

Объектами исследования являлись микромицеты из коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЛАР. Коллекция насчитывает 47 штаммов, относящихся к 38 видам и 8 родам: *Aspergillus* – 9 видов, 13 штаммов; *Beauveria* – 1 вид, 1 штамм; *Botrytis* – 1 вид, 1 штамм; *Monilia* – 1 вид, 1 штамм; *Cladosporium* – 3 вида, 4 штамма; *Paecilomyces* – 1 вид, 1 штамм; *Penicillium* – 21 вида, 25 штаммов; *Phialophora* – 1 вид, 1 штамм.

2.2. Поддержание культур микромицетов.

Культуры микромицетов выращивали в течение 7-ми суток на поверхности скошенного агара, содержащего следующие компоненты (%):

а) среда Чапека-Докса NaNO_3 - 0,2; KH_2PO_4 - 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl - 0,05; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; CaCO_3 - 0,3; сахароза – 3; агар-агар – 2;

б) минеральный фон среды Чапека-Докса с заменой сахарозы на 2% коллаген.

2.3. Методы хранения микромицетов.

В экспериментах использовали следующие методы хранения коллекционных культур мицелиальных грибов.

2.3.1. Хранение на среде Чапека-Докса.

Культуры микромицетов, выращенные на поверхности скошенного агара Чапека-Докса, хранили при 4-5⁰С с периодическими пересевами 1 раз в 6 месяцев [12, 30].

2.3.2. Хранение на среде с индуктором (коллагеном).

В ряде случаев культуры микромицетов, выращенные на скошенной поверхности модифицированной среды Чапека-Докса с заменой сахарозы на 2% коллаген, хранили при 4-5⁰ с пересевами 1 раз в месяц.

2.3.3. Хранение под вазелиновым маслом.

Культуры микромицетов, выращивали на скошенной поверхности агаризованной среды Чапека-Докса в течение 7-ми суток в термостате при

26±2⁰С, а затем на свету для улучшения процесса спорообразования. После чего их заливали стерильным вазелиновым маслом на 1 см выше слоя агаризованной среды и хранили при 4-5⁰С в течение 2-3 лет [11, 285].

2.3.4. Криохранение при температуре жидкого азота (-196⁰С).

Для хранения продуцента коллагенолитических протеиназ – *Aspergillus fumigatus* был использован метод криоконсервации при температуре жидкого азота [187, 214, 249]. Получали смывы спор с 7-ми суточных скошенных поверхностей агаризованных сред Чапека-Докса, засеянных *A. fumigatus*, добавляли стерильный глицерин до концентрации 20%. Полученные суспензии по 1 мл разливали в стерильные пробирки для криохранения. Затем проводили поэтапное замораживание материала: в течение 24 ч при -4, -20 и -60⁰С. Полученные пробы помещали в жидкий азот и хранили в криохранилище «Хронос» («Messer», Германия).

До хранения и на различных его этапах пробы быстро размораживали в горячей воде для снижения шокового эффекта, определяли в них количество жизнеспособных клеток и коллагенолитическую активность.

2.3.5. Лиофилизация.

Другим методом консервации *A. fumigatus* являлось использование лиофильного высушивания спор гриба [249, 285]. Предварительно стерилизовали 20% обезжиренное молоко при 116⁰С в течение 20 мин (по 5 мл в каждой предварительно простерилизованной пробирке с ватно-марлевыми пробками). Охлаждали раствор до комнатной температуры и добавляли по 5 мл к скошенной поверхности агаризованной среды Чапека-Докса с 7-ми суточной культурой гриба. Полученную суспензию спор разливали по 1 мл в предварительно простерилизованные пенициллиновые флаконы с ватно-марлевыми пробками. Флаконы замораживали при температуре -25⁰С в течение ночи, помещали на лиофильную сушку («Edwards», Великобритания), периодически их взвешивая до достижения постоянного веса. Затем флаконы парафинировали и хранили при -25⁰С.

До хранения и на различных его этапах пробы вскрывали в стерильных условиях и добавляли к каждому образцу по 1 мл жидкой среды Чапека-Докса. Полученную суспензию использовали для определения количества жизнеспособных клеток и коллагенолитической активности.

2.3.6. Определение жизнеспособности культур после хранения.

Для определения жизнеспособности микромицетов после хранения использовали метод посева на питательные среды (чашечный метод) [19]. Сущность метода заключается в посеве определенного объема суспензии исследуемых микроорганизмов из серии их десятикратных разведений на плотную питательную среду, последующей инкубации и подсчете образовавшихся колоний, учитывая, что каждая колония - результат размножения одной жизнеспособной клетки микроорганизма.

Посев 0,1 мл суспензии спор после хранения проводили поверхностным методом на агаризованные среды Чапека-Докса в трех повторностях (метод параллельных высевов). Далее определяли среднее количество колоний, выросших при посеве каждого разведения. Для получения достоверных результатов отбирают чашки, где число колоний грибов находится в пределах от 10 до 100. Полученные данные выражали в КОЕ/мл.

2.4. Погруженное культивирование микромицетов

При всех вариантах культивирования через определенные промежутки времени отбирали пробы, которые центрифугировали при 4⁰С при 6000 об/мин в течение часа на лабораторной центрифуге К-24 (Германия) или фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм («Владипор», РФ). Микроскопический контроль развития мицелия и отсутствия посторонней микрофлоры проводили на микроскопе МБИ – 3 с использованием объектива 40х. Осадки после центрифугирования или фильтрования высушивали до постоянного веса и взвешивали. На основании определения количества биомассы на различных этапах культивирования рассчитывали удельные скорости роста [64, с. 197-199]

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1), \text{ где}$$

μ – удельная скорость роста;

X_1 и X_2 вес биомассы в момент времени t_1 и t_2 соответственно.

В фильтратах или надосадочной жидкости после центрифугирования определяли концентрацию белка, сахаров, протеолитическую и коллагенолитическую активность.

2.4.1. Культивирование в колбах на шейкере.

Культивирование осуществляли в колбах объемом 600 мл, содержащих 100 мл питательной среды на орбитальном шейкере при скорости вращения 220 об/мин при 26⁰С. При проведении глубинного культивирования использовали разные варианты инокуляции посевного материала.

2.4.1.1. Инокуляция спорами.

Для получения посевного материала использовали 7-ми суточную споровую культуру, выращенную на скошенной поверхности агаризованной среды Чапека-Докса (%): NaNO₃ - 0,2; KH₂PO₄ - 0,1; MgSO₄ x 7H₂O - 0,05; KCl - 0,05; FeSO₄x 7H₂O - 0,001; CaCO₃ - 0,3; сахароза; - 3 агар-агар – 2. Для инокуляции использовали суспензию спор дейтеромицетов (от 10⁶ до 10⁷ спор/мл среды). Среда для культивирования содержала солевой фон среды Чапека-Докса с частичной заменой сахарозы на коллаген (соотношение сахароза : коллаген менялась от 0,1:1,9 до 2,0:0). В ряде экспериментов для изучения влияния источников углерода и азота на секрецию протеиназ использовали глюкозу, фруктозу, микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ, «SilverLine», Индия), шрот пижмы обыкновенной (*Tanacétum vulgáre*) и марены красильной (*Rubia tinctorum*) (экспериментально-технологический отдел ФГБНУ ВИЛАР, РФ) в концентрации 0,5%, а также бычий сывороточный альбумин (БСА, «Sigma», США), казеин (АО «Вектон», РФ), пептон, дрожжевой экстракт (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, РФ) – по 1,5%.

2.4.1.2. Инокуляция вегетативным мицелием.

Микромицеты в течение двух суток культивировали в колбах на шейкере при приведенных выше условиях на стандартной жидкой среде Чапека-

Докса, 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). Дальнейшее культивирование проводили в колбах на шейкере при тех же условиях.

2.4.2. Культивирование в ферментере.

Для масштабирования процесса получения коллагенолитических протеаз использовали ферментер MD-250-2,6 («Marubishi», Япония) объемом 2,7 л с 1 л модифицированной среды (солевой фон среды Чапека-Докса, 0,5% сахарозы и 1,5% коллагена). 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. Среда стерилизовалась в ферментере.

2.5. Твердофазное культивирование *Aspergillus fumigatus*

Исследования проводились с мицелиальным грибом *Aspergillus fumigatus* F 22, отобранным в качестве наиболее активного продуцента внеклеточных коллагенолитических протеаз, в соответствии с рекомендациями, изложенными в ряде работ [111, 237, 290]. Посевной материал получали, как это описано в разделе 2.3.1.1. Концентрация микромицета в смывах со скошенной поверхности агаризованной среды Чапека-Докса составляла $2,4 \times 10^7$ КОЕ/мл. В качестве носителей использовали вермикулит («Morris Green», РФ) с размером частиц до 2 мм и шрот цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare*) (экспериментально-технологический отдел ФГБНУ ВИЛАР) с размером частиц до 1 мм. В колбы Эрленмейера помещали по 2 г. вермикулита или шрота пижмы (высота слоя не более 0,5 см) и стерилизовали при 121⁰С в течение 30 мин. Затем к каждой колбе добавляли модифицированную стерилизованную среду Чапека-Докса (солевой фон среды, 0,5% сахарозы, 1,5% коллагена): по 6 мл к колбам со шротом и по 10 мл к колбам с вермикулитом и по 1 мл смыва спор микромицета. Оптимальное соотношение между количеством носителя и

количеством ростовой среды определяли в предварительных экспериментах, таким образом, чтобы вся добавленная жидкость была связана [237]. Культивирование проводили в стационарных условиях при 28⁰С. Через определенные промежутки времени к колбам добавляли по 14 мл 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 фильтрах активность коллагенолитических протеиназ. Биомассу (М) определяли гравиметрически, перенося фильтры в стеклянные чашки Петри и высушивая их при 80⁰С до постоянной массы (М₀) по следующей формуле:

$$M = M_0 - M_1 - M_2 - M_3, \text{ где}$$

М₁ – вес чашки Петри, М₂ – вес носителя, М₃ – вес фильтра.

Коллагенолитическую активность (КЛAssf) и продуктивность микромицета рассчитывали по формуле [237]:

$$\text{КЛAssf} = E/\text{мл} \times (V_c + V_\varepsilon)/V_c, \text{ где}$$

V_c – объем питательной среды, V_ε – объем добавленного элюента;

$$\text{продуктивность} = (\text{КЛAssf} \times V_c)/M.$$

2.6. Определение протеолитической активности в культуральной жидкости

Определение общей протеолитической активности проводили по методу Ансона с модификациями [111, 238] следующим образом: к супернатанту после центрифугирования культуральной жидкости (1мл) определенного разведения приливали 1 мл 1% казеина по Гаммерстену (АО «Вектон», РФ) в 0,2 М фосфатном буфере (рН 7,2). Смесь инкубировали 10 мин с перемешиванием в термостате при 37⁰С. Затем приливали 2 мл 10% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и оставляли в тех же условиях на 20 мин. Осадок фильтровали через обеззоленный фильтр, измеряя в надосадочной жидкости оптическую плотность при 275 нм. В контрольных пробах ТХУ

добавляли к раствору 1% казеина до внесения анализируемого образца. Расчет протеолитической активности проводили по следующей формуле:

$$\text{ПЕ} = \frac{A \times N \times 4}{TЭ \times 10}, \text{ где:}$$

ПЕ - протеолитическая активность в мкмолях тирозина, высвобождающегося за 1 минуту 1 мл культуральной жидкости,

A – оптическая плотность,

N – разведение,

4 - общий объем пробы,

10 – время гидролиза,

TЭ – коэффициент поглощения тирозина, определенный по калибровочной кривой. Удельную протеолитическую активность рассчитывали, как отношение ПЕ на мг белка.

2.7. Определение коллагенолитической активности.

2.7.1. Оценка коллагенолитической активности микромицетов при поверхностном культивировании.

Определение коллагенолитической активности при поверхностном культивировании проводили в соответствии с ранее описанными методами с некоторыми модификациями [66, 92, 95, 204]. Культуры микромицетов после хранения пересеивали на свежие среды Чапека-Докса и культивировали в течение 7 суток. Затем проводили посев спор грибов тремя уколами на чашки Петри в двух повторностях с агаризованной средой Чапека-Докса, модифицированной заменой сахарозы на 2% коллаген (АО «Реахим», РФ) и культивировали при температуре $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, в темноте. Начиная с 3-4 суток инкубации, ежедневно измеряли в двух перпендикулярных направлениях диаметр колоний и зон лизиса (если они образовывались). Для лучшей визуализации зон лизиса в ряде случаев в конце культивирования поверхность агара в чашках Петри окрашивали раствором, содержащим 40%

этанол, 10% уксусную кислоту и 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250 («Servicebio Technology», Китай).

В другом варианте метода в агаре образовывали пробойниками лунки размером 5x6 мм. Получали смывы спор с агаризованных поверхностей среды Чапека-Докса, уравнивали их концентрацию для всех исследуемых культур и вносили по 0,1 мл в каждую лунку. Затем ежедневно проводили измерение зон лизиса.

Коллагенолитическую активность микроорганизмов оценивали по диаметру колоний и зон лизиса, радиальной скорости роста и индексам лизиса [66], рассчитывая индекс лизиса (Ил) по формуле: $Ил = Дл^2/Дк^2$, где Дл и Дк – средние диаметры зон лизиса и колоний соответственно.

2.7.2. Определение коллагенолитической активности в фильтратах культуральной жидкости и других растворах.

Для определения коллагенолитической активности (КЛА) 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 проведения гидролиза составляла 2 часа при температуре 37⁰С. Контролем служила смесь 1 мл буфера указанного состава и 1 мл 1% суспензии коллагена (контроль субстрата), а также смесь 1 мл супернатанта культуральной жидкости с 1 мл буфера (контроль фермента). После инкубации реакцию останавливали кипячением в течение 20 мин. Осадок отделяли центрифугированием на центрифуге К 24 при 4⁰С при 6000 об/мин. КЛА в надосадочной жидкости определяли по накоплению α-аминогрупп нингидриновым методом и выражали в мкМ свободных аминогрупп аминокислот, образующихся в течение 1 минуты 1 мл культуральной жидкости (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).

2.8. Методы выделения и очистки коллагенолитических ферментов

2.8.1. Гель-фильтрация.

Образцы фильтрата или супернатанта, полученные после отделения биомассы микроциста и обладающие максимальной КЛА, наносили на колонку размером 2,6x40 см («Pharmacia», Швеция) заполненную гелем Toyopearl HW-40 с пределом исключения 15 кДа («Tosoh», Япония) и уравновешенную 0,15 М раствором NaCl. На колонку наносили 3 мл раствора. Элюентом служил 0,15 М раствор NaCl. Детектирование осуществляли при длине волны 274 нм с помощью проточного денситометра «Uvicord 2» («Pharmacia», Швеция), скорость элюции составила 3,3 мл/мин. Элюированный материал собирали и определяли в нем КЛА и концентрацию белка.

2.8.2. Аффинная хроматография.

Материал первого пика, соответствующий свободному объему колонки, и 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), как это описано в инструкциях и литературе [300]. Сефарозу суспендировали в 1 мМ HCl и оставляли на 15 мин для набухания. Из 1 г сефарозы образуется около 3,5 мл геля, который промывали в течение 15 мин на стеклянном фильтре G3 (200 мл 1 мМ HCl на 1 г лиофилизированного порошка). Желатин (10 мг на мл среды) растворяли в 0,1 М NaHCO₃, pH 8,3, содержащем 0,5 М NaCl (5 мл связующего раствора на 1 г лиофилизированного порошка). Раствор белка смешивали с гелем и встряхивали суспензию на шейкере в течение 2 часов при комнатной температуре. После чего смесь отмывали от избытка белка связывающим буфером (не менее 5 объемов использованного буфера) и блокировали остатки активных групп, перенесли гель на 2 часа в раствор, содержащий 1 М этаноламин, pH 8,0.

Отмывание избытка блокирующего реагента и адсорбированного белка проводили попеременно буферными растворами с высокими и низкими значениями pH (4-5 раз): 0,1 М ацетатным буфером (pH 4,0), содержащим 0,5 М NaCl и 0,1 М боратным буфером (pH 9,0), содержащим такое же количество соли. На заключительном этапе гель отмывали стартовым буфером: 0,01М фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,2 мкМ CaCl₂, который впоследствии использовали для набивания колонки объемом 9x150 мм («Pharmacia», Швеция). При длительном хранении аффинного сорбента в элюент вносили 0,02% азида Na. Экспериментально определяли оптимальные условия связывания фермента с лигандом. На колонку с синтезированным аффинным сорбентом наносили материал, полученный после гель-фильтрации, и проводили последовательно элюцию следующими растворами: 0,01М фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,2 мкМ CaCl₂. тот же буфер с 1 М NaCl и 1 М CH₃COOH. Скорость элюции составляла 0,2 мл/мин. В полученных в процессе хроматографии фракциях определяли КЛА и УКА.

2.9. Методы анализа ферментных препаратов

2.9.1. Электрофорез в ПААГ.

После двух этапов очистки оценку гомогенности и молекулярной массы коллагенолитического фермента проводили с помощью диск-электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na (додецилсульфата натрия) [63]. Разделяющий гель содержал: 0,43 М Трис-HCl, pH 8,9; 12% AA, 0,3% МБА. 100 мл геля готовили, смешивая 50 мл 0,86 М раствора Трис-HCl, 24 мл 50% раствора AA и 12 мл 2,5% раствора МБА. Смесь полимеризовали добавлением 0,05 мл ТЕМЕДа и 2 мл 2,5% раствора (NH₄)₂S₂O₈, доводя общий объем до 100 мл.

Состав концентрирующего геля: 0,05 М Трис-HCl, pH 6,8; 2,5 % AA, 0,8% МБА, 20% сахарозы, 2% ДДС-Na. 10 мл геля готовили, смешивая 5 мл раствора, содержащего 0,1 М Трис-HCl и 0,25% ТЕМЕД с 4,8 мл раствора,

содержащего АА, МБА, сахарозу и ДДС-На. Полимеризацию индуцировали внесением 0,2 мл 2,5% раствора $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$.

В состав электродных растворов входили: 0,6 М глицин и 0,033 М Трис, рН 8,3. К верхнему электродному буферу добавляли ДДС-На до получения 0,1% концентрации. Пробы для электрофореза содержали 0,05 М Трис-НСl, рН 6,8, 2% ДДС-На, 12% глицерина, 5% 2-меркаптоэтанола, следы бромфенолового голубого и 0,1-0,3 мг белка на 1 мл раствора. Пробы инкубировали при 100°C в течение 2-3 минут. Преэлектрофорез проводили при силе тока 1 мА на трубку, затем силу тока увеличивали до 2,5 мА на трубку.

После окончания электрофореза гели окрашивали 0,125% раствором Coomassie Brilliant Blue R-250 («Servicebio Technology», Китай) в смеси этанол:вода:уксусная кислота (4,5:4,5:1) в течение 2 часов на кипящей водяной бане, а затем отмывали в том же растворе без красителя. Подвижность белковых зон определяли в процентах, принимая подвижность бромфенолового голубого за 100%. Для определения молекулярного веса препаратов строили калибровочную кривую относительной подвижности от молекулярного веса маркерных белков.

В качестве маркерных белков использовали лизат сердечной мышцы [323]. Крыс породы «Wister» массой 150-200 г забивали декапитацией. Отсекали сосудистый пучок вместе с частью предсердий и выделяли сердечную мышцу. С помощью шприца промывали камеры сердца физиологическим раствором. После осушения фильтровальной бумагой и взвешивания, мышечную ткань измельчали ножницами до частиц размером 3x3x3 см. Полученные частицы помещали в раствор № 1: рН 6,8, содержащий 0,1 М КСl, 5 мМ MgCl₂, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ пиррофосфата натрия.

Соотношение сердечной мышцы и раствора № 1 в пробе составляло 1:10 (в/о). Взвесь частиц мышцы дважды отмывали от крови на магнитной мешалке при 4°C с заменой буферного раствора через каждые 10 мин. После декантации раствора частицы мышечной ткани суспендировали в соотношении 1:10 (в/о) в буферном растворе № 2: рН 6,8, содержащем 0,05 М

KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM ЭДТА, 1 mM пиродифосфата натрия, 0,25 M сахарозы. Отмывали частицы мышцы сердца путем трехкратной смены раствора № 2 через каждые 20 мин при постоянном перемешивании суспензии на магнитной мешалке при 4⁰C. При необходимости кратность замены буферного раствора увеличивали до полного удаления крови.

По окончании процедуры отмывки раствор № 2 удаляли декантацией, а частицы мышцы сердца гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера («Sartorius», Германия) при следующих условиях: гомогенизатор стекло-стекло, 1000 об/мин, 3-5 тракций по 3 сек в 5-15 мл лизирующего буфера (ДСН-буфер) следующего состава: 0,125 M Трис-HCl, pH 6,8; 2% ДСН, 5% β-меркаптоэтанол, 8% глицерин.

Полученный гомогенат доводили до 2% концентрации (с учетом исходного веса мышцы) ДСН-буфером и после фильтрации через четырехслойную марлю прогревали в течение 5 мин при 100⁰C. К фильтрату добавляли бромфеноловый синий до достижения раствором интенсивного синего цвета. Окрашенный раствор лизата мышцы сердца (ЛМС) замораживали порционно по 1 мл и хранили при - 25⁰C. Перед использованием порции ЛМС размораживали при комнатной температуре.

Известно [323], что ЛМС при электрофорезе с ДСН разделяется на ряд полипептидных фракций в диапазоне молекулярных масс от 200 до 12 кДа. В экспериментах по определению молекулярной массы исследуемых образцов были выбраны несколько мажорных фракций с молекулярной массой 13,2; 16; 29; 25; 36; 42,6; 52,5; 68; 83; 100; 150 и 200 кДа.

2.9.2. Определение оптимума pH и температуры ферментных препаратов

Активность коллагенолитической протеазы *A. fumigatus* в различных областях pH оценивали, как это описано выше, используя 0,01M фосфатный буферный раствор pH: 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0. Температурный оптимум действия фермента при гидролизе коллагена определяли таким же образом при температурах: 20⁰; 30⁰; 40⁰; 50⁰; 60⁰C. В обоих случаях полученные результаты выражали в процентах от максимальной активности.

2.9.3. Ингибиторный анализ.

Для проведения ингибиторного анализа использовали ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) - ингибитор металлопротеиназ и ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид) - ингибитор сериновых протеаз, а также ДТТ (дителиотреитол) – восстановитель дисульфидных связей. КЛА определяли, как это описано выше, после предварительной инкубации 1 мкг коллагенолитической протеазы *A. fumigatus* (30 мин при 37⁰С) с ингибиторами, вносимыми до конечной концентрации 10 мМ [220]. Активность выражали в процентах от контроля без ингибитора.

2.10. Определение концентрации белка

На всех этапах исследования концентрацию белка определяли методом Лоури [32]. Для проведения реакции готовили следующие растворы: раствор А: 2% Na₂CO₃, 0,02% Na,К- тартрат в 0,1 М NaOH; раствор В: 0,5% CuSO₄·5 H₂O; раствор С получали смешивая 50 мл раствора А с 1 мл раствора В; раствор D – 1 Н реагент Фолина-Чокальтеу (Диа-М, РФ).

К 0,5 мл исследуемого раствора приливали 2,5 мл раствора С, перемешивали и оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 0,25 мл реактива Фолина и инкубировали в течение 30 мин при 37⁰С, измеряя оптическую плотность анализируемых проб при 750 нм на спектрофотометре «Shimadzu MPS – 2000» (Япония). Контролем служил образец, содержащий вместо исследуемого раствора 0,5 мл воды. Для построения калибровочной кривой использовали растворы сывороточного альбумина человека (ЧСА, «Sigma», США) с содержанием белка от 10 до 100 мкг/мл.

2.11. Определение аминокрупп аминокислот

Концентрацию свободных аминокрупп аминокислот, образовавшихся после гидролиза коллагена, определяли с использованием нингидринового реактива [52, 193]. Для получения реактива предварительно готовили 140 мл

0,5 М цитратного буфера, растворяя 3,75 г лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$) и 18,62 г цитрата натрия ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5,5 H_2O$) и доводя pH до 5,4 1 М NaOH. Затем к полученному буферу прибавляли 1 г нингидрина («Sigma-Aldrich», США) и 240 мл глицерина («Акрихим», РФ).

К 0,2 мл анализируемого образца приливали 3,8 мл полученного нингидринового реактива, нагревая смесь при $100^{\circ}C$ в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры измеряли оптическую плотность растворов при 570 и 440 нм на спектрофотометре «Shimadzu MPS – 2000» (Япония). Контролем служил образец, содержащий вместо исследуемого раствора 0,2 мл H_2O . Для построения калибровочной кривой использовали растворы лейцина и пролина (АО «Вектон», РФ) в концентрации от 0,1 до 2 мМ.

2.12. Определение сахаров антроновым методом

Определение содержания сахаров в фильтратах или супернатантах после центрифугирования культуральной жидкости проводили с использованием антронового реактива [32]. Метод основан на гидролизе сложных углеводов до моносахаров в сильнокислой среде с последующей их дегидратацией и образованием гидроксиметилфурфурола, образующего при реакции с антроном комплексное соединение синевато-зеленого цвета. Для приготовления антронового реактива 0,2 г антрона («Интерхим», РФ) растворяли в концентрированной серной кислоте и доводили объем до 100 мл.

К пробирке с 1,0 мл исследуемого раствора, охлажденной на бане со льдом, медленно приливали 2 мл антронового реактива, перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры измеряли оптическую плотность растворов при 625 нм на спектрофотометре «Shimadzu MPS – 2000» (Япония). Контролем служил образец, содержащий вместо исследуемого раствора 1,0 мл H_2O . Для

построения калибровочной кривой использовали растворы глюкозы (АО «Вектон», РФ) в концентрации от 0,01 до 0,05 мг/мл.

2.13. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с помощью пакета программ Microsoft Office Excel 2010. Каждое испытание выполняли 10-12 раз при проведении поверхностного культивирования и 3-5 раз в других экспериментах. Результаты представляли в виде $X \pm \sigma$, где X – среднее значение; σ – стандартное отклонение выборочного среднего. Достоверность различия между выборками определяли по критерию Стьюдента. Различия между выборками считали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. ОТБОР МИКРОМИЦЕТОВ-ПРОДУЦЕНТОВ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ

3.1. Оценка коллагенолитической активности микромицетов при поверхностном культивировании на средах с коллагеном.

Скрининг и выявление микроорганизмов с высоким выходом коллагенолитических ферментов, разработка и оптимизация компонентов среды и условий ферментации для их получения в настоящее время является одним из актуальных направлений биотехнологии [91, 92, 240, 327]. Для качественного и количественного анализа активности продуцентов коллагеназы разработаны различные методы. Качественный анализ активности коллагеназы проводят с помощью теста на гидролиз желатина или коллагена, которые присутствуют в различных питательных средах [92, 116, 240]. Продуценты коллагеназы могут быть идентифицированы в зависимости от скорости роста на этих средах и зон лизиса белка. Количественную коллагенолитическую активность микроорганизмов определяют с помощью того же метода, учитывается отношение зоны гидролиза к диаметру колонии [92]. В наших экспериментах для скрининга коллекционных штаммов микромицетов использовалось поверхностное культивирование на агаризованных средах Чапека-Докса с заменой сахарозы на коллаген (рис. 6)

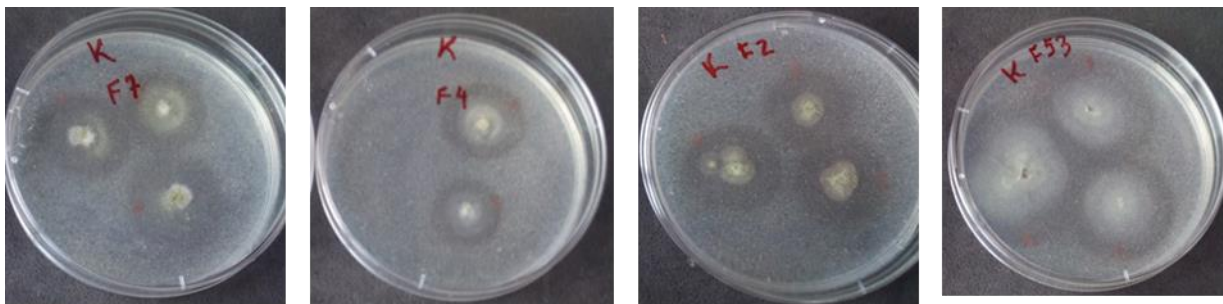


Рис. 6. Колонии и зоны лизиса коллагена при культивировании микромицетов на модифицированной среде, 6 сутки культивирования. Слева – направо: *A. repens* F 7, *A. ruber* F 4, *P. decumbens* F 2, *P. chrysogenum* F 53

Большинство изученных микромицетов росли на модифицированных средах и образовывали зоны лизиса. При этом в процессе культивирования происходило увеличение, как самих колоний, так и зон лизиса (рис.7).

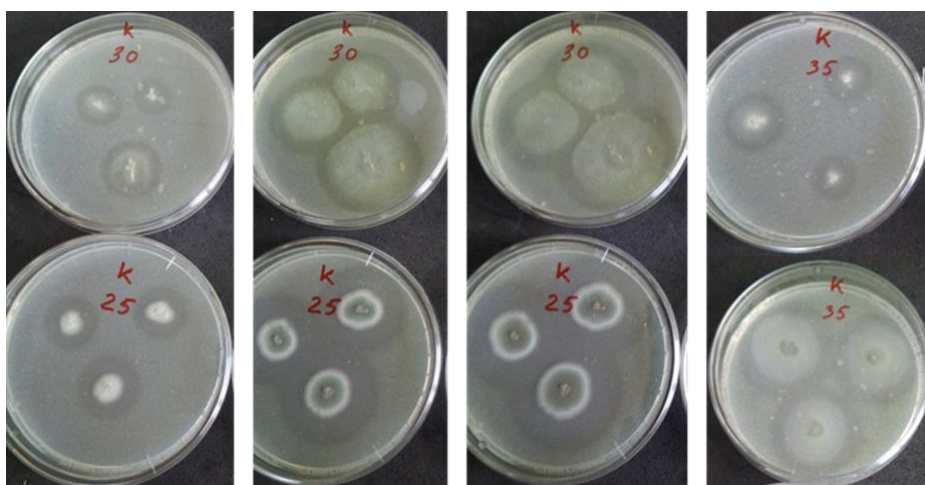


Рис 7. Колонии и зоны лизиса коллагена микромицетами при культивировании на среде с коллагеном (слева – направо): *A. mangini* F 30, *A. sydowii* F 25 (4, 6, 7 сут.), *Cl. cladosporoides* F 35 (вверху – 4, внизу - 7 сут.)

Однако не все культуры обладали одинаковым потенциалом для адаптации к росту на средах с заменой легко утилизируемого углевода на фибриллярный, высокомолекулярный белок (коллаген). Так, на рисунке 8 видно, что микромицет *Penicillium vitale* F 60 образовывал очень небольшие колонии на среде с коллагеном. Кроме того, зафиксировано отсутствие зон лизиса.

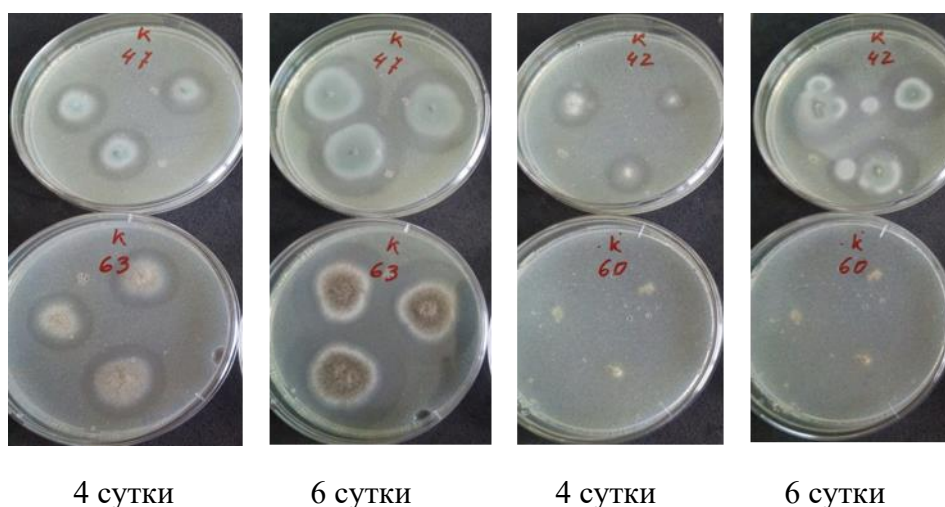


Рис. 8. Колонии и зоны лизиса коллагена *P. martensii* F 47,63, *P. roqueforti* F 42 и *P. vitale* F 60 на разных этапах культивирования

Для количественной оценки коллагенолитической активности культур рассчитывали скорости радиального роста и индексы лизиса микромицетов при культивировании на средах с полной заменой сахарозы на коллаген (рис. 9 и 10). Скорости роста позволяют оценить способность культур адаптироваться к переходу со стандартной питательной среды, богатой углеводами, на менее доступный для использования субстрат [240]. Можно видеть, что указанный показатель значительно различается у отдельных видов. Например, *P. purpurescens* F 18 начинал образовывать колонии только на 5 сутки культивирования.

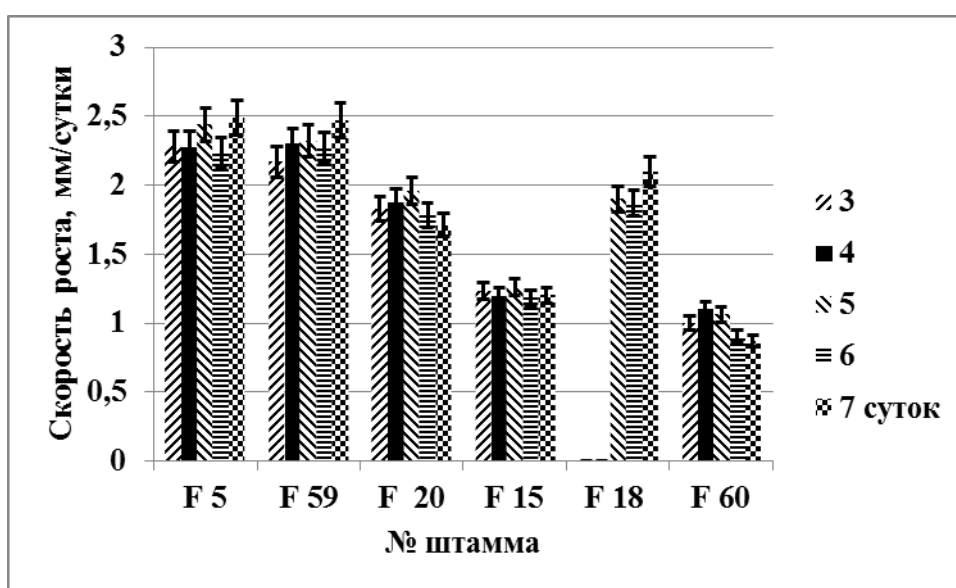


Рис. 9. Скорости радиального роста микромицетов при поверхностном культивировании на среде Чапека-Докса с заменой сахарозы на коллаген

Еще одним важным показателем для оценки гидролитического потенциала микроорганизмов является соотношение размера колоний и зон лизиса. Этот показатель рассчитывается по-разному [92]. Мы рассчитывали индекс лизиса как отношение площади зоны лизиса к площади колонии, так как площадь колонии пропорциональна биомассе, а площадь зоны лизиса – количеству секретированных протеиназ [66]. На рисунке 10 видно, что некоторые штаммы грибов обладают небольшими индексами лизиса, так как не образуют или образуют очень небольшие зоны лизиса.

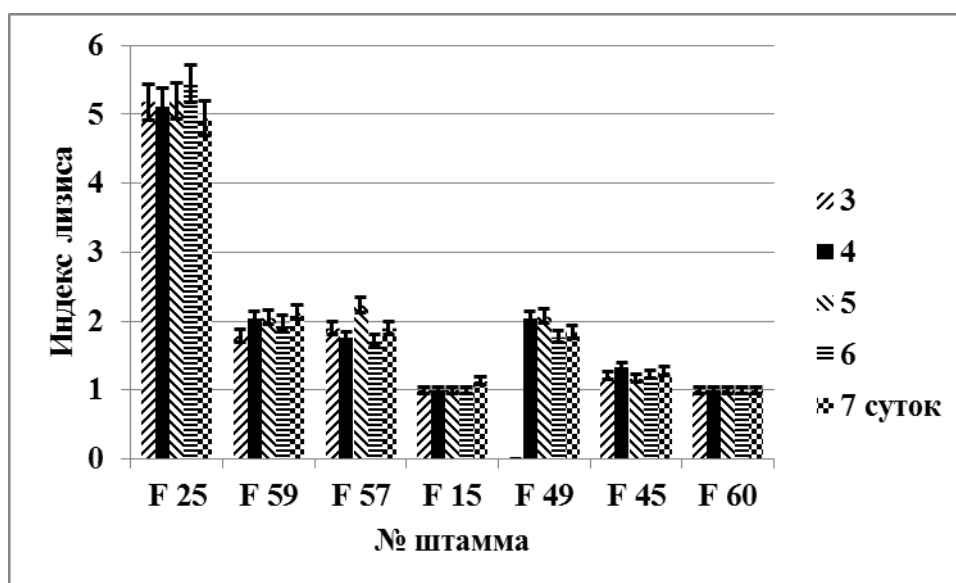


Рис. 10. Индексы лизиса коллагена микромицетами при поверхностном культивировании на среде Чапека-Докса с заменой сахарозы на коллаген

По результатам проведенных исследований часть культур была выведена из исследований, так как у них фиксировались низкие скорости роста и индексы лизиса: *Monilia implicata* F 15, *P. brevicompactum* F 37, 49; *P. purpurescens* F 18, *P. vitale* F 60. Для остальных культур были рассчитаны средние скорости роста и индексы лизиса коллагена (рис. 11 и 13).

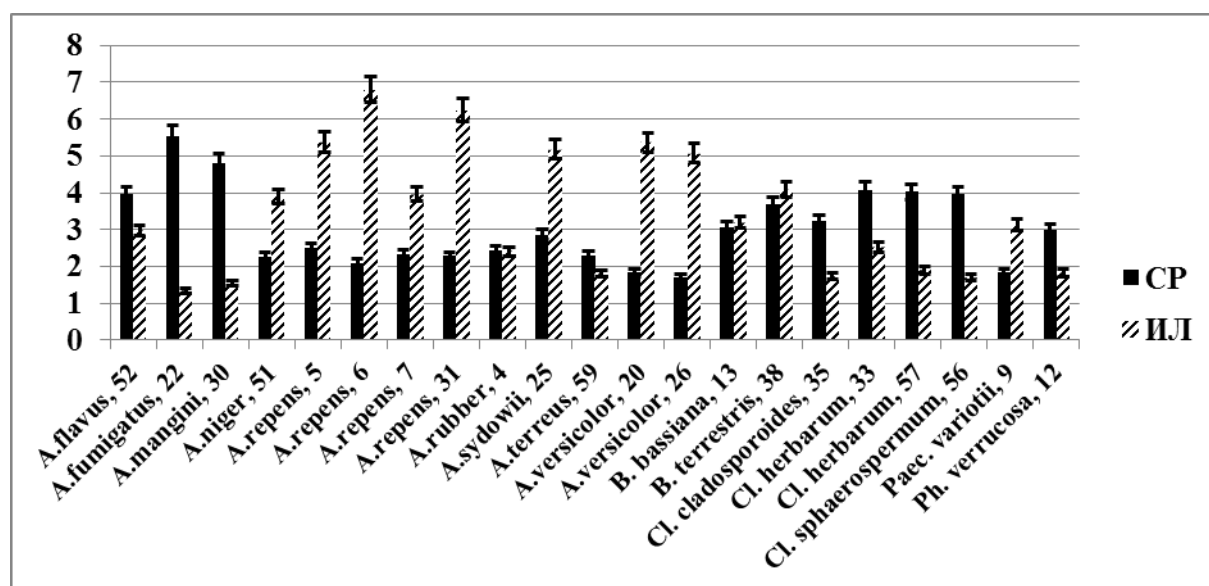


Рис. 11. Средние за время культивирования скорости роста (СР, мм/сутки) и индексы лизиса коллагена (ИЛ) микромицетов разных родов

На основании полученных результатов был проведен анализ соотношения индексов лизиса и скоростей роста микромицетов, относящихся к родам:

Aspergillus, *Beauveria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Phialophora*, который выявил отрицательную корреляционную связь между указанными показателями (рис. 12). В связи с тем, что оба показателя характеризуют потенциальную коллагенолитическую активность микромицетов, при их отборе для дальнейшего глубинного культивирования использовались культуры с высокими индексами лизиса и/или скоростями роста (табл. 5). Один микромицет - *B. terrestris* F 38 был выбран в связи с тем, что обладал одновременно относительно высокой скоростью роста и индексом лизиса.

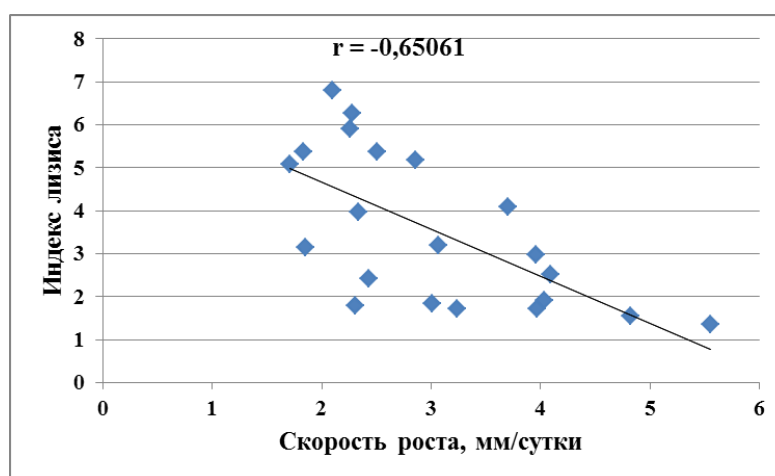


Рис. 12. Линейная регрессия, показывающая соотношение между скоростью роста и индексом лизиса коллагена у микромицетов (r – коэффициент корреляции)

Таблица 5. Скорости роста и индексы лизисов микромицетов разных родов, отобранных для глубинного культивирования

| Микромицет | Скорость роста, мм/сут | Индекс лизиса |
|---------------------------|------------------------|------------------|
| <i>A.flavus</i> F 52 | 3,96±0,25 | 2,97±0,20 |
| <i>A.fumigatus</i> F 22 | 5,55±0,43 | 1,35±0,11 |
| <i>A.mangini</i> F 30 | 4,82±0,37 | 1,55±0,11 |
| <i>A.repens</i> F 5 | 2,51±0,19 | 5,38±0,46 |
| <i>A.repens</i> F 6 | 2,10±0,17 | 6,80±0,57 |
| <i>A.repens</i> F 31 | 2,38±0,17 | 6,26±0,55 |
| <i>A.sydowii</i> F 25 | 2,86±0,19 | 5,18±0,44 |
| <i>A.versicolor</i> F 20 | 1,83±0,16 | 5,37±0,45 |
| <i>A.versicolor</i> F 26 | 1,71±0,15 | 5,08±0,40 |
| <i>B. terrestris</i> F 38 | 3,70±0,26 | 4,10±0,35 |
| <i>Cl. herbarum</i> F 33 | 4,09±0,37 | 2,52±0,19 |
| <i>Cl. herbarum</i> F 57 | 4,03±9,33 | 1,90±0,11 |

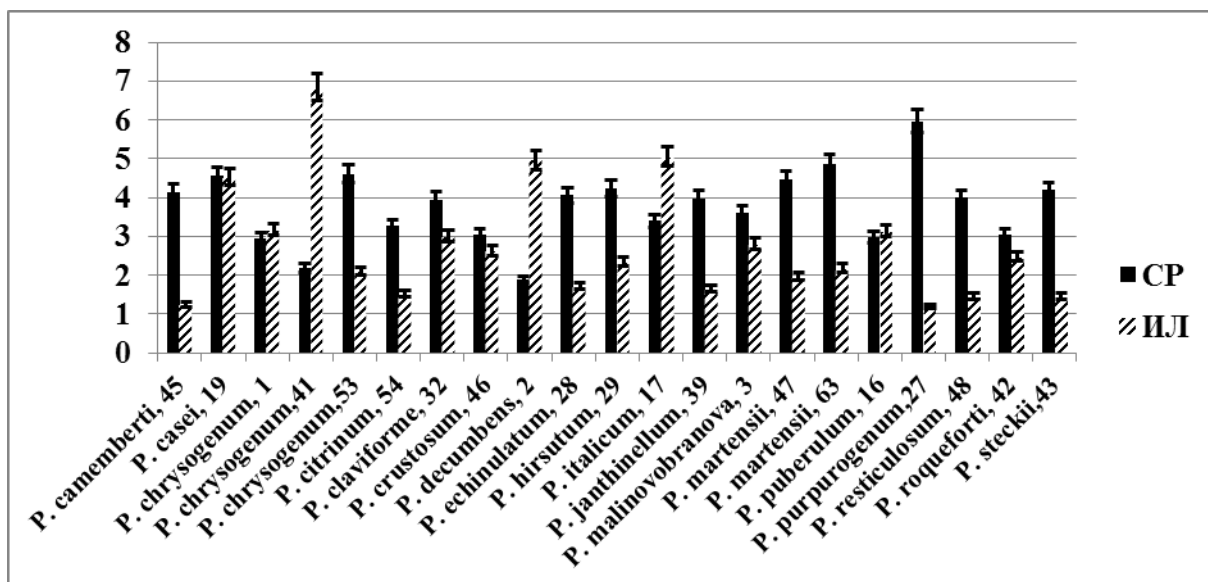


Рис. 13. Средние за время культивирования скорости роста (СР, мм/сутки) и индексы лизиса коллагена (ИЛ) микромицетов рода *Penicillium*

На основании полученных результатов был также проведен анализ соотношения индексов лизиса и скоростей роста микромицетов рода *Penicillium*, который выявил отрицательную корреляционную связь между указанными показателями (рис. 14). В связи с результатами проведенного анализа для дальнейшего глубинного культивирования выбраны культуры с максимальными индексами лизиса и/или скоростями роста (табл. 6). При этом у двух культур *P. casei* и *P. decumbens* фиксировались высокими одновременно оба показателя.

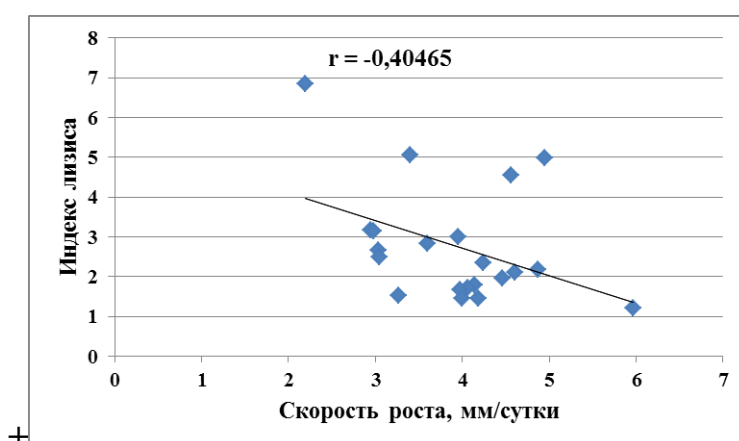


Рис. 14. Линейная регрессия, показывающая соотношение между скоростью роста и индексом лизиса коллагена у микромицетов рода *Penicillium* (r – коэффициент корреляции)

Таблица 6. Скорости роста и индексы лизисов микромицетов рода *Penicillium*, отобранных для глубинного культивирования

| Микромицет | Скорость роста, мм/сут | Индекс лизиса |
|-----------------------------|------------------------|------------------|
| <i>P. casei</i> F 19 | 4,56±0,38 | 4,54±0,39 |
| <i>P. chrysogenum</i> F 41 | 2,19±0,19 | 6,85±0,51 |
| <i>P. chrysogenum</i> F 53 | 4,61±0,34 | 2,11±0,19 |
| <i>P. decumbens</i> F 2 | 1,89±0,17 | 4,98±0,38 |
| <i>P. hirsutum</i> F 29 | 4,24±0,30 | 2,34±0,20 |
| <i>P. italicum</i> F 17 | 3,40±0,25 | 5,06±0,43 |
| <i>P. martensii</i> F 63 | 4,87±0,33 | 2,18±0,18 |
| <i>P. purpurogenum</i> F 27 | 5,97±0,41 | 1,20±0,09 |

3.2. Выбор перспективных культур для дальнейшего изучения при погруженном культивировании

Отобранные по результатам поверхностного культивирования на средах с коллагеном мицелиальные грибы были использованы для проведения пилотного глубинного культивирования при условиях, ранее описанных в литературе [56]: посевной материал – суспензия спор 7-ми суточных культур (10^8 спор на 100 мл среды). Культивирование осуществляли в течение 7 суток в питательной среде, содержащей солевой фон среды Чапека-Докса с 0,5% сахарозы и 1,5% коллагена. Показано, что все отобранные культуры секретировали внеклеточные коллагенолитические протеазы. Однако определение активности ферментов выявило 5 штаммов, коллагенолитическая активность которых значительно превышала аналогичные показатели других культур (табл. 7): *A. fumigatus*, *A. sidowii*, *Botritis terrestris*, *Cl. herbarum* F 33 и 57.

Следует отметить, что УКА еще двух штаммов *P. chrysogenum* F 41 и F 53 была сравнима с аналогичным показателем одной из отобранных культур – *Cl. herbarum* F 33, однако концентрация белка в культуральной жидкости была крайне низкой (0,75-0,76 мг/мл), что исключает использование этих микромицетов в качестве продуцентов.

Таблица 7. Активность внеклеточных коллагенолитических протеаз при глубинном культивировании отобранных микромицетов

| Микромицет | КЛИА, Е/мл | УКА, Е/мг |
|----------------------------------|-------------------|-----------------|
| <i>A. flavus</i> F 52 | 0,74±0,08 | 0,15±0,02 |
| <i>A. fumigatus</i> F 22 | 136,1±12,1 | 20,6±1,7 |
| <i>A. mangini</i> F 30 | 0,57±0,06 | 0,11±0,01 |
| <i>A. repens</i> F 5 | 0,79±0,07 | 0,13±0,01 |
| <i>A. repens</i> F 6 | 0,62±0,07 | 0,13±0,01 |
| <i>A. repens</i> F 31 | 0,23±0,02 | 0,03±0,01 |
| <i>A. sydowii</i> F 25 | 85,8±6,7 | 11,4±1,7 |
| <i>A. versicolor</i> F 20 | 1,08±0,09 | 0,12±0,01 |
| <i>A. versicolor</i> F 26 | 0,91±0,08 | 0,11±0,01 |
| <i>B. terrestris</i> F 38 | 89,4±8,3 | 12,7±1,3 |
| <i>Cl. herbarum</i> F 33 | 24,2±3,3 | 1,3±1,7 |
| <i>Cl. herbarum</i> F 57 | 50,8±5,0 | 3,0±0,2 |
| <i>P. casei</i> F 19 | 0,59±0,07 | 0,09±0,01 |
| <i>P. chrysogenum</i> F 41 | 0,99±0,09 | 1,31±0,12 |
| <i>P. chrysogenum</i> F 53 | 1,03±0,09 | 1,37±0,12 |
| <i>P. decumbens</i> F 2 | 0,33±0,03 | 0,08±0,01 |
| <i>P. hirsutum</i> F 29 | 0,61±0,06 | 0,09±0,01 |
| <i>P. italicum</i> F 17 | 0,39±0,04 | 0,03±0,01 |
| <i>P. martensii</i> F 63 | 0,47±0,04 | 0,11±0,01 |
| <i>P. purpurogenum</i> F 27 | 0,15±0,01 | 0,01±0,014 |

3.3. Изучение секреции протеолитических и коллагенолитических ферментов при глубинном культивировании

На основе полученных результатов 5 штаммов мицелиальных грибов были отобраны для дальнейшего более детального изучения: *A. fumigatus* F 22 (*Fresen.*, 1836), *A. sidowii* F 25 (*Thom and Church*, 1926), *B. terrestris* F 38 (*P. Micheli ex Pers.*, 1794), *Cl. herbarum* F 33, 57 (*(Pers.) Link*, 1816). При этом

оценивали следующие показатели: параметры роста культуры при глубинном культивировании, утилизация сахаров и синтез белков в культуральную жидкость, активность внеклеточных протеолитических и коллагенолитических ферментов.

Скорость роста микроорганизмов определяется физиологическими особенностями штамма, условиями культивирования, природой утилизируемого углеводного субстрата и его концентрацией в среде. Наиболее важной характеристикой роста микроорганизмов является их удельная скорость роста [64]. Поскольку в проведенном эксперименте условия культивирования и состав питательной среды были одинаковы, отличия в росте микроорганизмов определяются их физиологическими особенностями. Из таблицы 8 можно видеть, что наибольшая удельная скорость роста зафиксирована у микромицета *A. fumigatus* F 22. У этого же мицелиального гриба в конце экспоненциальной фазы роста обнаружено наибольшее количество биомассы.

Таблица 8. Параметры роста микромицетов при культивировании на модифицированной среде

| № штамма | Кол-во биомассы г/л | Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | Время начала стационарной фазы, ч |
|----------|---------------------|--|-----------------------------------|
| F 22 | 30,0±0,2 | 0,025±0,002 | 144 |
| F 25 | 11,0±0,1 | 0,013±0,001 | 198 |
| F 38 | 10,0±0,2 | 0,014±0,001 | 168 |
| F 33 | 6,0±0,1 | 0,012±0,001 | 168 |
| F 57 | 9,2±0,2 | 0,013±0,001 | 168 |

На следующем этапе исследования изучалось изменение концентрации сахарозы и белка в фильтратах культуральной жидкости микромицетов (табл. 9, 10). При этом предполагалось, что активная секреция протеолитических и коллагенолитических ферментов может начаться только после утилизации легко метаболизируемого углевода – сахарозы. Действительно, для всех

исследованных культур показано, что к 3 – 4 суткам углеводов в фильтрах не определялся (табл. 9), и с этого момента наблюдалась активное накопление внеклеточного белка (табл. 10).

Таблица 9. Изменение концентрации сахаров (мг/мл) в процессе культивирования микромицетов

| № штамма | Время культивирования, сутки | | | | |
|----------|------------------------------|---------|---------|---------|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| F 22 | 4,9±0,2 | 1,5±0,2 | 0,7±0,1 | 0 | 0 |
| F 25 | 5,0±0,1 | 1,1±0,1 | 0,3±0,1 | 0 | 0 |
| F 38 | 5,1±0,2 | 1,8±0,2 | 1,0±0,1 | 0,5±0,1 | 0 |
| F 33 | 4,9±0,2 | 1,7±0,2 | 1,2±0,2 | 0,6±0,1 | 0 |
| F 57 | 5,0±0,1 | 1,6±0,1 | 0,7±0,1 | 0 | 0 |

Таблица 10. Изменение концентрации белка (мг/мл) в процессе культивирования микромицетов

| Время, сутки | № штамма | | | | |
|--------------|----------|---------|---------|----------|----------|
| | F 22 | F 25 | F 38 | F 33 | F 57 |
| 0-2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 8,2±0,3 | 9,6±0,2 | 4,6±0,1 | 12,8±0,3 | 12,6±0,3 |
| 4 | 5,6±0,1 | 7,6±0,1 | 4,6±0,1 | 11,2±0,2 | 10,8±0,1 |
| 5 | 9,0±0,2 | 6,2±0,1 | 5,2±0,1 | 13,6±0,3 | 13,6±0,3 |
| 6 | 9,6±0,2 | 7,2±0,1 | 6,2±0,2 | 9,2±0,1 | 9,0±0,1 |
| 7 | 10,8±0,2 | 8,2±0,2 | 8,6±0,2 | 14,4±0,2 | 14,2±0,2 |
| 8 | 7,6±0,2 | 6,2±0,1 | 5,2±0,1 | 16,0±0,3 | 15,6±0,2 |
| 9 | 6,6±0,1 | 7,6±0,1 | 4,6±0,1 | 17,4±0,1 | 16,8±0,1 |

На всех этапах культивирования минимальная концентрация белка в фильтрах культуральной жидкости отмечалась у *B. terrestris* F 38, а максимальная - у двух штаммов *Cl. herbarum* F 33, 57. У двух исследованных аспергилл фиксировались промежуточные значения концентрации белка

между показателями у представителей *Cladosporium* и *Botritis*. У *A. fumigatus* F 22 и *B. terrestris* F 38 максимальные значения содержания белка в фильтрах были обнаружены на 7 сутки, тогда как у представителей кладоспориум подобные значения были зафиксированы только в конце культивирования (9 сутки), а у *A. sydowii* F 25 – в начале (3 сутки).

Таким образом, для всех исследованных культур обнаружены общие закономерности, а именно: начало секреции внеклеточных белков после утилизации сахаров из питательной жидкости. Однако характер такой секреции существенно отличался у разных штаммов микромицетов. Можно предполагать, что секретируемые белки содержат протеолитические и коллагенолитические ферменты, необходимые для использования коллагена в качестве питательного субстрата. Для проверки этого предположения проводилась изучение протеолитической и коллагенолитической активности пяти отобранных культур мицелиальных грибов.

Проведенные исследования показали, что для трех из пяти культур на всех этапах культивирования фиксировалась протеолитическая активность (рис. 15). Исключение составляли два штамма рода *Cladosporium*, у которых на 3 сутки протеолитическая активность не обнаружена. Максимальная активность наблюдалась у *A. fumigatus* F 22, которая статистически значимо ($p \leq 0,05$) превышала аналогичные показатели у других культур. Минимальная активность зафиксирована для одного из штаммов *Cl. herbarum* F 33 с четвертых по девятые сутки.

Аналогичные закономерности были обнаружены и при анализе удельной протеолитической активности грибов (рис. 16). С третьих по пятые и на седьмые сутки культивирования удельная протеолитическая активность *A. fumigatus* F 22 была статистически значимо ($p \leq 0,05$) выше, чем аналогичные показатели у других культур. На шестые, восьмые и девятые сутки удельная протеолитическая активность аспергилл и *B. terrestris* отличалась незначительно. На всех этапах культивирования минимальные показатели зафиксированы у двух штаммов рода *Cladosporium*.



Рис. 15. Изменение общей протеолитической активности (ПЕ/мл) в фильтратах при культивировании микромицетов



Рис. 16. Изменение удельной протеолитической активности (ПЕ/мг) в фильтратах при культивировании микромицетов

Из таблицы 11 можно видеть, что максимальная общая и удельная протеолитическая активность были отмечены у культуры *A. fumigatus* F 22, которые фиксировались на ранних сроках культивирования: 3 и 4 сутки соответственно. Аналогичные показатели других мицелиальных грибов были значительно ниже и наблюдались на более поздних этапах.

Таблица 11. Максимальная протеолитическая активность (ПЕ) микромицетов в процессе глубинного культивирования

| № штамма | ПЕ/мл | Время, сутки | ПЕ/мг | Время, сутки |
|----------|-------|--------------|----------|--------------|
| F 22 | 101±9 | 3 | 15,2±1,1 | 4 |
| F 25 | 38±4 | 8 | 6,1±0,7 | 8 |
| F 38 | 30±3 | 6 | 7,0±0,5 | 9 |
| F 33 | 18±2 | 6 | 0,9±0,1 | 8 |
| F 57 | 28±3 | 7 | 2,8±0,2 | 6 |

Поскольку для индукции синтеза протеолитических ферментов в проведенных экспериментах использовался коллаген, можно было предполагать, что секретируемые в культуральную жидкость протеазы могут обладать и коллагенолитическим эффектом. Для проверки этого предположения было проведено определение коллагенолитической активности в фильтратах культуральной жидкости. Предварительно проводилась отработка условий проведения ферментативной реакции, таких как время гидролиза (рис. 17) и температура инкубации (табл. 12).

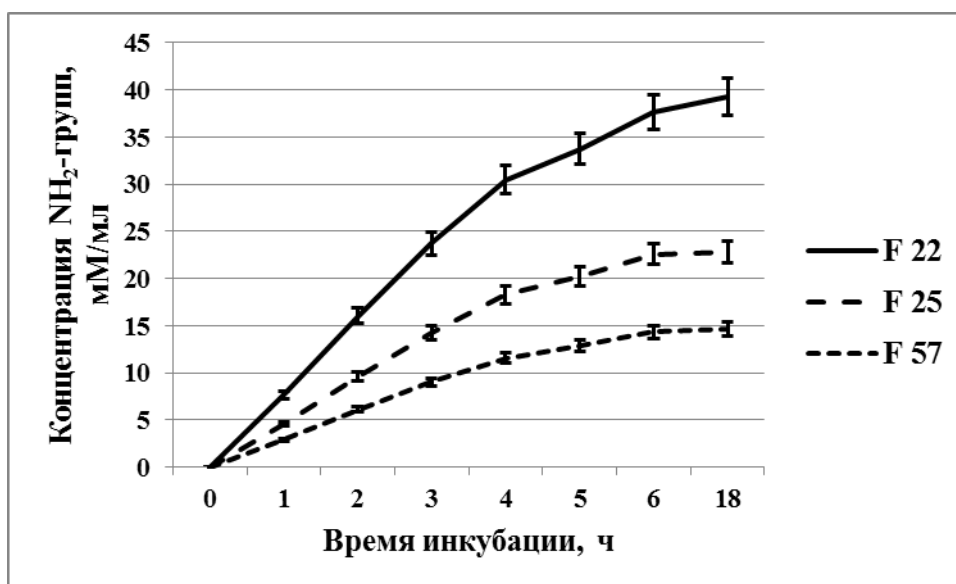


Рис. 17. Влияние времени инкубации на образование аминогрупп аминокислот в процессе ферментативного гидролиза коллагена при 37⁰С

Можно видеть, что в течение 4-5 часов проведения реакции наблюдается линейная зависимость между временем инкубации и количеством

образовавшихся свободных аминогрупп аминокислот, что позволяет использовать результаты, полученные в этот временной интервал для расчета ферментативной активности в фильтратах культуральной жидкости.

Таблица 12. Влияние температуры инкубации на КЛА в фильтратах культуральной жидкости микромицетов (время гидролиза 2 часа)

| Температура инкубации, °С | КЛА, Е/мл | | |
|---------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| | <i>A. fumigatus</i> F 22 | <i>A. sydowii</i> F 25 | <i>Cl. herbarum</i> F 57 |
| 37 | 129,3±11,1 | 83,2±7,4 | 49,5±5,1 |
| 25 | 70,9±6,9 | 49,6±4,8 | 35,2±3,3 |
| 15 | 25,3±2,3 | 16,6±1,2 | 10,5±1,1 |

Проведенные эксперименты показали, что снижение температуры инкубации приводит к уменьшению фиксируемой активности секретируемых коллагенолитических ферментов (табл. 12), которое более выражено у микромицетов рода *Aspergillus*, чем у *Cl. herbarum* при изменении температуры от 37 до 25°С: 50-60% и 30% соответственно. Отмеченные различия в температурной чувствительности ферментов у микромицетов, относящихся к роду *Aspergillus* и *Cladosporium*, по-видимому, связаны с различиями в свойствах секретируемых протеиназ. При этом они в значительной степени нивелируются при дальнейшем снижении температуры до 15°С. Исходя из полученных результатов, в дальнейшем определение коллагенолитической активности проводилось при 37°С в течение 2 часов (рис. 18, табл. 13).

Проведенные исследования показали, что все грибы при росте на модифицированных средах с частичной заменой сахарозы на коллаген секретируют коллагенолитические ферменты. При этом максимальная ферментативная активность зафиксирована у культуры *A. fumigatus* F 22. Таким образом, *A. fumigatus* F 22 обладал наибольшей скоростью роста, а также протеолитической и коллагенолитической активностью, что делает этот микромицет перспективным для дальнейших исследований в качестве продуцента коллагеназ.

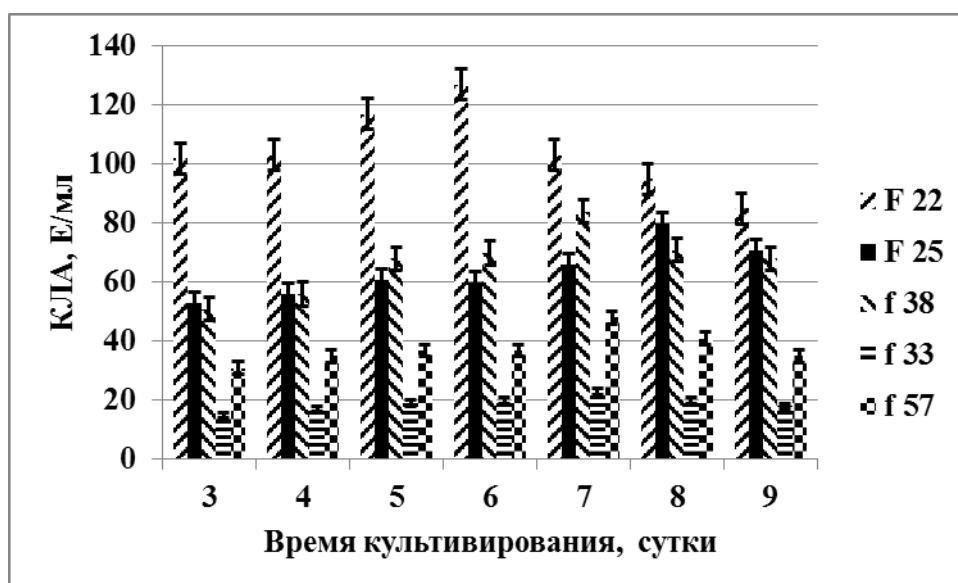


Рис. 18. Секрция внеклеточных коллагенолитических протеаз в процессе глубинного культивирования микромицетов

Таблица 13. Максимальная КЛА микромицетов в процессе глубинного культивирования

| Микромицет | КЛА, Е/мл | Время, сутки |
|---------------------------|------------|--------------|
| <i>A. fumigatus</i> F 22 | 127,3±10,7 | 6 |
| <i>A. sydowii</i> F 25 | 81,4±7,8 | 8 |
| <i>B. terrestris</i> F 38 | 83,6±8,1 | 7 |
| <i>Cl. herbarum</i> F 33 | 22,6±2,0 | 7 |
| <i>Cl. herbarum</i> F 57 | 47,5±5,1 | 7 |

Суммируя результаты экспериментов представленных в главе 3, можно отметить, что использованная схема поиска перспективных продуцентов коллагеназ включала несколько этапов. Поверхностное культивирование на средах с коллагеном и отбором культур на основании определения их скоростей роста и индексов лизиса. Глубинное культивирование отобранных штаммов с характеристикой их КЛА и УКА. И наконец, детальное изучение параметров роста, протеолитической и коллагенолитической активности микромицетов в процессе глубинного культивирования для выявления продуцента целевого продукта. Использованная схема позволила провести скрининг 47 коллекционных штаммов микромицетов и предложить

Aspergillus fumigatus F 22 для дальнейших исследований в качестве перспективного биообъекта для получения коллагенолитических протеаз.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СЕКРЕЦИИ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

4.1. Выявление факторов экзогенной регуляции на секрецию внеклеточных коллагенолитических протеаз

4.1.1. Влияние состава питательной среды

Известно, что количество индукторов синтеза протеаз в питательной среде может существенно влиять на выработку соответствующих гидролитических ферментов [111, 209, 238, 240, 293, 327]. В связи с этим на первом этапе работы было изучено влияние соотношения сахарозы и коллагена в питательной среде на продукцию микромицетом коллагенолитических протеаз (рис. 19, табл. 14). Можно видеть, что при отсутствии коллагена в среде (вариант № 1) наблюдается крайне низкая выработка ферментов, которые обнаруживаются только на 9 сутки культивирования. Постепенное увеличение концентрации индуктора с соответствующим снижением углевода приводит к постепенному увеличению КЛА в культуральной жидкости и снижению времени достижения максимальной активности.

Максимальная коллагенолитическая активность наблюдалась при соотношении сахароза:коллаген равным 0,5:1,5 (вариант № 4). Дальнейшее снижение концентрации сахарозы с соответствующим увеличением индуктора вызывало резкое снижение максимальной КЛА в культуральной среде, возможно, связанное с низким уровнем углевода, необходимого для накопления достаточного количества биомассы.



Рис. 19. Секреция коллагенолитических протеаз *A. fumigatus* при различных условиях культивирования (сахароза : коллаген – вариант 1(0,1:1,9); вариант 2(0,5:1,5); вариант 3(1,0:1,0); вариант 4(1,5:0,5); вариант 5(2,0:0), 10^7 спор/мл
 Таблица 14. Максимальные значения КЛА при погруженном культивировании *A. fumigatus* на средах с различным содержанием сахарозы и коллагена

| Соотношение 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 |

Важным фактором для биосинтетической активности микроорганизмов является качественный состав источников углерода и азота в питательной жидкости [111, 209, 238]. Можно видеть, что из трех легко метаболизируемых источников углерода: глюкозы, сахарозы и фруктозы, наибольшая активность коллагенолитических протеаз в культуральной жидкости фиксировалась при использовании сахарозы (рис. 20). Следует отметить, что подобные результаты были получены при изучении влияния разных углеводов на секрецию коллагеназ новым штаммом *Bacillus cereus*

[209]. Однако имеются и другие данные, свидетельствующие о преимуществах использования глюкозы при синтезе протеиназ микромицетами [111]. МКЦ ингибирует выработку ферментов в процессе культивирования мицелиального гриба, тогда как в присутствии шрота лекарственных растений наблюдается значительная коллагенолитическая активность. Полученные результаты при использовании шрота, возможно, свидетельствуют о содержании в субстрате относительно низкомолекулярных питательных веществ, обеспечивающих, в отличие от МКЦ, рост и биосинтетическую активность *A. fumigatus*. Подтверждением этого предположения являются полученные ранее данные об активном росте и секреции гидролитических ферментов при культивировании микромицетов на средах со шротом цветков пижмы обыкновенной или корней и корневищ марены красильной [18, 43]. Следует отметить, что использование при погруженном культивировании отходов сельскохозяйственной продукции (пшеничных отрубей) описано и в других работах [111, 172].

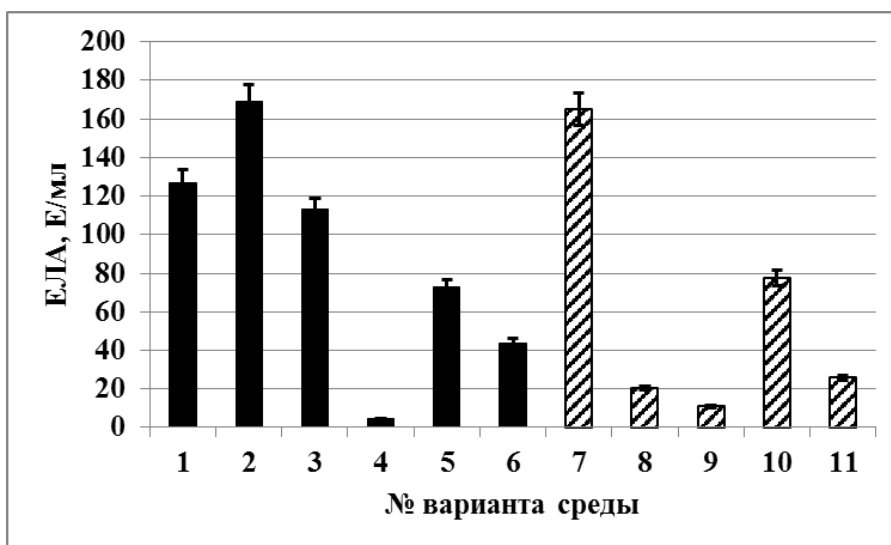


Рис. 24. Влияние источников углерода (№ 1 – 6) и азота (№ 7 – 11) на продукцию коллагенолитических ферментов *A. fumigatus*. №№ 1 – 6: 1,5% коллагена и 0,5% глюкозы (1), сахарозы (2), фруктозы (3), целлюлозы (4), шрота пижмы (5), шрота марены (6). №№ 7 – 11: 0,5% сахарозы и 1,5% коллагена (7), казеина (8), БСА (9), пептона (10), дрожжевого экстракта (11).

Время культивирования – 6 суток, 5×10^6 спор/мл

Изучение влияния различных белковых субстратов на секрецию коллагенолитических протеаз *A. fumigatus* показало (рис.20, №№ 7-11), что наибольший эффект наблюдался при использовании коллагена. Казеин и альбумин вызывают значительно меньшую индукцию синтеза и секреции гидролитических ферментов. Из двух часто используемых компонентов питательных сред – дрожжевого экстракта и пептона, применение последнего приводит к большему увеличению коллагенолитической активности в культуральной жидкости, вероятно, за счет возможного присутствия в его составе пептидов-фрагментов, образовавшихся при гидролизе коллагена, входящего в состав мышечной ткани. В связи с полученными результатами, в дальнейшей работе в качестве основной питательной среды использовали модифицированную среду, содержащую солевой фон среды Чапека-Докса, 0,5% сахарозы и 1,5% коллагена.

4.1.2. Влияние концентрации спор в посевном материале на секрецию коллагенолитических протеаз

Еще одним важным фактором экзогенной регуляции биосинтетических процессов при культивировании микроорганизмов является количество посевного материала [111, 209]. Как показали проведенные эксперименты (рис. 21), изменение количества спор в диапазоне от 1×10^6 до 10×10^6 спор/мл среды влияло на секрецию коллагенолитических протеаз при погруженном культивировании *A. fumigatus*. При этом, если увеличение посевного материала от 10^6 до $2,5 \times 10^6$ спор/мл оказывало незначительный эффект на процесс накопления ферментов в культуральной жидкости, то инокуляция в количестве 5×10^6 спор/мл среды приводила к возрастанию максимальной КЛА в .2 раза. При дальнейшем увеличении засеянных в среду спор происходило торможение процесса образования коллагенолитических ферментов. Следует отметить, что оптимизация количества посевного материала позволила увеличить максимальную коллагенолитическую активность в 1,3 – 2,6 раза (рис. 22). Аналогичные результаты были получены и в других работах при изучении влияния количества посевного материала на

продукцию пептидаз [111, 209]. По мнению авторов, существуют некоторые оптимальные соотношение количества питательных веществ и микроорганизмов, обеспечивающие наилучшие условия для синтеза ферментов. В дальнейшем во всех экспериментах количество посевного материала составляло 5×10^6 спор/мл среды.



Рис. 21. Влияние количества посевного материала на секрецию коллагенолитических протеаз *A. fumigatus* : 1 – 10^6 ; 2 – $2,5 \times 10^6$; 3 – 5×10^6 ; 4 – 10^7 спор/мл

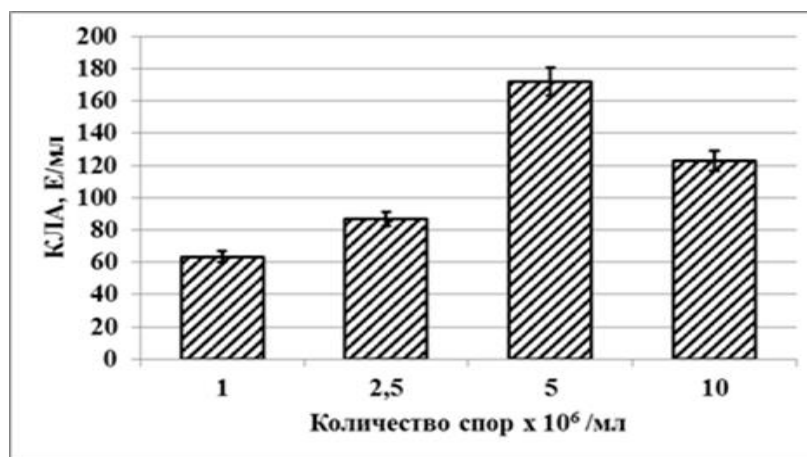


Рис 22. Влияние количества посевного материала на максимальную коллагенолитическую активность внеклеточных протеиназ *A. fumigatus*

4.1.3. Зависимость коллагенолитической активности секретируемых ферментов от числа пассажей микромицета на среде с индуктором (коллагеном)

Одним из приемов, используемых для увеличения ферментативной активности микроорганизмов, является пассирование продуцентов на средах с индуктором выработки фермента [116]. В проведенных экспериментах использовался пересев *A. fumigatus* на модифицированных средах Чапека-Докса с полной заменой сахарозы на коллаген. Параметры роста и коллагенолитическую активность культуры оценивали при последующем поверхностном и глубинном культивировании.

Поверхностное культивирование проводили на агаризованных средах с полной заменой сахарозы на коллаген. В лунки вносили по 0,1 мл смывов спор с поверхности среды после каждого пассажа в концентрации 10^7 спор/мл суспензии. На 3 и 4 сутки измеряли диаметры зон лизиса коллагена. Как видно на рисунке 23 культура *A. fumigatus* после первого пассирования образовывала меньшие зоны просветления вокруг лунки ($p \leq 0.05$), чем тот же микромицет из следующих пассажей. При этом на 3 сутки диаметры зон лизиса микромицетов 2-4 пассажей статистически значимо не отличались.

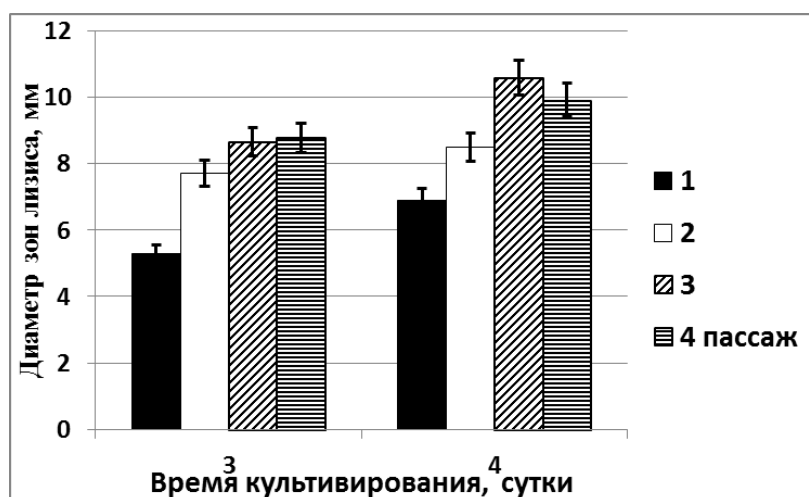


Рис. 23. Влияние количества пассажей на диаметр зон лизиса коллагена при поверхностном культивировании *A. fumigatus*

На четвертые сутки у *A. fumigatus* всех пассажей происходило увеличение зон лизиса. При этом не зафиксировано различий величины диаметра зоны

просветления у *A. fumigatus* 3 и 4 пассажей, тогда как минимальные показатели наблюдались у микромицета первого пассажа. Диаметры зон лизиса коллагена микромицетом после второго пересева были статистически значимо больше, чем после первого и меньше, чем у 3-4. Полученные результаты позволяют считать, что пассирование на среде с индуктором, по крайней мере, до 3 пассажа приводит к увеличению коллагенолитической активности мицелиального гриба при поверхностном культивировании с максимальной продукцией гидролитических ферментов у *A. fumigatus* третьего пассажа на третьи и четвертые сутки культивирования.

При погруженном культивировании *A. fumigatus* после различных этапов пересевов также отмечались изменения параметров роста и ферментативной активности. Так (рис. 24), накопление биомассы в процессе культивирования мицелиального гриба практически не отличалось у культур первого и второго пассажа. После третьего пересева на поздних этапах культивирования (5-7 сутки) обнаружено статистически значимое увеличение количества биомассы. У *A. fumigatus* 4 пассажа еще большее образование биомассы фиксировалось уже на всех этапах культивирования. Соответственно при пересевах на среде с индуктором наблюдалось увеличение удельной скорости роста, начиная с 3 пассажа (табл. 15).

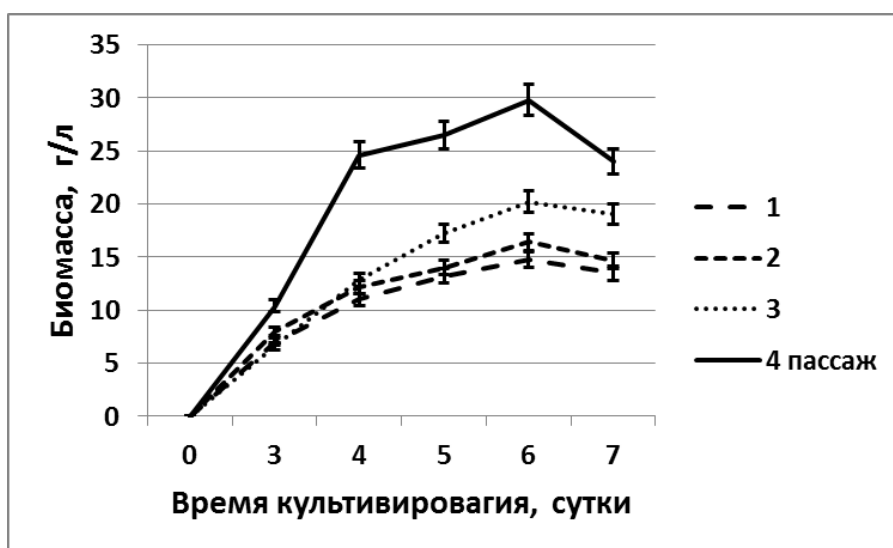


Рис. 24. Влияние количества пассажей на рост биомассы *A. fumigatus*

Таблица 15. Параметры роста *A. fumigatus* после пассирования на среде с индуктором (коллагеном)

| Число пассажей | Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | Количество биомассы, г/л |
|----------------|--|--------------------------|
| 1 | 0,019±0,02 | 14,8±1,2 |
| 2 | 0.018±0,02 | 16.4±1,3 |
| 3 | 0,028±0.03 | 20,2±1,5 |
| 4 | 0.036±0.03 | 29,8±1,9 |

При анализе влияния количества пересевов на коллагенолитическую активность *A. fumigatus* при последующем погруженном культивировании показано (рис. 25), что после третьего пересева наблюдалось статистически значимое ($p \leq 0,05$) увеличение ферментативной активности на всех этапах культивирования. При этом максимальные значения КЛА фиксировались на 6 сутки (табл. 16). После четвертого пересева максимум КЛА достигался уже на 4 сутки, а величина ферментативной активности не отличалась от аналогичного показателя, зафиксированного для *A. fumigatus* третьего пассажа. На 6-7 сутки культивирования микромицета четвертого пассажа обнаружено снижение КЛА.

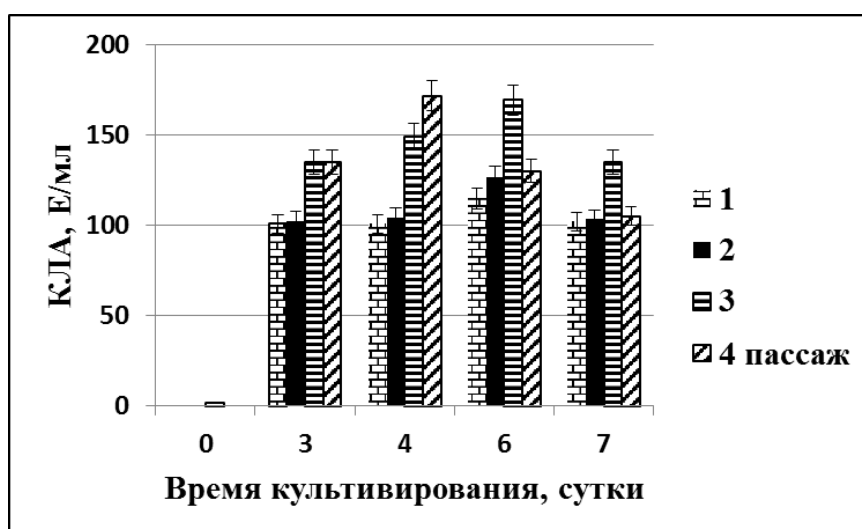


Рис. 25. Влияние количества пассажей на секрецию коллагенолитических протеаз *A.fumigatus*

При анализе удельной коллагенолитической активности (рис. 26) выявлены следующие закономерности. На 4-7 сутки культивирования УКА микроциста после третьего пересева на среде с индуктором была статистически значимо выше, чем у этого микроциста других пассажей. Максимум ферментативной активности наблюдался также на 6 сутки культивирования. Сравнение максимальных значений коллагенолитической активности показало (табл. 16), что в процессе пересевов на среде с коллагеном к 3-4 пассажу происходит увеличение ферментативной активности и уменьшение времени культивирования, необходимого для ее достижения.

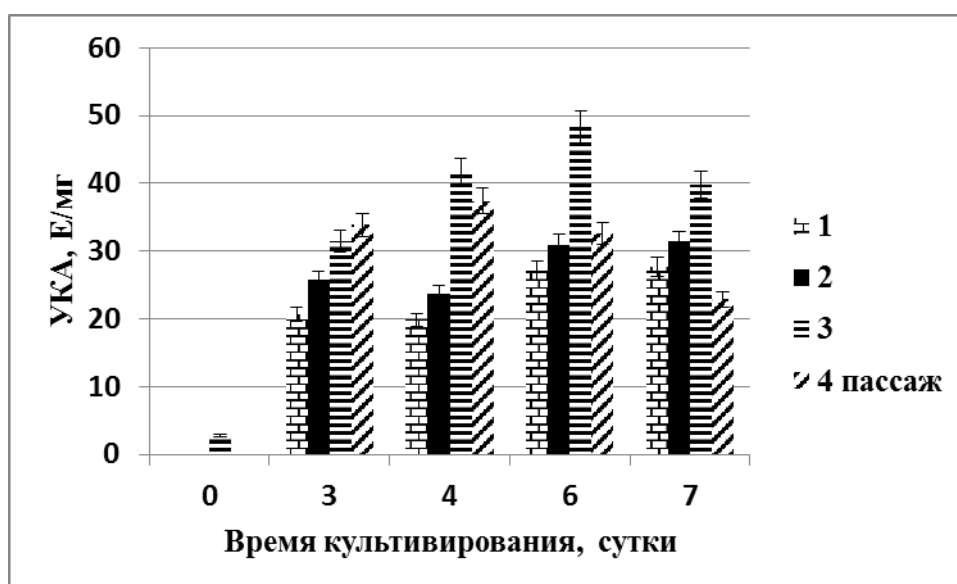


Рис. 26. Влияние количества пассажей на УКА секретируемых коллагенолитических протеаз *A. fumigatus*

Таблица 16. Влияние количества пассажей на максимальную коллагенолитическую активность внеклеточных протеаз *A. fumigatus*

| Число пассажей | КЛА, Е/мл | УКА, Е/мг | Время, сутки КЛА/УКА |
|----------------|------------|-----------|-------------------------|
| 1 | 115,2±8,4 | 27,7±1,9 | 6/7 |
| 2 | 126,6±9,3, | 31,4±2.7 | 6/7 |
| 3 | 169,5±11,2 | 48,3±3,6 | 6/6 |
| 4 | 172,0±11,2 | 37,4±2,5 | 4/4 |

Следует отметить, что в процессе описанных пересевов постепенно замедляется скорость роста микромицета на агаризованных средах с коллагеном. Кроме того, дальнейшее увеличение количества пересевов не приводит к изменению коллагенолитической активности *A. fumigatus*, как при поверхностном, так и при глубинном культивировании. На основании полученных результатов можно заключить, что оптимальным способом повышения коллагенолитической активности у *A.fumigatus* с помощью пассирования на среде с индуктором (коллагеном) является использование культуры третьего пассажа.

4.1.4. Влияние способа инокуляции на секрецию коллагенолитических протеаз при глубинном культивировании *A. fumigatus*

Альтернативным вариантом инокуляции посевного материала при погруженном культивировании микромицетов является использование вегетативного мицелия [22, 238]. В связи с этим на следующем этапе проводилось сравнительное исследование параметров роста и ферментативной активности *A. fumigatus* при засеве спорами и вегетативным мицелием. Можно видеть, что способ инокуляции влияет на удельную скорость роста и количество образовавшейся биомассы (рис. 27, табл. 17). Так, использование 10% мицелия приводит к статистически значимому увеличению обоих показателей ($p \leq 0,05$) по сравнению с использованием при засеве спор или 5% вегетативного материала.



Рис. 27. Кривые роста *A. fumigatus* при различных способах инокуляции (1 - 5%, 2 - 10% мицелий, 3 - 5×10^6 спор/мл)

Таблица 17. Параметры роста *A. fumigatus* при погруженном культивировании

| Посевной материал | Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | Количество биомассы, г/л |
|-----------------------------------|--|--------------------------|
| Мицелий (5%) | 0,020±0,002 | 16,25±1,10 |
| Мицелий (10%) | 0,028±0,003 | 20,01±1,24 |
| Споры (5x10 ⁶ спор/мл) | 0,018±0,002 | 14,80±1,02 |

Проведенные эксперименты показали, что способ инокуляции существенно влияет на активность секретируемых протеаз микромицетом. Так (рис. 28), на 3-5 и 9 сутки культивирования протеолитическая активность в фильтратах культуральной жидкости была статистически значимо выше при использовании в качестве посевного материала спор по сравнению с вегетативным мицелием. При засеве 5% и 10% мицелием наблюдались два максимума секреции протеаз на 4 и 7 сутки. При этом существенных различий при использовании двух концентраций вегетативного материала обнаружено не было. Следует отметить, что на 7 сутки ферментации не зафиксировано статистически значимых различий протеолитической активности при трех способах инокуляции.



Рис. 28. Протеолитическая активность (ПЕ/мл) в фильтратах культуральной жидкости при различных способах инокуляции *A. fumigatus* (5%, и 10% - концентрация мицелия, концентрация спор - 5x10⁶ спор/мл среды)

Несколько другая ситуация наблюдалась при анализе удельной протеолитической активности в фильтрах культуральной жидкости (рис. 29). При использовании в качестве посевного материала мицелия также фиксировались два максимума ПЕ/мг на 4 и 7 сутки. При этом в последнем случае активность была в 1,3 раза выше для 10% вегетативного материала по сравнению с 5%. Еще ниже в эти же сроки была удельная протеолитическая активность при инокуляции спорами, которая составляла только 30% от максимальной. На 4 сутки культивирования статистически значимых различий удельной протеолитической активности (ПЕ/мг) для трех вариантов инокуляции не обнаружено.

Сравнение максимальных значений протеолитической и удельной протеолитической активности *A. fumigatus* показало (табл. 18), что на ранних этапах культивирования значительная секреция протеолитических ферментов наблюдается при засеве спорами, тогда как дальнейшая ферментация приводила либо к сравнению удельной протеолитической активности, либо к преобладанию указанных показателей при использовании мицелия. Следует отметить, что в процессе ферментации могут происходить не только количественные, но и качественные изменения секретируемых белков, что требует дальнейшего детального изучения.



Рис. 29. Удельная протеолитическая активность (ПЕ/мг) в фильтрах культуральной жидкости при различных способах инокуляции *A. fumigatus* (5%, и 10% - концентрация мицелия, концентрация спор - 5×10^6 спор/мл среды)

Таблица 18. Максимальная протеолитическая (ПЕ/мл) и удельная протеолитическая (ПЕ/мг) активность в фильтратах культуральной жидкости при различных способах инокуляции *A. fumigatus*

| Способ инокуляции | ПЕ/мл | Время, сутки | ПЕ/мг | Время, сутки |
|-----------------------------------|-----------|--------------|----------|--------------|
| 5% мицелий | 68,4±5,7 | 7 | 18,8±1,5 | 7 |
| 10% мицелий | 70,2±6,5 | 7 | 23,6±1,9 | 7 |
| Споры (5x10 ⁶ спор/мл) | 101,1±9,0 | 3 | 15,2±1,1 | 4 |

Изучение влияния способа инокуляции на секрецию коллагенолитических протеаз обнаружило, что на ранних этапах культивирования (3 – 4 сутки) ферментативная активность в культуральной жидкости мало меняется при засеве различными концентрациями мицелия (рис. 30). Однако в дальнейшем уровень коллагенолитической активности становился выше для 5% мицелия по сравнению со спорами или 10% мицелием (табл. 19)

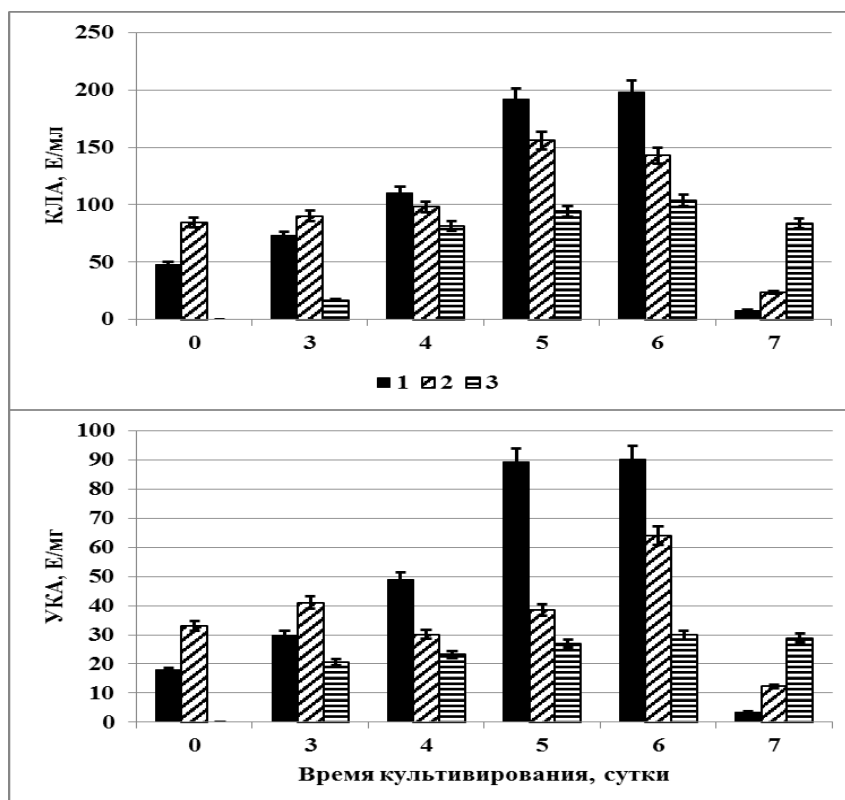


Рис. 30. Секреция коллагенолитических протеаз в процессе глубинного культивирования *A. fumigatus* при различных способах инокуляции (1 - 5%, 2 - 10% мицелий, 3 - 5x10⁶ спор/мл)

Преимущества использования 5% вегетативного материала по сравнению с 10% показано и другими авторами [209]. Аналогичные закономерности обнаружены и при анализе удельной коллагенолитической активности *A. fumigatus* (рис. 30, табл. 19): с 4 по 6 сутки культивирования активность внеклеточных коллагенолитических протеаз была значительно выше при засеве 5% мицелием по сравнению с 10% или спорами. Исходя из полученных результатов, для дальнейших экспериментов был выбран способ инокуляции 5% вегетативным материалом.

Таблица 19. Максимальна коллагенолитическая активность *A. fumigatus* при разных вариантах внесения посевного материала

| Посевной материал | КЛА, Е/мл | Время, сутки | УКА, Е/мг | Время, сутки |
|-----------------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| 5% мицелий | 198,40±15,03 | 6 | 90,18±10,61 | 5-6 |
| 10% мицелий | 156,15±13,82 | 5 | 63,96±5,34 | 6 |
| Споры (5x10 ⁶ спор/мл) | 103,77±10,60 | 6 | 29,89±3,21 | 6 |

4.2. Масштабирование процесса культивирования *A. fumigatus*

Пилотное масштабирование процесса культивирования *A. fumigatus* проводили в ферментере объемом 2,7 л. В данных исследованиях параметром, характеризующим интенсивность массообмена в культиваторе, был принят объёмный коэффициент массопередачи по кислороду (K_{La} , ч⁻¹), который составляет 21 ч⁻¹. Динамику роста микромицета оценивали на основании изменений морфологических признаков и количества биомассы. Отмечено, что начиная с 67 часов культивирования, гифы мицелия собирались в клубки – пеллеты. При проведении ферментации выявлены следующие особенности процесса: обильное образование пены, незначительную флотацию биомассы на стенках ферментеров. Посторонней микрофлоры обнаружено не было.

На основании определения количества биомассы на различных этапах культивирования были рассчитаны удельные скорости роста при

ферментации в различных условиях, которые статистически значимо не отличались (табл. 20). Активность секреции коллагенолитических протеаз постепенно повышалась в процессе культивирования, достигая своего максимума через 115 часов (рис. 31).

Таблица 20. Максимальная коллагенолитическая активность *A. fumigatus* при разных вариантах культивирования

| Способ культивирования | КЛА, Е/мл | УКА, Е/мг | Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | Время, ч КЛА/УКА |
|------------------------|--------------|-------------|--|------------------|
| Ферментер | 163,66±14,37 | 90,18±7,35 | 0,027±0,002 | 115/115 |
| Колбы на качалке | 198,40±15,03 | 90,85±10,61 | 0,029±0,002 | 144/120 |

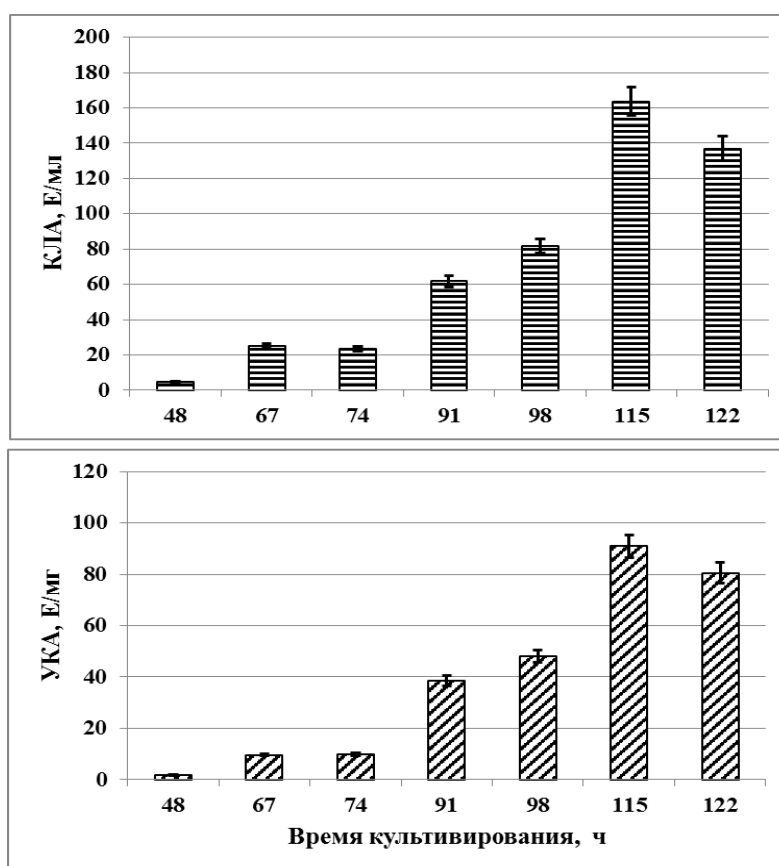


Рис. 31. Секреция коллагенолитических протеаз *A. fumigatus* при культивировании в ферментере.

Максимальные значения КЛА и УКА при обоих способах культивирования также были подобны (табл. 20). Следует отметить некоторое снижение времени достижения максимальной активности коллагенолитических протеаз при использовании ферментера, однако, возможно, это связано с более длительными интервалами отбора опытных проб при культивировании в колбах.

Таким образом, проведенное изучение влияния факторов экзогенной регуляции на секрецию внеклеточных коллагенолитических протеаз *A. fumigatus* позволило оптимизировать условия культивирования микромицета и провести масштабирование процесса ферментации. Полученные результаты делают возможным в дальнейшем разработку технологической схемы производства препаратов ферментов и изучение способов их использования в медицине, фармацевтической и пищевой промышленности.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ СЕКРЕЦИИ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕИНАЗ ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

5.1. Разработка способа твердофазного культивирования микромицета

В настоящее время производство микробных протеаз осуществляется с использованием как твердофазной (SSF), так и погруженной ферментации (SmF) [288]. При SSF микробный рост происходит на твердой подложке со значительно меньшим количеством свободной воды, необходимой для поддержки метаболической активности и роста микроорганизмов [121, 287]. SSF больше подходит для микроскопических грибов из-за близости этого способа ферментации к их естественной среде обитания и потребности во влаге по сравнению с бактериями [213]. SSF позволяет использовать многочисленные отходы агропромышленных производств, включая пшеничные отруби, пшеничную солому, шелуху, коровий навоз, жмых сахарного тростника, полимерные частицы и т.д. [175, 237, 261]. Определенной трудностью при использовании твердофазного культивирования является то, что нет установленных условий

культивирования и состава сред для продукции микробных протеаз, и каждый штамм имеет свои особые пищевые и физико-химические требования для достижения максимальной выработки ферментов, которые обычно определяются опытным путем [146, 288]. Сравнительные исследования синтеза протеаз микромицетами при использовании SmF или SSF показали, что в последнем случае выход ферментов может в несколько раз превышать продуктивность, зафиксированную при глубинном культивировании [206, 222, 237, 328].

В проведенных исследованиях при твердофазной ферментации в качестве носителей использовали вермикулит и шрот цветков пажитки. Выбор указанных носителей определялся имеющимися литературными данными. Так, при исследовании твердофазного культивирования мицелиальных грибов показана более высокая секреция протеиназ при использовании вермикулита по сравнению с другими полимерными носителями [237]. Описана способность микромицетов рода *Aspergillus* и *Penicillium* расти и секретировать гидролитические ферменты при поверхностном культивировании на модифицированной среде Чапека-Докса с заменой сахарозы на шрот пажитки [43].

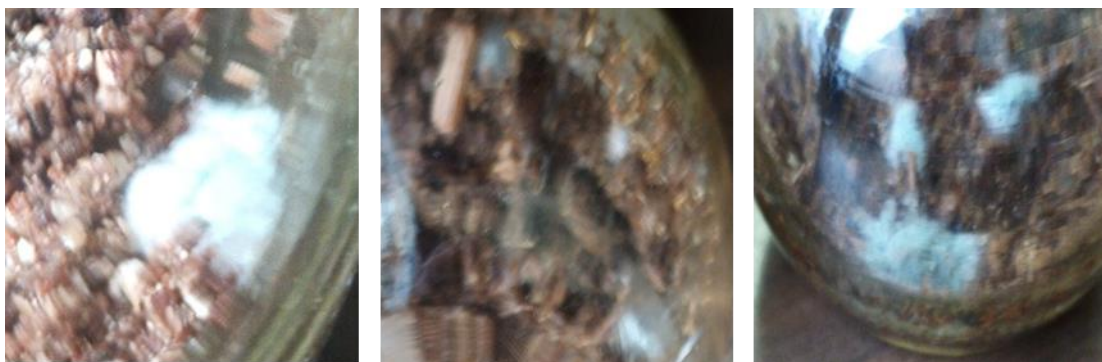


Рис. 32. Рост колоний *A. fumigatus* при твердофазном культивировании на различных носителях. Слева направо: вермикулит, 3 сутки; шрот пажитки, 4 сутки; шрот пажитки, 7 сутки

Действительно, уже на 3-4 сутки культивирования наблюдался видимый рост колоний на обеих средах с указанными носителями (рис. 32). При этом, на среде с вермикулитом, начиная с 5-6 суток, визуально не обнаруживался

рост новых колоний, тогда как на среде со шротом пижмы они продолжали появляться до 7 суток.

Количественное определение биомассы в процессе культивирования подтвердило визуальные наблюдения (рис. 33). В тех случаях, когда носителем выступал вермикулит, рост биомассы прекращался, начиная с 6 суток. На шроте пижмы рост культуры фиксировался все время наблюдений – 7 суток. На 4, 5 и 7 сутки культивирования отмечалось статистически значимое ($p \leq 0,05$) снижение количества биомассы при использовании вермикулита по сравнению со шротом пижмы, которое составляло от 15 до 25%.

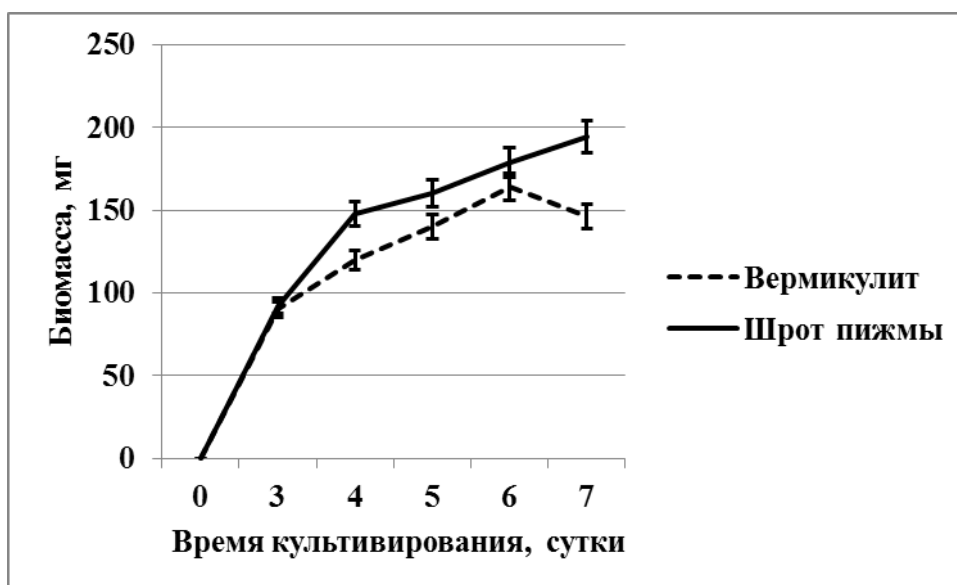


Рис. 33. Рост биомассы *A. fumigatus* при культивировании на различных носителях

5.2. Влияние различных носителей на секрецию коллагенолитических протеаз

На всех этапах твердофазного культивирования секреция коллагенолитических протеаз *A. fumigatus* была выше при использовании шрота пижмы, по сравнению с вермикулитом (рис. 34). Кроме того, на шроте ферментативная активность фиксировалась уже на 3 сутки культивирования, тогда как на вермикулите – только на 4 и была более чем в 10 раз ниже. При использовании обоих носителей максимум секреции коллагенолитических

протеиназ наблюдался на 6 сутки культивирования. Однако максимальные значения активности внеклеточных коллагенолитических протеаз при использовании шрота пажмы были выше, чем аналогичные показатели, зафиксированные в экспериментах с вермикулитом (табл. 21).



Рис 34. Секреция коллагенолитических протеаз при твердофазном культивировании *A. fumigatus* на различных носителях

Таблица 21. Максимальная коллагенолитическая активность и продуктивность *A. fumigatus* при различных способах ферментации

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

При проведении твердофазного культивирования одним из важных показателей, который позволяет сравнивать исследуемые культуры и используемые носители, является отношение суммарной активности секретированных ферментов к биомассе продуцента (продуктивность) [111, 237]. На рисунке 35 видно, что на большинстве этапов культивирования указанный показатель выше при использовании в качестве носителя шрота пажмы. Особенно большие различия зафиксированы на ранних этапах

культивирования (3-4 сутки). Однако ко времени достижения максимальной продуктивности культуры (6 сутки) отмеченные различия в показателях нивелируются, и значения максимальных значений продуктивности при твердофазном культивировании с использованием шрота пижмы и вермикулита практически совпадают (табл. 21).



Рис 35. Продуктивность секретиции коллагенолитических протеаз при твердофазном культивировании *A. fumigatus* на различных носителях

5.3. Сравнение коллагенолитической активности и продуктивности *A. fumigatus* при SmF и SSF-ферментации

Определение активности внеклеточных коллагенолитических протеаз, секретируемых *A. fumigatus* при твердофазной ферментации, показало увеличение показателя в 3 раза при использовании вермикулита и в 5 раз – шрота пижмы по сравнению с погруженным культивированием (табл. 21). Полученные результаты могут объясняться тем, что шрот пижмы, образующийся после спиртовой экстракции цветков растения в процессе получения танацехола, содержит БАВ, стимулирующие выработку гидролитических ферментов [43].

Представляло интерес также сравнить продуктивность *A. fumigatus* при погруженном и твердофазном культивировании. Исходя из приведенных данных (табл. 21), можно рассчитать отношение общего количества

ферментативных единиц коллагенолитических протеаз в 100 мл среды к количеству биомассы, образовавшейся в процессе погруженного культивирования в том же объеме питательной жидкости (табл. 17). Проведенный расчёт показал, что максимальная продуктивность при SSF более чем в 3 раза превышает величину, полученную при SmF, что хорошо совпадает с данными других авторов [111, 237, 290].

Таким образом, показано возможное направление увеличения продукции целевых ферментов с использованием твердофазного культивирования *A. fumigatus*. Однако в дальнейшем могут возникнуть трудности, связанные с необходимостью масштабирования процесса ферментации. Следует отметить, что в настоящее время примерно 90% промышленного производства ферментов осуществляется с помощью процессов погруженной, глубинной ферментации, используя микроорганизмы дикого типа или генно-инженерные продуценты [288].

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

6.1. Разработка методов выделения и очистки коллагенолитических ферментов из культуральной жидкости

Для очистки коллагеназ мицелиальных грибов из фильтратов или центрифугатов культуральной жидкости существуют традиционные методы экстракции ферментов, такие как осаждение сульфатом аммония, ультрафильтрация, экстракция трис-HCl буфером, буфером бикарбоната натрия, с последующим использованием хроматографических методов, таких как гель-фильтрация, ионный обмен, гидрофобное взаимодействие, аффинная хроматография [113, 116, 265]. Однако при использовании этих методов отмечено снижение активности целевого фермента почти до половины от первоначальной [165, 218].

После проведения глубинного культивирования и отделения биомассы *A. fumigatus* центрифугированием культуральная жидкость представляла собой

прозрачный, опалесцирующий раствор желтоватого цвета. Концентрация белка составляла 1,9 мг/мл, а удельная активность – 90,85 Е/мг (табл. 22).

Таблица 22. 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 |

На первом этапе очистки была выбрана гель-фильтрация на сорбенте с пределом исключения около 15 кДа, так как в большинстве случаев молекулярная масса микробных протеаз лежит выше этого предела [91, 116, 240, 290]. Действительно, как показали проведенные исследования, более 80% коллагенолитической активности после проведения хроматографии обнаружено в первой фракции, которая соответствовал свободному объему колонки (рис. 39, табл. 23).

Таблица 23. Результаты очистки коллагенолитической протеазы *A. fumigatus* методом гель-фильтрации

| Исследуемый образец | Количество белка, % | Суммарная ферментативная активность, % |
|------------------------|---------------------|--|
| Культуральная жидкость | 100 | 100 |
| Пик 1 | 13,5±1,1 | 80,4±7,0 |
| Пик 2 | 20,0±1,9 | 18,1±1,6 |
| Пик 3 | 35,0±3,1 | 1,2±0,2 |
| Пик 4 | 31,5±3,0 | 0,3±0,11 |

Из трех других фракций только в материале второго пика обнаруживается заметная коллагенолитическая активность, тогда как в 3 и 4 пиках

фиксируются только следы фермента. При этом уже на этом этапе удалось очистить целевой продукт почти в 6 раз (табл. 22).

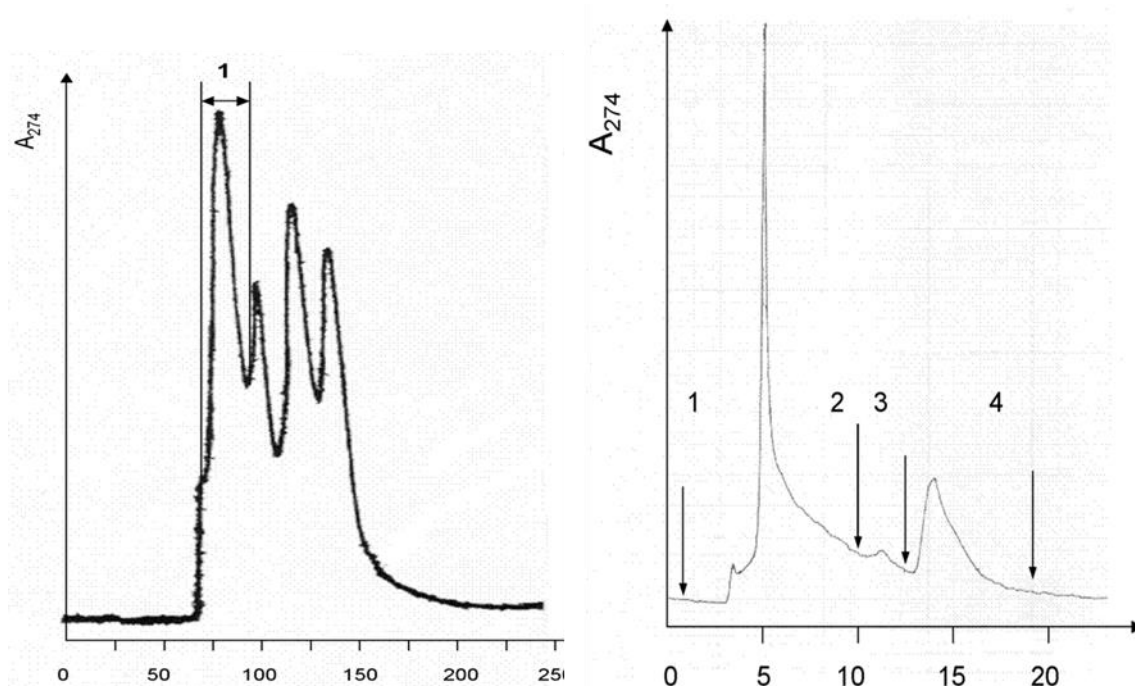


Рис. 39. Гель-фильтрация внеклеточного белка фильтрата культуральной жидкости *A. fumigatus* (слева): 1 – фракция, обладающая коллагенолитической активностью. Аффинная хроматография материала первой фракции после гель-фильтрации внеклеточных белков *A. fumigatus* (справа). Стрелками обозначен момент добавления: 1 – материала первой фракции и начало элюции фосфатным буфером; 2 – фосфатного буфера + 1М NaCl; 3 – 1М CH₃COOH; 4 – фосфатного буфера. На оси абсцисс - объем элюции в мл.

Аффинная хроматография является важным инструментом селективного биохимического разделения БАВ, основанного на использовании в качестве стационарной фазы биологически родственного связывающего агента (лиганда). Например, субстрата или его аналога для выделения соответствующего фермента [264]. В связи с этим на следующем этапе очистки коллагенолитической протеазы *A. fumigatus* нами был апробирован именно этот подход с использованием в качестве лиганда желатина – денатурированной формы коллагена.

Предполагалось, что подобие аминокислотных последовательностей в коллагене и желатине может обеспечить фермент-субстратное взаимодействие, связывание фермента с сорбентом и последующие его выделение и очистку. На рисунке 39 показаны результаты таких экспериментов. Видно, что большая часть балластных белков не связывается с сорбентом и вымывается стартовым буфером и раствором с высоким содержанием солей, тогда как сорбированный материал, характеризующийся значительной КЛА, десорбируется только под действием 1 М CH_3COOH .

6.2. Изучение физико-химических и биохимических свойств полученных ферментных препаратов

Проведенный электрофоретический анализ полученного материала показал, что он содержит гомогенный целевой белок с молекулярной массой около 40 кДа (рис. 40).

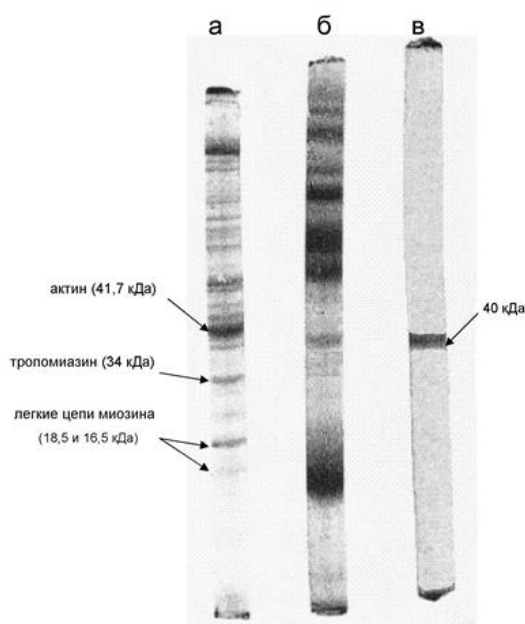


Рис. 40. Диск-электрофорез в присутствии ДДС-Na внеклеточной протеазы *A. fumigatus* до очистки (б) и после аффинной хроматографии (в). Белки - маркеры лизата сердца мыши (а).

Суммарный выход коллагенолитической протеазы составил 52,6% со степенью очистки около 25 раз. Следует отметить, что степень очистки

коллагенолитических протеаз варьирует в широких пределах. Так, ферменты из *Pseudomonas sp.* и *Bacillus cereus* были очищены в 15,4 и 20,4 раза соответственно [93, 165, 208, 325], тогда как термостабильная коллагеназа из *Thermoactinomyces sp.* была получена со 101-кратной очисткой [240],

Изучения влияния температуры на активность коллагенолитической протеазы *A. fumigatus* обнаружило, что максимальная активность проявляется при 40°C (рис. 41а). Следует отметить, что около 80% активности сохранялось и при более высоких температурах до 60°C. Наоборот снижение температуры проведения реакции относительно быстро снижало КЛА.

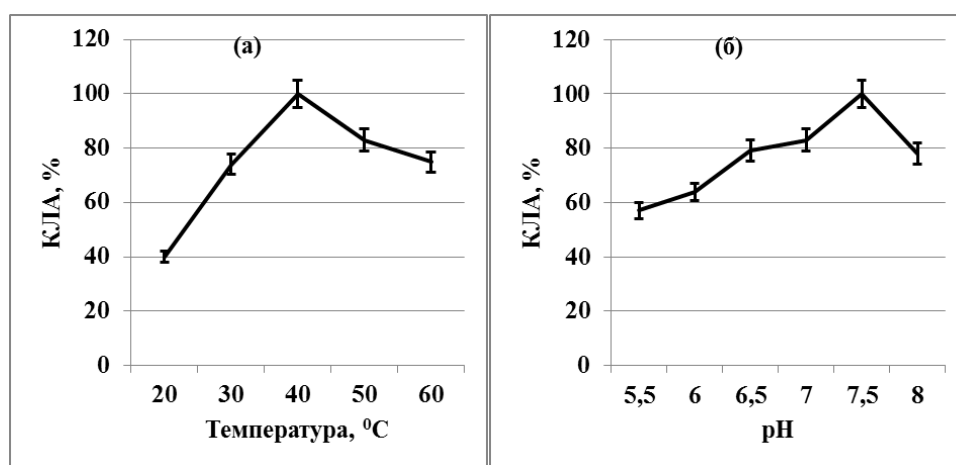


Рис. 41. Активность коллагенолитической протеазы *A. fumigatus* при различных температурах (а) и рН (б).

Изучение влияния рН на коллагенолитическую активность микромицета показало, что оптимальные значения наблюдались при рН 7,5 (рис. 41б). Даже небольшое увеличение или снижение рН приводило к заметному на 20% снижению активности. В то же время при изменении кислотности от 7,0 до 5,5 фиксировалось более медленное снижение КЛА.

Анализ действия различных ингибиторов на коллагенолитическую активность протеазы *A. fumigatus* обнаружил, что фермент почти полностью терял активность под действием фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) и практически не инактивировался этилендиамидтетрауксусной кислотой (ЭДТА), то есть относится к протеазам серинового типа (рис. 42). Дитиотреитол (ДТТ) снижает активность фермента, но в значительно

меньшей степени, что может свидетельствовать о влиянии дисульфидных связей на стабильность его вторичной структуры и активного центра [113]. Следует отметить, что свойства новой протеазы, выделенной из комплекса внеклеточных белков *A. fumigatus*, сходны со свойствами некоторых других аналогичных протеолитических ферментов, синтезированных микромицетами [48, 91, 116, 240]. Однако полученный фермент обладает более высокой активностью по отношению к коллагену I типа.

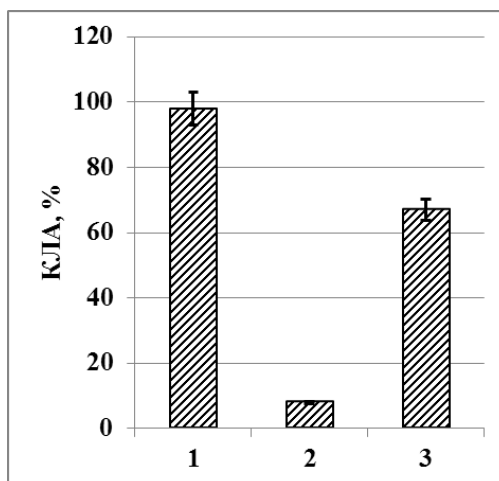


Рис. 42. Ингибиторный анализ внеклеточной коллагенолитической протеазы *A. fumigatus*. Коллагенолитическая активность в % от контроля: 1-ЭДТА, 2 – ФМСФ, 3 – ДТТ.

Таким образом, разработан способ получения внеклеточной коллагенолитической протеазы *A. fumigatus* с использованием двух стадийной хроматографической очистки. Анализ физико-химических и биохимических свойств фермента подтвердил, что выделена протеаза серинового типа с молекулярной массой 40 кДа и максимальной активностью при 40⁰С и рН 7,5. Полученные данные позволяют рассматривать протеазу *A. fumigatus* в качестве основы для получения новых лекарственных средств с коллагенолитическим эффектом.

ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ ХРАНЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ

7.1. Хранение на среде Чапека-Докса под слоем минерального масла

Создание и пополнение коллекций культур и центров микробных биологических ресурсов необходимо для сохранения микробного биоразнообразия и прогресса наук о жизни [249]. Кроме того, использование микроорганизмов в качестве биотехнологических агентов требует их консервации и содержания в коллекциях, что обеспечивает долгосрочное сохранение их жизнеспособности и продуктивности. Из-за различий в физиологических потребностях микроорганизмов, методы консервации зависят от вида микроорганизма, имеющихся материалов и оборудования [249, 285]. С помощью сравнительно простого и дешевого метода – хранения под вазелиновым маслом, удается весьма успешно сохранять месяцами или даже годами многие виды микроорганизмов [8, 11, 285]. Именно этот метод был использован нами для консервации коллекции микромицетов ФГБНУ ВИЛАР.

Обнаружено, что после хранения под вазелиновым маслом все коллекционные штаммы сохраняют свою жизнеспособность и растут на средах Чапека-Докса. Однако интенсивность роста, оцениваемая по величине заполнения газона, была различной (рис. 43). Можно видеть, что в процессе культивирования увеличивается количество штаммов со 100% заполнением газона. К 12 суткам культивирования их число достигает 38 из 47 исследованных культур. В то же время у ряда грибов была зафиксирована значительно меньшая интенсивность роста. Так, на 12 сутки заполнение газона составляло 25% у *P. steckii* F 43, 50% у *Cl. sphaerospermum* F 56 и *P. puberulum* F 16, 75% у 6 штаммов: *A. repens* F 7, *Cl. cladosporoides* F 35, *Cl. herbarum* F 57, *P. citrinum* F 54, *P. malinovobranova* F3, *P. purpurescens* F 18. Однако, как показали дальнейшие исследования, и эти культуры росли на модифицированных средах с заменой сахарозы на коллаген.

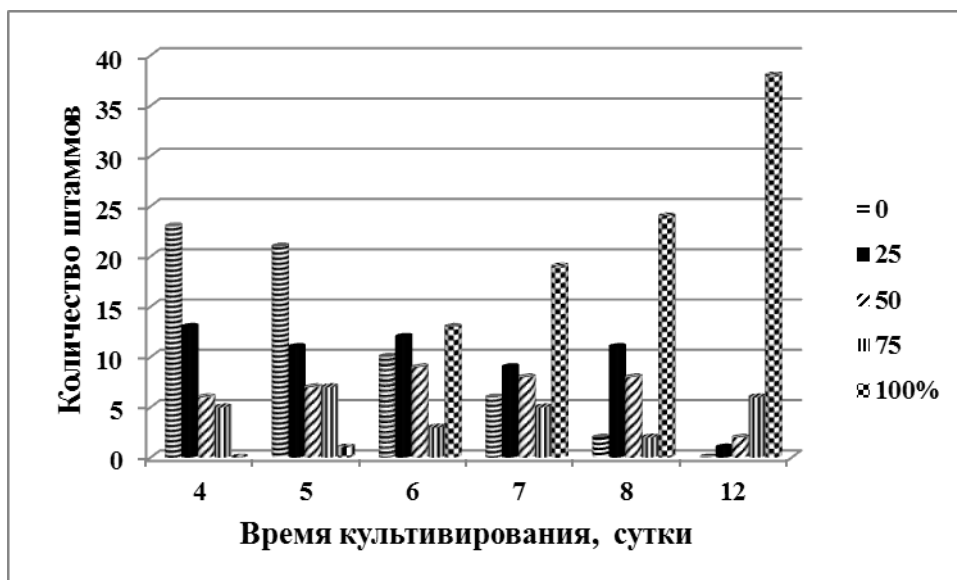


Рис. 43. Количество штаммов микромицетов с разным заполнением газона при культивировании на агаризованной среде Чапека-Докса после 4 лет хранения и пересева

Для проверки стабильности коллагенолитической активности коллекционных штаммов проводилось сравнение их индексов лизиса до и после консервации на агаризованных средах под вазелиновым маслом (рис. 44 и 45). Можно видеть, что после хранения наблюдалось разнонаправленное изменение индексов лизиса: у некоторых грибов они оставались неизменными, а у других – уменьшались или увеличивались.

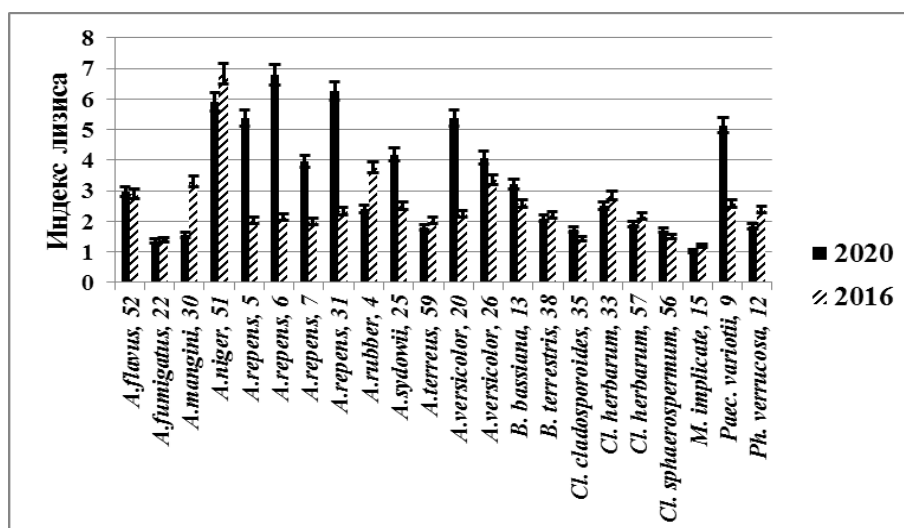


Рис. 44. Изменение индексов лизиса коллагена у микромицетов после 4 лет хранения на агаризованных средах Чапека-Докса под вазелиновым маслом

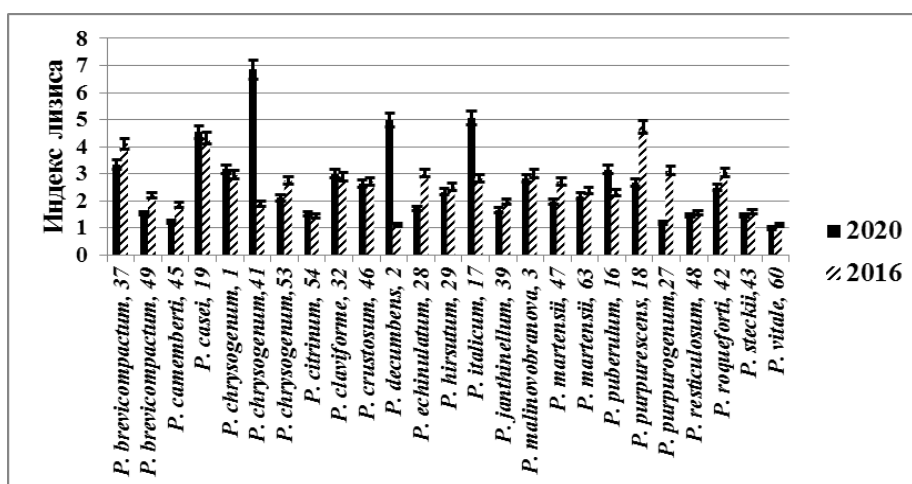


Рис. 45. Изменение индексов лизиса коллагена у микромицетов рода *Penicillium* после 4 лет хранения на агаризованных средах Чапека-Докса под вазелиновым маслом

Анализ полученных результатов выявил (табл. 24), что у 26 коллекционных штаммов не происходит статистически значимого изменения индексов лизиса. Для 10 микромицетов зафиксировано снижение указанного показателя в диапазоне 20-60%, со средним значением 37%. Количество культур со снижением индексов лизиса было больше среди представителей рода *Penicillium* (6 штаммов) по сравнению с другими родами (4 штамма). Повышение этого показателя наблюдалось у 11 микромицетов, и было более значительным: от 1,4 до 4,5 раз, со средним значением более 2,5 раз. Среди представителей рода *Penicillium* обнаружено только 4 штамма с повышением индексов лизиса в процессе хранения.

Таблица 24. Изменение индексов лизиса коллагена (ИЛ) у микромицетов после 4 лет хранения на агаризованных средах под вазелиновым маслом

| Изменение ИЛ | Не изменился | Уменьшился | Увеличился |
|--------------------|--------------|------------|------------|
| Количество штаммов | 26 | 10 | 11 |

Таким образом, применяемый способ консервации коллекционных штаммов микромицетов, выявил достаточно хорошую сохранность жизнеспособности и коллагенолитической активности мицелиальных грибов. Однако, обнаруженное снижение интенсивности роста и индексов лизиса

после пересева делает необходимым разработку альтернативных методов консервации по крайней мере для перспективных штаммов-продуцентов.

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

Одним из наиболее часто используемых способов длительной консервации микроорганизмов является лиофилизация, обеспечивающая сохранение культуры в течение 30-50 лет. Жизнеспособность лиофилизированных микробных культур зависит от вида микроорганизма, условий культивирования, концентрации исходного материала, состава защитных веществ, продолжительности процесса [249, 285]. Еще одним методом, позволяющим длительно сохранять микроорганизмы, является криоконсервация, под которой понимают сохранение биологических материалов при криогенных температурах, как правило, -80°C (сухой лед) или -196°C (жидкий азот). Низкая температура защищает белки и ДНК от денатурации, повреждений и замедляет внутриклеточные процессы [8, 24, 249]. Именно эти два процесса были использованы нами для консервации перспективного штамма-продуцента коллаgenoлитических протеаз *A. fumigatus* (табл. 25).

Таблица 25. 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 |
| | $2,4 \times 10^6$ | | $1,6 \times 10^6$ | | $1,2 \times 10^6$ | | $1,3 \times 10^6$ | | $1,4 \times 10^6$ | |
| Ллиофилизация | $4,0 \times 10^5 \pm$ | 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 |
| | $3,8 \times 10^4$ | | $3,1 \times 10^4$ | | $3,5 \times 10^4$ | | $3,0 \times 10^4$ | | $3,1 \times 10^4$ | |

Для оценки жизнеспособности культуры проводили определение количества колониеобразующих единиц в мл суспензии (КОЕ/мл), как это описано в разделе «Объекты и методы исследования». Обнаружено (табл.

25), 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 значимых изменений КОЕ/мл по крайней мере в течение года (время наблюдения).

7.3. Коллагенолитическая активность *A. fumigatus* после хранения при температуре жидкого азота и после лиофилизации

Для изучения влияния способа консервации микромицета на коллагенолитическую активность проводилось его глубинное культивирование до и после 1 года хранения при условиях, описанных в главе 4. Можно видеть (рис. 46), что *A. fumigatus* после криоконсервации и лиофилизации секретирует коллагенолитические протеазы. При этом не обнаружено статистически значимых различий в величине максимальной КЛА до и после хранения (табл. 26). Однако на 4-6 сутки культивирования наблюдалась статистически значимое 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.



Рис. 46. Активность коллагенолитических протеаз *A. fumigatus* до и после различных вариантов хранения в течение года

Таблица 26. Максимальные значения КЛА протеаз, секретируемых *A. fumigatus* до и после года различных вариантов хранения в течение года

| Образец | КЛА, Е/мл | Время, сутки |
|-----------------------|------------|--------------|
| До хранения | 122,8±10,5 | 6 |
| После лиофилизации | 119,3±9,4 | 7 |
| После криоконсервации | 123,3±11,0 | 7 |

Следует отметить, что оба используемых метода консервации в исследуемом временном диапазоне позволяют сохранять жизнеспособность и коллагенолитическую активность *A. fumigatus*, что делает перспективным их дальнейшее применение для других микроорганизмов-продуцентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в медицине особое внимание уделяется методам, основанным на неинвазивных подходах, в том числе с использованием так называемых «терапевтических» ферментов, обеспечивающих выраженный эффект при низких концентрациях и физиологических условиях. К таким ферментам относятся коллагеназы - эндопептидазы, катализирующие химические процессы и разрушающие пептидные связи в коллагене [77, 296]. Коллаген — основной структурный белок межклеточного матрикса, играющий важную роль в физиологических и патологических процессах в организме [27, 49, 138]. В связи с этим ферменты, гидролизующие белок, имеют значительный потенциал для использования в медицине [313, 330]. Кроме того, коллагеназы могут применяться в пищевой промышленности, фармации и для решения экологических проблем [37, 91, 240].

Коллагеназы продуцируются клетками тканей животных, корней некоторых растений и синтезируются микроорганизмами [116, 313]. При этом микробный синтез ферментов имеет ряд преимуществ: неограниченность источника получения, возможность экзогенной регуляции продуцента, относительная простота выделения и очистки целевого продукта, доступность генно-инженерных манипуляций [240, 281, 327].

Используемые на данный момент коллагеназы и препараты на их основе имеют ряд существенных недостатков. Наиболее известный продуцент коллагеназы – *Clostridium histolyticum* (МНН «Коллалитин») является возбудителем газовой гангрены, вследствие чего предъявляются повышенные требования безопасности на всех стадиях производства и реализации продукции [28, 313, 330]. При получении коллагеназы из камчатского краба («Коллалитин», «Коллагеназа КК» используется только гепатопанкреас, что приводит к образованию большого количества отходов, которые в дальнейшем необходимо утилизировать. Крабовая коллагеназа безопасна для человека, но имеет ограничения для промышленного производства и значительное различие в степени чистоты и активности фермента [35, 36]. Все сказанное выше определяет актуальность поиска среди микроорганизмов новых продуцентов коллагенолитических протеаз и оптимизацию условий синтеза и получения этих ферментов.

Мицелиальные грибы являются источниками многих гидролаз и обладают способностью изменять качественный и количественный состав секретлируемых ферментов в ответ на введение в состав питательных сред тех или иных субстратов-индукторов [64, 116]. Коллекция микромицетов ФГБНУ ВИЛАР содержит некоторые мицелиальные грибы, для которых показана способность секретировать кератиназы, целлюлазы, коллагеназы. В связи с этим целью нашего исследования являлась разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеиназ с использованием коллекционных штаммов микромицетов. При этом использовались следующие процессы: поверхностное культивирование на агаризованных средах с коллагеном, погруженное и твердофазное культивирование.

На первом этапе исследования проводилась оценка коллагенолитической активности коллекционных штаммов (47 штаммов, 38 видов, относящихся к 8 родам) при поверхностном культивировании на модифицированной среде Чапека-Докса с заменой сахарозы на коллаген. Следует отметить, что

качественный и количественный анализ гидролиза желатина или коллагена при поверхностном культивировании для определения коллагеназной активности описан в литературе [91, 92, 116, 240]. Однако в наших исследованиях при отборе возможных продуцентов мы оценивали не только величину зон лизиса, но и скорость роста колоний. В результате проведенного анализа было выбрано 20 штаммов с высокими индексами лизиса и/или скоростями роста.

Проведенное в дальнейшем глубинное культивирование при ранее описанных в литературе условиях [56] показало, что все отобранные культуры секретируют коллагенолитические протеазы в культуральную жидкость. При этом КЛА и УКА большинства микромицетов было сравнимо с аналогичными показателями *Aspergillus flavus* F 52, из фильтрата культуральной жидкости которого 2 коллагенолитических фермента были выделены и охарактеризованы ранее [56]. Однако у пяти микромицетов были зафиксированы более высокие уровни коллагенолитической активности: *A. fumigatus* F 22, *A. sidowii* F 25, *Botrytis terrestris* F 38, *Cl. herbarum* F 33 и 57. Эти продуценты были использованы для дальнейшего углубленного изучения.

Глубинное культивирование, проведенное на модифицированной среде показало, что к 3-4 суткам культивирования происходила полная утилизация сахарозы, и секреция внеклеточного белка у исследованных микромицетов. Обнаружено, что *A. fumigatus* F 22 обладает наибольшей удельной скоростью роста, протеолитической и коллагенолитической активностью. В связи с этим указанный микромицет был выбран в качестве перспективного биообъекта для разработки биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз.

На следующем этапе работы изучалось влияние факторов экзогенной регуляции на параметры роста и коллагенолитическую активность гриба. Исследовались следующие параметры: состав питательной среды, количество спорового посевного материала, способ инокуляции, пересевы на

среде с индуктором (коллагеном). На основе полученных результатов проведена оптимизация условий культивирования микромицета и масштабирование получения ферментов с помощью культивирования в ферментере. Показано, что параметры роста и секреция внеклеточных коллагенолитических протеаз были подобны при обоих способах ферментации. Полученные результаты делают возможным в дальнейшем увеличение производства указанных ферментных препаратов и разработку способов их практического использования

На следующем этапе работы проводилось сравнение продуктивности *A. fumigatus* при погруженном (SmF) и твердофазном (SSF) культивировании. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки. SSF обладает большей эффективностью: за счет снижения затрат; более высокой степенью извлечения продукта в более концентрированной форме; обычно фиксируется высокая производительность. Однако не все микроорганизмы могут расти в условиях пониженной влажности; не полностью обеспечивается доступность компонентов среды; биосинтетические процессы протекают медленнее из-за влияния диффузионных ограничений; трудно контролировать параметры процесса [106, 282]. SmF обеспечивает лучшее управление процессом; простое извлечение внеклеточных ферментов; облегченный тепло- и массообмен, диффузию компонентов среды; большую доступность масштабирования процессов ферментации. В то же время, следует отметить, сложность в эксплуатации; продукты находятся в разбавленном состоянии и менее стабильны; высокие энергозатраты; высокая стоимость, которая определяет и стоимость получаемого продукта; большой выброс сточных вод [106, 282]. В работе исследовалось накопление биомассы, КЛА и продуктивность микромицета при твердофазном культивировании с использованием в качестве носителей вермикулита и шрота цветков пижмы. Показано увеличение КЛА при SSF по сравнению с SmF в 3 и 5 раз при культивировании с вермикулитом и шротом соответственно. Максимальная продуктивность, рассчитанная как отношение

общего количества синтезированного микромицетом фермента к количеству биомассы, также было в несколько раз выше при использовании твердофазной ферментации.

В то же время, следует отметить, что примерно 90% промышленного производства ферментов осуществляется с помощью процессов погруженной, глубинной ферментации [288]. В связи с этим для выделения и очистки фермента был использован супернатант, после центрифугирования питательной жидкости, полученный при глубинном культивировании. Разработан способ получения внеклеточной коллагенолитической протеиназы *A. fumigatus* с использованием двух стадийной хроматографической очистки. Анализ физико-химических и биохимических свойств фермента подтвердил, что синтезирована протеиназа серинового типа с молекулярной массой 40 кДа и максимальной активностью при 40°C и pH 7,5.

Как уже отмечалось выше, в настоящее время основным источником получения микробных коллагеназ, в том числе разрешенным к использованию в медицине, являются ферменты, секретируемые *Cl. histolyticum* [28, 113]. В связи с этим при работе с новыми продуцентами коллагенолитических протеаз одним из основных вопросов является сравнение продуктивности нового штамма с аналогичными показателями ранее изученных микроорганизмов. В ряде работ приводятся подробные данные о продуктивности некоторых новых продуцентов, а также о влиянии условий культивирования на ферментативную активность коллагеназ [28, 119, 169, 237, 290]. Полученные нами результаты о коллагенолитической активности протеиназ *A. fumigatus* сравнимы с приведенными данными. Кроме того, перспективным направлением в дальнейшей работе с *A. fumigatus* рассматривается возможность использования твердофазной ферментации, которая по данным многих авторов позволяет увеличить протеолитическую активность микромицетов от 2 до 20 раз и более [237, 288, 290].

Использование микроорганизмов в качестве биотехнологических агентов требует их консервации и содержания в коллекциях, что обеспечивает долгосрочное сохранение их жизнеспособности и продуктивности. Из-за различий в физиологических потребностях микроорганизмов, методы консервации зависят от вида микроорганизма, имеющихся материалов и оборудования [249, 285]. Одним из методов содержания коллекционных штаммов, используемым в работе было хранение на агаризованных средах Чапека-Докса под вазелиновым маслом при 4-5⁰С с периодическими пересевами. Указанный способ консервации микромицетов, выявил достаточно хорошую сохранность жизнеспособности и коллагенолитической активности грибов. Однако обнаруженное снижение интенсивности роста и индексов лизиса после хранения и посева делает необходимым разработку альтернативных методов консервации по крайней мере для перспективных штаммов-продуцентов.

В связи с этим на примере *A. fumigatus* были апробированы два метода долгосрочного хранения микроорганизмов: криоконсервация при температуре жидкого азота и лиофилизация. Показано, что оба метода в исследуемом временном диапазоне позволяют сохранять жизнеспособность и коллагенолитическую активность *A. fumigatus*, что делает перспективным их дальнейшее применение для других микроорганизмов-продуцентов.

Таким образом, разработанные биотехнологические процессы могут служить основой для дальнейшего создания технологии получения коллагенолитических протеаз с использованием *Aspergillus fumigatus* и новых лекарственных средств с коллагенолитическим эффектом.

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 пажиты.
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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева Л.В., Алейникова Т.Л., Андрианова Л.Е. Биохимия: учебник. Электронное издание под ред. Е.С. Северина ГЭОТА-Медиа. 2020. 468с.
2. Антипова Л.В., Сторублевцев С.А., Болгова С.Б. и др. Применение коллагеновых субстанций в отраслях экономики. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. 10(4). 601-604.
3. Антипова Л.В., Сторублевцев С.А., С.Б. Болгова С.Б. и др. Рыбные коллагены: источники, свойства и применение. // Сырье и упаковка для парфюмерии, косметики и бытовой химии. 2015. №7 (169). 15-17.
4. Антипова, Л.В., Дворянинова О.П., Сторублевцев С.А. и др. Свойства препаратов функциональных биополимеров рыбного происхождения // Вестник ВГУИТ. 2014. №3. 103-105.
5. Архинчеева Н.Ц., Бальхаев И.М. Современное состояние и перспективные направления развития пептидной терапии. // Вопросы биол., хим. и фармацевтической химии. 2022. 25(2). 3-6.
6. Аскерова Т.А., Ягубова В.И., Велиева Г.А., Гасанова Г.Т. Некоторые биохимические показатели в диагностике наследственных коллагенопатий // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. № 8-1. 48-51. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11757> (дата обращения: 01.10.2022).
7. Барिशевский Е. В., Вопросы эколого-экономической оценки инвестиционных проектов по переработке отходов в строительную продукцию // Вестник МГСУ. 2017. 12(3). 260 – 272.
8. Бахтиярова Б.К., Бекмухамедова Н.К., Ташпулатов Ж.Ж., Мамаев М.С. Сохранность антагонистической способности микромицетов

- при хранении различными методами // Вестник аграрной науки Узбекистана. 2018. 1(71). 35-39.
9. Бегма А.Н., Бегма И.В. Оценка эффективности применения коллагеновых губок в лечении хронических ран различной этиологии // Главная медицинская сестра. 2014. №3. 56-64.
10. Бегма А.Н., Бегма И.В., Хомякова Е.К. Опыт применения коллагеновых повязок и губок Метуракол в хирургической практике // РМЖ. 2014. 22(17). 1248-1252.
11. Бекмухамедова Н.К., Бахтиёрова М.С. Сохранность антагонистической способности микромицетов при хранении различными методами // Евразийское научное объединение. 2020. 7-3(65). 143-146.
12. Бекмухамедова Н.К., Мавжудова А. М., Куканова С. И., Зайнитдинова Л. И., Мамиев М. С. Сохранность антагонистических свойств актиномицетов при хранении различными методами // Universum: химия и биология: электрон. научн. журн. 2021. 2(80). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/11236> (дата обращения: 05.02.2021)
13. Белосохов А.Ф., Кокаева Л.Ю., Еланский С.Н., Комаров А.Б. Новая технология хранения и реализации биологического материала грибов // Защита картофеля. 2017. №4. 33-37.
14. Билер В.Г., Марковская В.А. Образование келоидного рубца как осложнение ожоговой травмы. // Павловские чтения: сборник научных трудов всероссийской научно– практической конференции / КГМУ; под ред. П.В. Ткаченко Курск. 2018. 7.
15. Божокин М.С., Божкова С.А., Нетьлько Г.И., Возможности современных клеточных технологий для восстановления поврежденного суставного хряща. // Травматология и ортопедия России 2016. 22(3). 122-134.

16. Болгова С. Б. Рыбные коллагены: получение, свойства и применение
Специальность: 05.18.07 - Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук, Воронеж. 2015. 159.
17. Воронков А.В., Степанова Э.Ф., Жидкова Ю.Ю., Гамзелева О.Ю. Современные подходы фармакологической коррекции патологических рубцов // Фундаментальные исследования. 2014. №3. 301–308.
18. Гордонова И.К., Никитина З.К. Использование мицелиальных грибов для вторичной переработки лекарственного растительного сырья. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020. 23(6). 6-12.
19. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII Федеральная электронная медицинская библиотека (2015). Дата обращения: 9 февраля 2016, Т. 1, Определение концентрации микробных клеток ОФС.1.7.2.0008.15
20. Жураковский И.П., Архипов С.А., Архипова В.В. и др. Коллагены I и II типов в опухолях молочной железы // Современные проблемы науки и образования. – 2018. №5. 70. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28098> (дата обращения: 01.10.2022).
21. Завражнов А.А., Гвоздев М.Ю., Крутова В.А., Ордокова А.А. Раны и раневой процесс. / под ред. В.В. Кочубей. 2016. ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России. 29с.
22. Зиганшин Д.Д., Егоршина А.А., Лукьянцев М.А., Сироткин А.С. Глубинное культивирование микромицета *Trichoderma asperellum* ВКПМ F-1323 в опытно-промышленных условиях. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. 10(1). 39–47.
23. Казанцев А.Д., Островский Д.С., Герасимов М.Ю., Борзенко С.А. Изучение экспериментальных методов выделения и

- культивирования клеток эндотелия роговицы человека // Современные технологии в офтальмологии. 2017. №4. 105-109.
24. Кантерова А.В., Фальковская У.В., Копица В.Н., Новик Г.И. Развитие специализированной коллекции фитопатогенных микроорганизмов // Экологический вестник. 2016. №3. 28-34.
25. Капулер О., Сельская Б., Галеева А., Камиллов Ф. Метаболизм коллагеновых волокон на фоне возрастных изменений. // Врач. 2015. № 8, 64–69.
26. Карасев М.М. Редина М.А. Белоусова О.В. Новейшие достижения фармацевтической разработки, основанные на использовании коллагена. // Фармация и фармакология. 2015. 3(5). 12-17.
27. Кистенев Ю.В., Вражнов Д.А., Николаев В.В. и др. Исследование пространственной структуры коллагена с применением методов многофотонной микроскопии и машинного обучения. // Успехи биологической химии. 2019. №59. 219–252.
28. Конон А.Д., Петровский С.В., Шамбурова М.Ю. и др. Особенности биотехнологий клостридиальных коллагеназ – перспективных ферментов медицинского назначения. // Медицина экстренных ситуаций. 2019; № 2(56): 45-57.
29. Кременевская М.И. Научные основы технологий глубокой переработки коллагенсодержащего сырья для получения продуктов с заданными свойствами 05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук. С.-Петербург. 2019. 403 с.
30. Кривушина А.А., Бобырева Т.В. Сохраняемость свойств штаммов «керосинового» гриба *Hormoconis resinae* при многолетнем хранении в коллекции // Труды ВИАМ. Испытания материалов. 2019. 11(83). 104-112.

31. Кузубова Н.А., Титова О.Н., Склярова Д.Б. Интерстициальные заболевания легких с прогрессирующим легочным фиброзом: патогенетические особенности и подходы к терапии. // Медицинский совет. 2020. №17. 99–106.
32. Кусакина М.Г., Суворов В.И., Чудинова Л.А. Большой практикум «Биохимия». Лабораторные работы: учеб. пособие / Перм. гос. нац. исслед. ун-т. 2012. 148.
33. Лыскин П.В. Воздействие клостридиальной коллагеназы на эпиретинальные структуры глаза человека. // Российская детская офтальматология. 2019. №1. 34-38.
34. Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е. Биохимические маркеры метастазирования в кости. // Успехи молек. онкологии. 2015. 2(1). 63-75.
35. Майорова А.В., Сысуев Б.Б., Иванкова Ю.О., Ханалиева И.А., Коллагеназы в медицинской практике: современные средства на основе коллагеназы и перспективы их совершенствования. // Фармация и фармакалогия. 2019. 7(5) 260-270.
36. Майорова А.В., Сысуев Б.Б., Ханалиева И.А., Вихрова И.В. Современный ассортимент, свойства и перспективы совершенствования перевязочных средств для лечения ран // Фармация и фармакология. 2018. №1. 4–32.
37. Махова А.А., Минаев М.Ю., Куликовский А.В., Вострикова Н.Л., Изучение ферментативной активности рекомбинантной металлопептидазы, предназначенной для применения в мясной промышленности // Вопросы питания. 2019. 88(4). 95-104.
38. Мехтиев С.Н., Степаненко В.В., Зиновьева Е.Н., Мехтиева О.А. Современные представления о фиброзе печени и методах его коррекции. // Фарматека. 2014. № 6. 80-87.

39. Милевски И. Типы и функции коллагена URL: https://meduniver.com/Medical/genetika/tipi_i_funkcii_kollagena.html (дата обращения 18.03.21).
40. Минаев М.Ю., Махова А.А. Возможность использования рекомбинантной металлопептидазы М9 для тендеризации мяса // Биотехнологические процессы в производстве продуктов питания и кормов. 2019. №4. 63-64.
41. Минаев М.Ю., Махова А.А., Пчелкина В.А. Получение рекомбинантной металлопротеазы для использования в мясной промышленности // Пищевая промышленность. 2019. №1 64-68.
42. Наркевич Л. В., Эффективность инвестиционного проекта переработки отходов мясокомбината // Проблемы экономики. 2018. 1(26). 142-165.
43. Никитина З.К., Гордонова И.К. Использование отходов лекарственного растительного сырья для биотехнологического получения гидролитических ферментов. // Вопросы биол. медиц. и фармац. химии. 2019. 22(9). 37-42.
44. Николаева Т.И., Шеховцов П.В. Гиролизаты коллагена в профилактике и лечении заболеваний суставов. // Фундаментальные исследования. 2014. №12. 524-528.
45. Парамонов Б.А. Коллагенолитические ферменты. Нерешенные и спорные вопросы теории и практики // Косметика и медицина. 2016. №1. 32–41.
46. Парамонов Б.А. Коллагенолитические ферменты. Применение для очищения ран // Косметика и медицина. 2016. №2. 38–48.
47. Пономаренко Е.А., Диатропова М.А., Артемьева К.А., Шелков А.Ю. Оптимизация протокола получения культуры дермальных фибробластов крыс // Клиническая и экспериментальная морфология. 2021. 10(2). 62-69.

48. Попова Е.А., Крейер В.Г., Комаревцев С.К. и др. Свойства внеклеточной протеиназы микромицета *Aspergillus ustus* I, обладающей высокой активностью при гидролизе фибриллярных белков. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. 57(2). 138-144.
49. Потехина Ю.П., Структура и функции коллагена. // Рос. остеопат. журн.. 2016. №1-2(32-33). 87-99.
50. Распопова Е.А., Коротаева А.И., Маленко О.Э., Белов А.А. Кинетика термоинактивации протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба, стабилизированного полисахаридными соединениями // Фундаментальные исследования. 2013. 11(4). 656–661.
51. Румянцева В.А., Боранов Э.В., Рогожина Ю.А. и др. Системная коллагенопатия: сосудистый тип синдрома Элерса–Данло с успешной двусторонней последовательной торакоскопической плевроэктомией. // Журн. клин. и эксперимент. хир. им. акад. Б.В. Петровского. 2017. № 4. 51–58.
52. Саламатов Ю.С., Симонян А.В., Покровская Ю.С., Аванесян А.А. Разработка доступного метода количественного определения α -аминокислот // Бюлл. Волгоград. НЦ РАМН. 2007. №2. 17-19.
53. Свистунов В.В. Макарова А.Е., Воронцова М.В. Атеросклероз, гипертоническая болезнь. 2018. Иркутск: ИГМУ. 70 с.
54. Советников Н.Н., Кальсин В.А., Коноплянников М.А., Муханов В.В., Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении дефектов суставной поверхности // Клиническая практика. 2013. №1. 52-66.
55. Сороко О., Инновационная технология производства мясокостной муки // Наука и инновации 2014. 136. 70–72.
56. Сухосырова Е.А., Яковлева М.Б., Никитина З.К., Быков В.А. Секреция коллагенолитических ферментов некоторыми видами дейтеромицетов. // Технологии живых систем. 2007. 4(4). 29-33.

57. Сысуев Б.Б., Ахметов Н.М., Самошина Е.А. и др. Современные аспекты применения нанотехнологий при разработке лекарственных форм нового поколения // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. 3(12). 88-96.
58. Титов Е.И., Литвинова Е.В., Кидяев С.Н., Пчелкина В.А. О микроструктуре коллагенсодержащего сырья, модифицированного щелочными протеиназами // Мясная индустрия. 2017. №8. 36–38.
59. Филиппова С.Ю., Ситковская А.О., Сагакянц А.Б. и др. Выделение опухолевых стволовых клеток рака молочной железы с применением коллагеназы // Современные проблемы науки и образования. 2019. №6.
60. Фрончек Э. В., Григорьян А. Ю., Блатун Л. А. Инновационные биологически активные ранозаживляющие и кровоостанавливающие средства на основе хитозана и коллагена: этапы разработки и медико-технические характеристики. // Раны и раневые инфекции, 2018. 5(4).14-22.
61. Хрундин, Д. В. Оценка отходов переработки птицы как сырья для производства кормов // Вестник технологического университета. 2017. 20(1). 167 – 168.
62. Швачкина М. Е. Исследование влияния оптического иммерсионного просветления на фотосшивание коллагена тканей. 03.01.02 — Биофизика Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук. Саратов. 2020. 194с.
63. Шелудько Н.С. Белковый состав миофибрилл кролика, определенный методом диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия // Цитология. 1975. 17(10). 1148-1154.
64. Шлегель Г. Общая микробиология, пер. с нем. Л. В. Алексеевой и др., под ред. Е. Н. Кондратьевой. Москва: Мир, 1987. - 566 с.

65. Шуршина А.С., Кулиш Е.И., Колесов С.В., Захаров В.П. Получение ферментсодержащих хитозановых пленок // Хим-фарм. журнал. 2015. 49(3). 43–45.
66. Яковлева М.Б., Козельцев В.Л. Протеолиз коллагена некоторыми видами микромицетов и спорообразующих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. 1994. № 30. 121-126.
67. Яременко О.Б., Анохина Г.А., Бурьянов А.А. Сустав. Хрящ. Коллаген. // Травма. 2020. 21(4). 6-12.
68. Abdel-Fattah A.M. Production and partial characterization of collagenase from marine *Nocardopsis dassonvillei* NRC2aza using chitin wastes. // Egyptian Pharmaceutical Journal. 2013. 12(2). 109.
69. Abfalter C. M. et al. Cloning, purification and characterization of the collagenase ColA expressed by *Bacillus cereus* ATCC 14579 // PLoS One. 2016. 11(9). e0162433.
70. Acevedo J. P., Rodriguez V., Saavedra M. et al. Cloning, expression and decoding of the cold adaptation of a new widely represented thermolabile subtilisin-like protease // J. Appl. Microbiol. 2013. 114. 352-363.
71. Adamson C.; Kanai M. Integrating abiotic chemical catalysis and enzymatic catalysis in living cells. // Org. Biomol. Chem. 2021. 19. 37–45.
72. Adhikari A.S., Glassey E., Dunn A.R. Conformational dynamics accompanying the proteolytic degradation of trimeric collagen I by collagenases // J. Am. Chem. Soc. 2012. №134. 13259–13265.
73. Agban Y., Lian J., Prabaka S. et al. Nanoparticle crosslinked collagen shields for sustained delivery of pilocarpine hydrochloride. // Int. J. Pharm. 2016. 501. 96–101.
74. Al Alawi A. M. et al. Magnesium: The recent research and developments // Advances in Food and Nutrition Research. 2021. 96. 193-218.

75. Alberti K.A., Hopkins A.M., Tang-Schomer M.D. et al. The behavior of neuronal cells on tendon-derived collagen sheets as potential substrates for nerve regeneration. // *Biomaterials*. 2014. 35. 3551–3557.
76. Ali N. et al. Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing *Bacillus Subtilis* Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan // *Extremophiles*. 2016. 20. 395-402.
77. Alipour H., Raz A., Zakeri S. et al. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016. 6 (11). 975-981.
78. Amaral Y. M. S., da Silva O. S., de Oliveira R. L., Porto T. S. Production, extraction, and thermodynamics protease partitioning from *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 using PEG/sodium citrate aqueous two-phase systems. // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2020. 50(6). 619-626.
79. Anandharaj M. et al. Production, purification, and biochemical characterization of thermostable metallo-protease from novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 isolated from tannery waste // *Applied biochemistry and biotechnology*. 2016. 178. 1666-1686.
80. Andriotis O.G, Chang S.W., Vanleene M. et al. Structure–mechanics relationships of collagen fibrils in the osteogenesis imperfecta mouse model. // *J. R. Soc. – Interface*. 2015. №12. 0701.
81. Aper S.J.A., Van Spreuwel A.C.C., Van Turnhout M.C. et al. Colorful Protein-Based Fluorescent Probes for Collagen Imaging // *PLoS ONE*. 2014. 9. 114983.
82. Araújo A.B., Furlan J.M., Salton G.D. et al. Isolation of human mesenchymal stem cells from amnion, chorion, placental decidua and umbilical cord: comparison of four enzymatic protocols. // *Biotechnol Lett*. 2018. 40. 989–998.
83. Aziz J., Shezali H., Radzi Z. et al. Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin // *Skin Pharmacol. Physiol*, 2016. 29(4). 190–203.

84. Baehaki A., Suhartono M.T., Syah D. et al. Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11. 4. Afr. // J. Microbiol. Res. 2012. 6. 2373–2379.
85. Bae-Harboe Y-S.C, Harboe-Schmidt J.E, Graber E, Gilchrist B.A. Collagenase followed by compression for the treatment of earlobe keloids. // Dermatol Surg. 2014. 40(5). 519–524.
86. Bajic P., Wiggins A. B., Ziegelmann M. J., Levine L.A. Characteristics of Men With Peyronie's Disease and Collagenase *Clostridium Histolyticum* Treatment Failure: Predictors of Surgical Intervention and Outcomes. // Sex Med. 2020. 17(5). 1005-1011.
87. Barrera K., Sharma S., Schwartzman A., Gruessner Surgical techniques for total pancreatectomy and islet autotransplantation // In Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas. 2020. 101-116. Academic Press
88. Bazaliński, D., Więch, P., Szymańska, P., Muster, M., Kózka, M. Application of *Lucilia sericata* Larvae in Debridement of Pressure Wounds in Outpatient Settings. J. Vis. Exp. 2021. 178. e62590. doi:10.3791/62590 (2021)
89. Bella J.; Hulmes D.J.S. Fibrillar Collagens. In Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms. // Cham. Switzerland. 2017. 82. 457–490.
90. Bernardo R., Hongying S., Fabio P. et al. Plant viral proteases: beyond the role of peptide cutters. // Front Plant Sci. 2018. 9. 666.
91. Bhagwat P.K., Dandge P.B. Collagen and collagenolytic proteases: a review // Biocatal Agric Biotechnol. 2018. 15. 43–55.
92. Bhagwat, P.K., Jhample, S.B., Dandge, P.B. Statistical medium optimization for the production of collagenolytic protease by *Pseudomonas* sp. SUK using response surface methodology // Microbiology. 2015. 84. 520–530.

93. Bhagwat, P.K., Jhample, S.B., Jalkute, C.B., Dandge, P.B., Purification, properties and application of a collagenolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. SUK. // RSC Adv. 2016. 6(69). 65222–65231.
94. Bhatia R. K. et al. Psychrophiles: a source of cold-adapted enzymes for energy efficient biotechnological industrial processes // Journal of Environmental Chemical Engineering. 2021. 9(1). 104607.
95. Blieva R.K., Kalieva A.K., Suleimenova Zh.B. et al. Screening of *Aspergillus* fungi for extra cellular protease and collagenase production. // Reports of the national academy of sciences of the republic of Kazakhstan. 2020. 2(330), 36-40.
96. Bond J.S. Proteases: history, discovery, and roles in health and disease. // J Biol Chem. 2019. 294(5). 1643–1651.
97. Cai L., Feng J., Regenstein J. et al. Confectionery gels: effects of lowcalorie sweeteners on the rheological properties and microstructure of fish gelatin. // Food Hydrocoll. 2017. 67. 157–165.
98. Campbell J.J., Husmann A., Hume R.D et al. Development of three-dimensional collagen scaffolds with controlled architecture for cell migration studies using breast cancer cell lines. // Biomaterials 2017. 114. 34–43.
99. Carter M.J., Gilligan A.M., Waycaster C.R. et al. Cost effectiveness of adding clostridial collagenase ointment to selective debridement in individuals with stage IV pressure ulcers. // J. Med Econ. 2017. 20(3). 253-265.
100. Chanalia P., Gandhi D., Attri P., Dhanda S. Extraction, purification and characterization of low molecular weight Proline iminopeptidase from probiotic *L. plantarum* for meat tenderization // Int. J. Biol. Macromol. 2018. 109. 651–663.
101. Chaturvedi S., Singh A.K., Keshari A.K., et al. Human metabolic enzymes deficiency: A genetic mutation based approach. // Scientifica 2016. Article ID 9828672. doi.org/10.1155/2016/9828672

102. Chen F., Du G., Shih M. et al. Safe and effective subcutaneous adipolysis in minipigs by a collagenase derivative // PLoS ONE. 2019. 14(12) 202-227.
103. Chen H., McGowan E.M., Ren N. et al. Nattokinase: A promising alternative in prevention and treatment of cardiovascular diseases. // Biomark. Insights 2018. 13. doi.org/10.1177/1177271918785130.
104. Cissell D.D., Link J.M., Hu J.C., Athanasiou K.A. A Modified Hydroxyproline Assay Based on Hydrochloric Acid in Ehrlich's Solution Accurately Measures Tissue Collagen Content // Tissue Eng. Part C Methods. 2017. 23. 243–250.
105. Cocci A., Ralph D., Djinovic R. et al. Surgical outcomes after collagenase Clostridium histolyticum failure in patients with Peyronie's disease in a multicenter clinical study. // Sci Rep. 2021. 11(1). 166.
106. Contesini F. J., Melo R. R., Sato H. H. An overview of Bacillus proteases: from production to application // Critical reviews in biotechnology. 2018. 38(3). 321-334.
107. Corder R.D., Gadi S.V., Vachieri R.B. et al. Using rheology to quantify the effects of localized collagenase treatments on uterine fibroid digestion // Acta Biomater. 2021. 134. 443-452.
108. Corso C. R., Almeida E. J. R., Santos G. C. et al. Bioremediation of direct dyes in simulated textile effluents by a paramorphogenic form of *Aspergillus oryzae* // Water Sci. Technol. 2012. 65. 1490-1495.
109. Da Silva R. R. et al. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium* // Food chemistry. 2017. 225. 45-54.
110. Da Silva R. R. et al. Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei* // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2016. 43(8). 1059-1069.

111. da Silva R.R., de Freitas C.T.P., Rodrigues A., Cabral H. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013. 44(1). 235-243.
112. Daboor S.M., Budge S.M., Ghaly A.E. et al. Isolation and activation of collagenase from fish processing waste // *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2012. 3(1). 191-203.
113. Daboor S.M., Budge S.M., Ghaly A.E., et al, Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. // *Am. J. Biochem. Biotech.* 2010. 6(4). 239–263.
114. Daneault A., Coxam V., Wittrant Y. et al Biological effect of hydrolyzed collagen on bone metabolism // *Food Sci. Nutr.* 2015. 57(9) 1922-1937.
115. Das A., Datta S., Roche E., et al, Mechanisms of Collagenase Santyl Ointment (CSO) in wound macrophage polarization and resolution of wound inflammation. // *Scientific Rep.* 2018. 8(1). 1696.
116. de Albuquerque Wanderley M.C., Neto J.M.WD., de Lima Filho J.L. et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review // *Brazilian j Microbiology*. 2017. 48. 13–24.
117. de la Fuente M., Lombardero L., Gómez-González A., et al. Enzyme Therapy: Current Challenges and Future Perspectives. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. 22. 9181.
118. de Siqueira A.C.R., da Rosa N.G., Motta C.M.S., Cabral H. Peptidase with keratinolytic activity secreted by *Aspergillus terreus* during solid-state fermentation // *Braz Arch Biol Technol.* 2014. 57(4). 514–522.
119. Demain A., Vaishnav P. Production of Recombinant Enzymes. // *Reference Module in Food Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; ISBN 9780081005965.

120. Ding J.F., Li Y.Y., Xu J.J. et al. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation // *Food Hydrocoll.* 2011. 25(5). 1350-1353.
121. Dos Santos Aguilar J. G., Sato H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates // *Food Research International.* 2018. 103. 253-262.
122. Downs J.T., Lane C.L., Nestor N.B. et al. Analysis of collagenase-cleavage of type II collagen using a neoepitope ELISA // *J. Immunol. Methods* 2001. 247(1). 25–34.
123. Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C. Bacterial collagenases—a review // *Critical Reviews in Microbiology.* 2016. 42(1). 106-126.
124. Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review // *Crit. Rev. Microbiol.* 2014. 48(1). 13-24.
125. Ducka P., Eckhard U., Schönauer E. et al. A universal strategy for high-yield production of soluble and functional clostridial collagenases in *E. coli* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. 83. 1055-1065.
126. Dudani J.S., Warren A.D., Bhatia S.N. Harnessing protease activity to improve cancer care. // *Annu Rev Cancer Biol.* 2018. 2. 353–376.
127. Dufour A., Sampson N.S., Zucker S., Cao J. Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration // *J Cell Physiol.* 2008. 217(3). 643–651.
128. Eckhard U., Huesgen P.F., Brandstetter H., Overall C.M. Proteomic protease specificity profiling of clostridial collagenases reveals their intrinsic nature as dedicated degraders of collagen // *J. Proteomics.* 2014. 100(4). 102–114.
129. Eckhard U., Nüss D., Ducka P. et al. Crystallization and preliminary X-ray characterization of the catalytic domain of collagenase G from *Clostridium histolyticum* // *Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2008. 64. 419-421.

130. Eckhard U., Schönauer E., Brandstetter H. Structural basis for activity regulation and substrate preference of clostridial collagenases G, H, and T // *J. Biol. Chem.* 2013. 288(20). 184–194.
131. Eckhard U., Schönauer E., Ducka P. et al. Biochemical characterization of the catalytic domains of three different clostridial collagenases // *Biol. Chem.* 2009. 390. 11-18.
132. Eckhard U., Schönauer E., Nüss D., Brandstetter H. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. 18. 1109-1114.
133. El-Gendy M. M. A. A., Al-Zahrani S. H. M., El-Bondkly A. M. A. Construction of potent recombinant strain through intergeneric protoplast fusion in endophytic fungi for anticancerous enzymes production using rice straw // *Applied biochemistry and biotechnology.* 2017. 183. 30-50.
134. Elizabeth K., Yanling F., Wang L.K. et al. Deficiency of MMP1a (Matrix Metalloprotease 1a) Collagenase Suppresses Development of Atherosclerosis in Mice Translational Implications for Human Coronary Artery Disease // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021. 41(5). 265-279.
135. Emadi F., Amini A., Gholami A. et al. Functionalized Graphene Oxide with Chitosan for Protein Nanocarriers to Protect against Enzymatic Cleavage and Retain Collagenase Activity // *Sci Rep* 2017. 7. 42258.
136. Fang M.; Yuan J.; Peng C.; Li Y. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. // *Tumor Biol.* 2014. 35. 2871–2882.
137. Ferreira C.M.O., Correia P.C., Brandao-Costa R.M.P. et al. Collagenase produced from *Aspergillus* sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue. // *Biomed. Chromatogr.* 2017. 31(5). 3882.
138. Fields G.B. Interstitial collagen catabolism. // *J. Biol. Chem.* 2013. 288 (13). 8785-93.
139. Fischer S., Diehm Y., Henzler T., et al. Long-Term Effects of the Collagenase of the Bacterium *Clostridium histolyticum* for the Treatment

- of Capsular Fibrosis After Silicone Implants. // *Aesthetic Plast Surg.* 2017. 41(1). 211-220.
140. Fischer T., Senn N., Riedl R. Design and Structural Evolution of Matrix Metalloproteinase Inhibitors // *Chemistry.* 2019. 25(34). 7960–7980.
141. Funeng X., Xuehui H., Yi W., Shaobing Z. Collagenase-Modified Nanoscavenger for Increasing Penetration and Retention of Nanomedicine in Deep Tumor Tissue // *Adv Mater.* 2020. 32(16). 1-11.
142. Gabrielson A.T., Spitz J.T., Hellstrom W.J.G. Collagenase *Clostridium Histolyticum* in the Treatment of Urologic Disease: Current and Future Impact. // *Sex Med Rev.* 2018. 6(1). 143-156.
143. García O.D., Villarejo C.P., Barambio J. et al. Intraperitoneal collagenase as a novel therapeutic approach in an experimental model of colorectal peritoneal carcinomatosis. // *Sci Rep.* 2021. 11(1). 503.
144. Garica J.K., Mennan C., Richardson J., Wright K. et al. Cells isolated from fat pad and synovial fluid, are they suitable for cartilage repair // *Osteoarthr Cartil* 2014. 22. 445.
145. Ghamari, M., Hosseinaveh, V., Darvishzadeh, A., Talebi, K., Biochemical characterisation of the tissue degrading enzyme, collagenase, in the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Hemiptera: pentatomidae) // *J. Plant Prot. Res.* 2014. 54. 164–170.
146. Gimenes N. C., Silveira E., Tambourgi E. B. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications // *Separation & Purification Reviews.* 2021. 50(3). 223-243.
147. Gomes M.T.R, Oliva M.L., Lopes M.T.P., Salas, C.E., Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2011. 12. 417–436.
148. Gopalakrishnan L., Appakalai N.B., Subhashree V., Human pancreatic tissue dissociation enzymes for islet isolation: Advances and clinical

- perspectives, *Diabetes & Metabolic Syndrome // Clinical Research & Reviews* 2020. 14. 159-166.
149. Guleria S, Walia A, Chauhan A, Shirkot CK (2016b) Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. // *Int J Food Microbiol* 2016. 232. 134–143.
150. Guleria S. et al. Immobilization of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 and its alkaline protease in various matrices for effective hydrolysis of casein // *3 Biotech*. 2016. 6. 1-12.
151. Guleria S., Walia A., Chauhan A., Shirkot C.K., Genotypic and phenotypic diversity analysis of alkalophilic proteolytic *Bacillus* sp. associated with rhizosphere of apple trees in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. // *Proc Natl Acad Sci India B Biol Sci*. 2014. 86(2). 331–341.
152. Gulevsky A. K. Shcheniavsky I.I. Collagen: structure, metabolism, production and industrial application. // *Biotechnologia Acta*. 2020. 13(5) 42-61.
153. Guo L., Harnedy P.A., O’Keeffe M.B. et al. Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides // *Food Chem*. 2015. 173. 536-542.
154. Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., Muthusamy, S. A systematic reconsideration on proteases. // *Int. J. Biol. Macromol*. 2019. 128. 254-267.
155. Ha M., Bekhit A.E.D., Carne A. et al Characterisation of kiwifruit and asparagus enzyme extracts, and their activities toward meat proteins // *Food Chem.*, 2013. 136(2). 989-998.
156. Haddar A., Agrebi R., Bougatef A. et al. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive // *Bioresour Technol*. 2009. 100(13). 3366–3373.

157. Hadler-Olsen E., Fadnes B., Sylte I. et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease // FEBS J 2011. 278(1). 28–45.
158. Hamza T. A. Bacterial protease enzyme: safe and good alternative for industrial and commercial use // Int J Chem Biomol Sci. 2017. 3(1). 1-10.
159. Han G., Ceilley R. Chronic Wound Healing. A Review. of Current Management and Treatments. // Advances in therapy/ 2017. 34. 599-610.
160. Haq, F.; Ahmed, N.; Qasim, M. Comparative genomic analysis of collagen gene diversity. // 3 Biotech. 2019. 9. 1-9.
161. Harvey L.A., Katalinic O.M., Herbert R.D. et al. Stretch for the treatment and prevention of contractures. // Cochrane Database Syst Rev. 1996 2017(2).
162. Honkanen R. The Research Foundation for the State University of New York, assignee. Use of collagenase to treat glaucoma. // United States patent US20150273028 A1. 2015 Oct 1.
163. Hopkins D.L., Allingham P.G. Interrelationship between measures of collagen, compression, shear force and tenderness // Meat Sci. 2013. 95. 219-223.
164. Hopkins D.L., Lamb T.A., Kerr M.J. et al. The interrelationship between sensory tenderness and shear force measured by the G2 Tenderometer and a Lloyd texture analyser fitted with a Warner–Bratzler head // Meat Sci., 2013, 93(4), 838-842.
165. Hoppe I.J., Brandstetter H., Schönauer E., Biochemical characterization of a collagenase from *Bacillus cereus* strain Q1 // Sci. Rep. 2021. 11(1). 1–15.
166. Hu Y., Dan W., Xiong S. et al. Development of collagen/polydopamine complexed matrix as mechanically enhanced and highly biocompatible semi-natural tissue engineering scaffold. // Acta Biomater. 2017. 47. 135–148.

167. Huang Y.M., Lin Y.C., Chen C.Y. et al. Thermosensitive Chitosan–Gelatin–Glycerol Phosphate Hydrogels as Collagenase Carrier for Tendon–Bone Healing in a Rabbit Model // *Polymers*. 2020. 12(436). 1-15.
168. Huang Y.M., Lin Y.C., Chen C.Y. et al. Thermosensitive Chitosan–Gelatin–Glycerol Phosphate Hydrogels as Collagenase Carrier for Tendon–Bone Healing in a Rabbit Model // *Polymers*. 2020. 12(2). 436-444.
169. Ida E. L., Silva R. R., de Oliveira T. B. et al. Biochemical properties and evaluation of washing performance in commercial detergent compatibility of two collagenolytic serine peptidases secreted by *Aspergillus fischeri* and *Penicillium citrinum* // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2016. 47(3). 282-290.
170. Janwitthayanan W., Keelawat S., Payungporn S. et al. In vivo gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase // *Microbiol. Res*. 2013. 168. 268-272.
171. Jawahar A.P., Narayanan S., Loganathan G. et al. Ductal cell reprogramming to insulin-producing beta-like cells as a potential beta cell replacement source for chronic pancreatitis // *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019. 14(1). 65-74.
172. Jhample S.B., Bhagwat P.K., Dandge P.B., Statistical media optimization for enhanced production of fibrinolytic enzyme from newly isolated *Proteus penneri* SP-20 // *Biocat Agri. Biotechnology*. 2015. 4(3). 370–379.
173. Jo S., Kim S., Shin D.H., Kim M.-S. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by favonoids. // *J Enz Inhib Med Chem*. 2020. 35 (1). 145–151.
174. Jomha N.M., Adesida A.B., Bornes T.D., Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. // *Arthritis Res Ther*. 2014. 16. 432-451.

175. Kalaikumari S. S. et al. Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry // *Journal of cleaner production*. 2019. 208. 44-53.
176. Kanagaraj J., Senthilvelan T., Panda R.C., Kavitha S. Eco-friendly waste management strategies for greener environment towards sustainable development in leather industry: a comprehensive review // *J. Clean. Prod.* 2015. 89(15). 1-17.
177. Kanth S. V., Venba R., Madhan B. et al. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing // *Dyes Pigments*. 2008. 76(2). 338-347.
178. Kany A.M., Sikandar A., Hauptenthal J. et al. Binding Mode Characterization and Early in Vivo Evaluation of Fragment-Like Thiols as Inhibitors of the Virulence Factor LasB from *Pseudomonas aeruginosa* // *ACS Infect. Dis.* 2018. 4. 988–997.
179. Karabancheva-Christova T.G., Christov C.Z., Fields G.B., Collagenolytic matrix metalloproteinase structure–function relationships: insights from molecular dynamics studies // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2017. 109(1). 1-24.
180. Kaya S.G., Surer S.I., Akdogan C.G. et al. Roles of matrix metalloproteinases in the cornea: A special focus on macular corneal dystrophy // *Medicine in Drug Discovery*. 2021. 11. 100095.
181. Kemp C.M., Sensky P.L., Bardsley R.G. et al. Tenderness—An enzymatic view. // *Meat Sci.* 2010. 84(2). 248-256.
182. Khandelwal H.B., More S.V., Kalal K.M., Laxman R.S. Eco-friendly enzymatic dehairing of skins and hides by *C. breffeldianus* protease // *Clean Technol and Environ Policy*. 2015. 17. 393-405.
183. Khanzada Z. T. Phosphorus removal from landfill leachate by microalgae // *Biotechnology reports*. 2020. 25. e00419.

184. Kim, M., Hamilton, S.E., Guddat, L.W., Overall, C.M., Plant collagenase: unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. *Biochim Biophys. Acta* 2007. 1770. 1627–1635.
185. Konstantinović J., Yahiaoui S., Alhayek A. et al. N-Aryl-3-mercaptosuccinimides as Antivirulence Agents Targeting *Pseudomonas aeruginosa* Elastase and *Clostridium* Collagenases // *J. Med. Chem.* 2020. 63(15). 8359–8368.
186. Kumar L., Jain S.K. Proteases: a beneficial degradative enzyme in therapeutic applications. // *Inter J Sci Res Biol Sci.* 2018. 5(4). 114–118.
187. Kushkevych I., Kováčková A., Dordevic D., Jonah Gaine Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in the Environment: Cryopreservation Techniques and Their Potential Storage Application // *Processes.* 2021. 9(10). 1843-1864.
188. Lafarga T., Hayes M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients // *Meat Sci.* 2014. №98. 227-239.
189. Lafarga T., O'Connor P., Hayes M. Identification of novel dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from meat proteins using in silico analysis // *Peptides.* 2014. 59(1). 53-62.
190. Laronha H., Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases // *Cells.* 2020. 9(1076). 1-18.
191. Lassoued I., Mora L., Nasri R. et al. Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates // *J. Funct. Foods.* 2015. 13. 225-238.
192. Lassoued L., Mora L., Barkia A. et al. Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* // *J. Proteomics.* 2015. 128(1). 8-17.

193. Lee Y.P., Takahashi T. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin // *Anal. Biochem.* 1996. 14(1). 71-77.
194. Lehrman J. D., Miceli A. L.L., Tabchi S. G., Kaplan M. A. The Effects of Collagenase *Clostridium histolyticum* on Plantar Fibromatosis. // *J Foot Ankle Surg.* 2019. 58(6). 1281-1284.
195. Lenders M., Brand E. Effects of enzyme replacement therapy and antidrug antibodies in patients with Fabry disease // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2018. 29(9). 2265–2278.
196. León-López A., Morales-Peñaloza A., Martínez-Juárez V.M. et al. Collagen Hydrolysate - sources and applications // *Molecules* 2019. 24. 4031-4047.
197. Li K, Tay F.R., Yiu C.K.Y. The past present and future perspectives of matrix metalloproteinase inhibitors // *Pharmacol Ther.* 2020. 207. 107465.
198. Li L., Kim J.H., Jo Y.J. et al. Effect of porcine collagen peptides on the rheological and sensory properties of Ice Cream. // *Korean J. Food Sci. Res.* 2015. 35(1). 156–163.
199. Li Z. J., Kim S.M., The Application of the Starfish Hatching Enzyme for the Improvement of Scar and Keloid Based on the Fibroblast Populated Collagen Lattice // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2014. 173(4). 989–1002.
200. Li Z., Ni W.F., Gu S.M., Wang J. Combination use of ozone and collagenase for the treatment of prolapsed lumbar intervertebral disc herniation. // *J Int Radiol.* 2012. 21(3). 246-258.
201. Lima C.A., Campos, J.F., Lima Filho J.L. et al. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase // *J. Food Sci. Technol.* 2015. 52. 4459-4466.

202. Lima C.A., Filho J.L.L., Neto B.B. et al. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: a factorial study // *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2011. 16(3). 549–560.
203. Lima C.A., Junior A.C.F., Lima Filho J.L. et al. Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: application to collagen hydrolysis. // *Biochem. Eng. J.* 2013. 75. 64–71.
204. Lima C.A., Rodrigues P.M., Porto T.S. et al. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM3622. // *Biochem. Eng. J.* 2009. 43. 315–320.
205. Lima C.A., Viana Marques D.A., Neto B.B. et al. Fermentation medium for collagenase production by *Penicillium aurantiogriseum* URM4622. *Biotechnol. Prog.* 2011. 27. 1470–1477.
206. Limkar M. B., Pawar S. V., Rathod V. K. Statistical optimization of xylanase and alkaline protease co-production by *Bacillus* spp using Box-Behnken Design under submerged fermentation using wheat bran as a substrate // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2019. 17. 455-464.
207. Limmer E. E., Glass D.A., A Review of Current Keloid Management: Mainstay Monotherapies and Emerging Approaches. // *Dermatology and Therapy.* 2020. 10. 931–948.
208. Liu L., Ma M., Cai Z. et al. Purification and properties of a collagenolytic protease produced by *Bacillus cereus* MBL13 strain. // *Food Technol. Biotechnol.* 2010. 48. 151–160.
209. Liu L., Meng Y., Dai X., Chen K. Isolation of A Novel Collagenase-producing Strain from Animal Bone Wastes and Optimization of Its Enzyme Production. // *Chiang Mai J. Sci.* 2019. 46(2). 219-235.
210. Loganathan G., Balamurugan A.N., Venugopal S. Human pancreatic tissue dissociation enzymes for islet isolation: Advances and clinical

- perspectives // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2020. 14. 159-166.
211. Loganathan G., Subhashree V., Narayanan S. et al. Improved recovery of human islets from young donor pancreases utilizing increased protease dose to collagenase for digesting peri-islet extracellular matrix. // *Am J Transplant*. 2019. 19(3). 831-843.
212. Lopes B.G.B., Santos L.S.D., Bezerra C.D.C.F., et al. A 25-kDa serine peptidase with keratinolytic activity secreted by *Coccidioides immitis* // *Mycopathologia*. 2008. 166(1). 35–40.
213. Luchian I., Goriuc A., Sandu D. et al. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant Pathological Processes // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. 23(3). 1806.
214. Luciana D.V., Boniotti M.B., Budroni M., Buzzini P. Preservation, Characterization and Exploitation of Microbial Biodiversity: The Perspective of the Italian Network of Culture Collections // *Microorganisms*. 2019. 7(12). 685-704.
215. Luo J., Zhanga Z., Zengb Y. Co-encapsulation of collagenase type I and silibinin in chondroitin sulfate coated multilayered nanoparticles for targeted treatment of liver fibrosis. // *Carbohydrate Polymers* 2021. 263(1). 117964
216. Lupu M-A., Pircalabioru G.G., Chifiriuc M-C. et al. Beneficial effects of food supplements based on hydrolyzed collagen for skin care (Review). // *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019. 12(1). 12-17.
217. Madzharova E., Kastl P., Sabino F. Post-translational modification-dependent activity of matrix metalloproteinases // *Int J Mol Sci* 2019. 20(12). 1–18.
218. Mahmoud Y-G., Abu El-Souod S.M., El-Shourbagy S.M., El-Badry A.S.M. Characterisation and inhibition effect of cetrimide on collagenase

- produced by *Aspergillus flavus*, isolated from mycotic ulcers // *Ann Microbiol.* 2007. 57(1). 109–113.
219. Mandl I, Maclennan JD, Howes EL. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. Histolyticum*. // *J Clin Invest.* 1953. 32. 1323-1329.
220. Markaryan I., Morozova H., et al. Purification and Characterization of an Elastolytic Metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and Immunoelectron Microscopic Evidence of Secretion of This Enzyme by the Fungus Invading the Murine Lung // *Infection and Immunity.* 1994. 62(6). 2149-2157.
221. Masuzaki R, Kanda T., Sasaki R. et al. Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis: Current and Future Clinical and Molecular Perspectives. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. 21(14). 4906.
222. Matkawala F. et al. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications // *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2021. 37. 1-12.
223. McCallon S.K., Weir D., Lantis J.C., Optimizing wound bed preparation with collagenase enzymatic debridement. // *J. Am. Coll. Clin. Wound Spec.* 2014. 6(1). 14–23.
224. Moreira C.D., Carvalho S.M., Mansur H.S., Pereira M.M. Thermogelling chitosan–collagen–bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. // *Mater. Sci. Eng C.* 2016. 58. 1207–1216.
225. Morikawa D., Muench L.N., Baldino J.B. et al. Comparison of preparation techniques for isolating subacromial bursa-derived cells as a potential augment for rotator cuff repair. // *The Journal of Arthroscopic & Related Surgery.* 2020. 36(1). 80-85.
226. Mottahedi M., Han H.C. Artery buckling analysis using a two-layered wall model with collagen dispersion. // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2016. 60. 515–524.

227. Muiznieks L.D., Keeley F.W. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. // *Biochim. Et Biophys. Acta (Bba)*. 2013. 28(2). 231–372.
228. Murphy G., Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. // *Mol Aspects Med*. 2008. 29(5). 290–308.
229. Nakahara K., Haga-Tsujimura M., Sawada K. et al. Effects of collagen membrane application and cortical bone perforation on de novo bone formation in periosteal distraction: an experimental study in a rabbit calvaria. // *Surg oral Med oral Pathol. Oral. Radiol*. 2017. 12(1). 173–182.
230. Nakchum L., Kim S.M. Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent // *Prep. Biochem. Biotechnol*. 2016. 46 (2). 123-130.
231. Narayanan S., Loganathan G., Dhanasekaran M. et al. Intra-islet endothelial cell and beta-cell crosstalk: implication for islet cell transplantation. // *World J Transplant*. 2017. 7(2). 117-128.
232. Naveed M. et al. Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review // *Catalysis Letters*. 2021. 151. 307-323.
233. Neil S., Sadick M.D., Mitchel P. et al. Collagenase *Clostridium Histolyticum* for the Treatment of Edematous Fibrosclerotic Panniculopathy (Cellulite): A Randomized Trial // *Dermatol Surg*. 2019. 45(8). 1047–1056.
234. Nezafat N., Negahdaripour M., Gholami A., Younes G. Computational analysis of collagenase from different *Vibrio*, *Clostridium* and *Bacillus* strains to find new enzyme sources // *Trends Pharm. Sci*. 2015. 1(4). 213–222.
235. Ohbayashi N., Matsumoto T., Shima H. et al. Solution Structure of Clostridial Collagenase H and Its Calcium-Dependent Global Conformation Change // *Biophys. J*. 2013. 104(7). 1538-1545.

236. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M. et al. Enhancement of the Structural Stability of Full-Length Clostridial Collagenase by Calcium Ions // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. 78(16). 5839-5844.
237. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G. et al. Vermiculite as a new carrier for extracellular protease production by *Aspergillus spp.* under solid-state fermentation. // *Biotechnology Reports.* 2021. 29. e00576.
238. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G. et al. Fibrinolytic and Collagenolytic Activity of Extracellular Proteinases of the Strains of Micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1. // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 2016. 71 (1). 62–66.
239. Pal G.K., Nidheesh T., Suresh P.T., Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) // *Food Res. Int.* 2015. 76. 804-812.
240. Pal G.K., Suresh P.V. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. *RSC Adv.* 2016. 6. 33763–33780
241. Paradowska-Stolarz A, Wieckiewicz M, Owczarek A. et al. Natural Polymers for the Maintenance of Oral Health: Review of Recent Advances and Perspectives. // *Int J Mol Sci.* 2021. 22(19). 10337. doi: 10.3390/ijms221910337.
242. Patel S., Homaei A., El-Seedide H.R., Akhtar N. Cathepsins: proteases that are vital for survival but can also be fatal. // *Biomed Pharmacothe.* 2018. 105. 526–553.
243. Patry J., Virginie Blanchette Enzymatic debridement with collagenase in wounds and ulcers: a systematic review and meta-analysis. // *Int Wound J* 2017. 14(6). 1055-1065.
244. Paul L.E., Bodelier Toward understanding, managing, and protecting microbial ecosystems // *Frontiers in Microbiol.* 2011. 2(1). 80.

245. Pereira W.E.S., da Silva R.R., de Amo G.S. et al. A Collagenolytic Aspartic Protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* Expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* // *Appl Biochem Biotechnol.* 2020. 191(3). 1258–1270.
246. Pham C.H, Collier Z.J., Fang M., et al The role of collagenase ointment in acute burns: a systematic review and meta-analysis. // *Wound Care.* 2019. 28(1) 9–15.
247. Piemonti L., Nano R., Melzi R. et al. Islet autotransplantation: Indication beyond chronic pancreatitis. // In: *Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas.* 2020. 127-137. Academic Press.
248. Popoff M. R. From saprophytic to toxigenic clostridia, a complex evolution based on multiple diverse genetic transfers and/or rearrangements. // *Res. Microbiol.* 2015. 166. 221–224.
249. Prakash O., Nimonkar Y., Yogesh S. Shouche Practice and prospects of microbial preservation / *FEMS Microbiol Lett.* 2013. 339(1). 1–9.
250. Prasad S, Roy I. A Sensitive, Rapid, and Specific Technique for the Detection of Collagenase Using Zymography. // *Methods Mol Biol.* 2017. 1626(1). 115-121.
251. Preet S.K., Azmi W., Cost Effective Production of a Novel Collagenase from a Non-Pathogenic Isolate *Bacillus tequilensis* // *Curr. Biotechnol.*, 2013, 2(1). 17-22.
252. Purcel G.; Meli,ță D.; Andronescu E.; Grumezescu A.M. Collagen-based nanobiomaterials: Challenges in soft tissue engineering. // In: *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering Applications of Nanobiomaterials.* 2016. 173–200. William Andrew Publishing.
253. Putatunda C., Kundu B.S., Bhatia R., Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus* sp. HD292. *Proc Natl Acad Sci India B Biol Sci* 2019. 89. 957–965.

254. Queiroz Brito Cunha C.C., Gama A.R., Cintra L.C. et al. Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant xylanase produced by *Pichia pastoris* // PLoS One. 2018. 13(2). 1–14.
255. Rabert C., Weinacker D., Pessoa A., Farias Jr. Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system // Braz. J. Microbiol. 2013. 44(2). 351–356.
256. Radadiya A., Zhu W., Coricello A. et al. Improving the treatment of acute lymphoblastic leukemia. // Biochemistry 2020. 59. 3193–3200.
257. Ran L.Y., Su H.N., Zhou M.Y. et al. Characterization of a novel subtilisin-like protease myroicolsin from deep-sea bacterium *Myroides profundus* D25 and molecular insight into its collagenolytic mechanism // J Biol Chem. 2014. 289(9). 6041–6053.
258. Raskovic, B., Bozovic, O., Prodanovic, R., Niketic, V., Polovic, N., Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex. // J. Biosci. Bioeng. 2014. 118. 622–627.
259. Rawlings N. D. et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database // Nucleic acids research. 2018. 46(1). 624–632.
260. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database. // Nucleic Acids Res. 2016. 38. 227–233.
261. Razzaq A., Shamsi S., Ali A. et al. Microbial proteases applications. // Front Bioeng Biotechnol 2019. 7. 110.
262. Reddy L.V.A., Wee Y.J., Yun J.S., Ryu H.W. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches // Bioresour Technol. 2008. 99(7). 2242–2249.

263. Rivier F., Meyer P., Walther-Louvie U. et al. Congenital muscular dystrophies: classification and diagnostic strategy. // *Neuromuscular Diseases*. 2014 №1. 6-20.
264. Rodriguez E. L., Poddar S., Iftekhar S. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. // *J. Chromatogr.* 2020. B. 1157(10). 122332.
265. Rosso B.U., Lima C.D.A., Porto T.S. et al. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly (ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system // *Fluid Phase Equilib.* 2012. 335. 20–25.
266. Ryan K., Flannigan M. D., Microdissection testicular sperm extraction: preoperative patient optimization, surgical technique, and tissue processing. // *Fertility and Sterility*. 2019. 111(3). 420-426.
267. Sahay H. et al. Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes // *3 Biotech*. 2017. 7. 1-11.
268. Sai-Ut S., Benjakul S., Sumpavapol P., Kishimura J. Antioxidant Activity of Gelatin Hydrolysate Produced from Fish Skin Gelatin Using Extracellular Protease from *Bacillus amyloliquefaciens* H11 // *J. Food Process. Preserv.* 2015. 39(4). 394-403.
269. Sakurai Y., Inoue H., Nishii H. et al. Purification and Characterization of a Major Collagenase from *Streptomyces parvulus* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009. 73(1). 21-28.
270. Salehi S. H., Momeni M., Vahdani M., et al. Clinical Value of Debriding Enzymes as an Adjunct to Standard Early Surgical Excision in Human Burns: A Systematic Review. // *Journal of Burn Care & Research*. 2020. 4(6). 1224–1230.
271. Salma S.S., Abdel-Halim M., Ali M.E. et al. Collagenase loaded chitosan nanoparticles for digestion of the collagenous scar in liver fibrosis: The effect of chitosan intrinsic collagen binding on the success

- of targeting. // *Europ J Pharmaceutics Biopharmaceutics* 2020. 148(1). 54-66.
272. Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. Comparative evaluation of neural protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation // *Process Biochem.* 2005. 40(8). 2689–2694.
273. Sanjuan-Cervero R, Carrera-Hueso FJ, Vaquero-Perez M, Montaner-Alonso D. Recurrent Dupuytren's disease after fasciectomy and collagenase injection are histologically indistinguishable. // *J Hand Surg Eur.* 2020. 45(5). 508-512.
274. Sanjuan-Cervero R. Current role of the collagenase *Clostridium histolyticum* in Dupuytren's disease treatment. // *Ir J Med Sci.* 2020. 189(2). 529-534.
275. Santra M., Luthra-Guptasarma M. Assaying Collagenase Activity by Specific Labeling of Freshly Generated N-Termini with Fluorescamine at Mildly Acidic pH // *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2020. 26(2). 775–781.
276. Saran S., Mahajan R.V., Kaushik R. J. et al. Enzyme mediated beam house operations of leather industry: a needed step towards greener technology // *J. Clean. Prod.* 2013. 54. 315-322.
277. Schlapp M., Friess W. Collagen/PLGA Microparticle Composites for Local Controlled Delivery of Gentamicin // *J. Pharm. Sci.* 2003. 92(11). 2145-2151.
278. Schönauer E., Kany A.M., Hauptenthal J. et al. Discovery of a Potent Inhibitor Class with High Selectivity toward Clostridial Collagenases // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. 139(36). 12696–12703.
279. Seif F., Kheirollah A., Efficient isolation and identification of primary endothelial cells from bovine aorta by collagenase P // *Immunopathol Persa.* 2020. 6(2). 15.
280. Senko O., Stepanov N., Maslova O., Efremenko E. “Nature-like” Cryoimmobilization of Phototrophic Microorganisms: New

- Opportunities for Their Long-Term Storage and Sustainable Use // Sustainability. 2022. 14(2). 661-677.
281. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A. et al. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // Microbiology. 2015. 84(3). 359–364.
282. Sharma K. M. et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2017. 15(1). 115-126.
283. Silva R.R., Souto T.B., Oliveira T.B. et al. Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei* // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2016. 43(8). 1059–1069.
284. Sionkowska A., Adamiak K., Katarzyna Musiał K. et al. Collagen Based Materials in Cosmetic Applications:A Review // Materials. 2020. 13. 4217-32.
285. Sîrbu T. Long term storage of micromycetes strains // Studii și comunicări. 2017. 26(1). 7-12.
286. Sivasubramanian S., Manohar B. M., Rajaram A. et al. Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease // Chemosphere. 2008. 70(6). 1015-1024.
287. Soccol R. Scopel Ferreira da Costa E, Junior Letti LA, Grace Karp S, Lorenci Woiciechowski A, Vandenberghe Porto de Souza L // Recent developments and innovations in solid state cultivation. Biotechnol Res Int. 2017. 1. 52-71.
288. Solanki P., Putatunda C., Kumar A., et al. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. // 3 Biotech. 2021. 11(10). 428-453.
289. Soroushanova A., Delgado L.M., Wu Z. et al. The collagen suprafamily: From biosynthesis to advanced biomaterial development. // Adv. Mater. 2019. 31(1). 1801651.

290. Souza K.P.S., Cunha M.N.C., Batista J.M.S., Oliveira V.M. et al. A novel collagenolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262: Comparative analysis of production and extraction in submerged and stated-solid fermentation. // *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2022. 94(4). 1-14.
291. Stielow J.B., Vaas L.A., Goker M. et al. Charcoal filter paper improves the viability of cryopreserved filamentous ectomycorrhizal and saprotrophic Basidiomycota and Ascomycota. // *Mycologia.* 2012. 104(1). 324–330.
292. Sun X., Yao L., Fu C. Detection of target collagen peptides with single amino acid mutation using two fluorescent peptide probes // *J. Mater. Chem. B.* 2019. 7(48). 7676–7682.
293. Suphatharaprteep W., Cheirsilp B., Jongjareonrak A., Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. *N. Biotechnol.* 2011. 28. 649–655.
294. Suresh P.V., Nidheesh T., Pal G.K. Enzymes in seafood processing. // *Enzymes in food and beverage processing.* 2015. 354-377.
295. Tanaka K., Okitsu T., Teramura N. et al, Recombinant collagenase from *Grimontia hollisae* as a tissue dissociation enzyme for isolating primary cells // *Sci Rep.* 2020. 10(1). 1-14.
296. Tandon S., Sharma A., Singh S. et al. Therapeutic enzymes: Discoveries, production and applications // *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2021. 63. 102455-72.
297. Tavano O. L., Berenguer Murcia A., Secundo F., Biotechnological applications of proteases in food technology. // *Comprehensive reviews in food science and food safety.* 2018. 17(2). 412-436.
298. Teramura N., Tanaka K., Iijima K. et al. Cloning of a Novel Collagenase Gene from the Gram-Negative Bacterium *Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B and Its Efficient Expression in *Brevibacillus choshinensis* // *J. Bacteriol.*, 2011. 193(12). 3049-3056.

299. Tigabu B.M., Agide F.D., Mohraz M., Nikfar S. Atazanavir/ritonavir versus Lopinavir/ritonavir-based combined antiretroviral therapy (cART) for HIV-1 infection: a systematic review and meta-analysis. // *Afr Health Sci.* 2020. 20 (1). 91–101.
300. Tillib S.V., Privezentseva M.E., Ivanova T.I. et al. Single-domain antibody-based ligands for immunoaffinity separation of recombinant human lactoferrin from the goat lactoferrin of transgenic goat milk // *J. Chromatogr. B.* 2014. 949. 48–57.
301. Tohar R. et al. Screening collagenase activity in bacterial lysate for directed enzyme applications // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2021.22(16). 8552.
302. Tsuruoka N., Nakayama T., Ashida M. et al. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. 69. 162–169.
303. Vandenbroucke R.E. Matrix metalloproteinase 13 modulates intestinal epithelial barrier integrity in inflammatory diseases by activating TNF // *EMBO Mol Med.* 2013. 5(7). 1000–1016.
304. Viani F.C., Cazares Viani P.R., Gutierrez Rivera I.N. et al. Actividad proteolítica extracelular y análisis molecular de cepas de *Microsporum canis* aisladas de gatos con y sin sintomatología // *Rev Iberoam Micol.* 2007. 24(1). 19–23.
305. Villamil O., Vaquiro H., Solanilla J.F. Fish viscera protein hydrolysates: production, potential applications and functional and bioactive properties // *Food Chem.* 2017. 224. 160–171.
306. Villegas M. R., Baeza A., Usategui A., Ortiz-Romero P. L. et al. Collagenase nanocapsules: An approach to fibrosis treatment. // *Acta Biomater* 2018 1(74). 430-438.

307. Vo N.V., Hartman R.A., Yurube T. et al. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. // *Spine J.* 2013. 13(3). 331-341.
308. Voltan A.R., Donofrio F., Miranda E.T., Moraes R.A. et al. Induction and secretion of elastinolytic and proteolytic activity in cultures of *Paracoccidioides brasiliensis* // *Rev Ciências Farm Básica e Apl.* 2008. 29(1). 97–106.
309. Wang K., Wang W., Ye R. et al. Mechanical properties and solubility in water of corn starch-collagen composite films: effect of starch type and concentrations. // *Food Chem.* 2017. 216. 209–216.
310. Wang S., Zhao J., Chen L. et al. Preparation, isolation and hypothermia protection activity of antifreeze peptides from shark skin collagen // *LWT-Food Sci. Technol.* 2014. 55(1). 210-217.
311. Wang, Z., Mansukhani, N.A., Emond, Z.M. et al Vascular Endoluminal Atherosclerotic Plaque Debulking Using Enzymatic and Ultrasonic Energy. // *Journal of Surgical Research.* 2019. 233. 335-344.
312. Watanabe K., Collagenolytic proteases from bacteria // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. 63. 520-526.
313. Waycaster C., Carter M. J., Gilligan A. M., et al. Comparative cost and clinical effectiveness of clostridial collagenase ointment for chronic dermal ulcers. // *J. Comp. Eff. Res.* 2018. 7(2). 149–165.
314. Willerson J.T., Armstrong P.W. Coronary heart disease syndromes: pathophysiology and clinical recognition. // In: Willerson JT, Holmes DR Jr, editors. *Coronary artery disease.* London. Springer-Verlag. 2015. 365-407.
315. Wong K., Trudel G. Laneuville Intra-articular collagenase injection increases range of motion in a rat knee flexion contracture model. // *Drug Des Devel Ther.* 2018. 12(1). 15–24.

316. Wu Q., Li C., Li C., et al, Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. 160. 129-139.
317. Xia, Z., Yu, X., Jiang, X. et al Fabrication and characterization of biomimetic collagen–apatite scaffolds with tunable structures for bone tissue engineering. // *Acta Biomater.* 2013. 9. 7308–7319.
318. Xu J, Chen X., Guo X. et al. *Jiaotong Univ // Med. Sci.* 2010. №9. 017.
319. Yahagi K., Davis H.R., Joner M. et al Atherosclerosis, introduction and pathophysiology. In: Jagadeesh G, Balakumar P, Maung U. K, editors. *Pathophysiology and pharmacotherapy of cardiovascular disease. Gewerbestrasse.* // Springer International Publishing. 2015. 527-546.
320. Yamada S., Yamamoto K., Ikeda T. et al. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. // *Bio Med. Res. Int.* 2014. 302932. 1–8.
321. Yasmin H., Kabashima T., Rahman M.S. et al. Amplified and selective assay of collagens by enzymatic and fluorescent reactions // *Sci. Rep.* 2015. 4(1). 1-8.
322. Yu Z., Visse R., Inouye M. et al. Defining Requirements for Collagenase Cleavage in Collagen Type III Using a Bacterial Collagen System // *J. Biol. Chem.* 2012. 287(27). 22988–22997.
323. Zak R., Etlinger S., Fishman D.A. Studies on fraction of skeletal and heart muscle // *Excerpta med. ICS.* 1972. 240(2). 163-175.
324. Zhang D, Zhang Y, Wang Z. et al. Target radiofrequency combined with collagenase chemonucleolysis in the treatment of lumbar intervertebral disc herniation. // *Int J Clin Exp Med* 2015. 8(1). 526-532.
325. Zhang X.X., Li Y., Wang S.Y. et al. Identification of a collagenase produced by *Bacillus cereus* R75E isolated from human colostrum. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. 51. 511–521.

326. Zhang Y., Fu Y., Zhou S. et al. A straightforward ninhydrin-based method for collagenase activity and inhibitor screening of collagenase using spectrophotometry // *Anal. Biochem.* 2013. 437(1). 46-48.
327. Zhang Y.Z., Ran L.Y., Li C.Y. et al. Diversity Structures and Collagen-Degrading Mechanisms of Bacterial Collagenolytic Proteases // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. 81(18). 6098-6107.
328. Zhao G. et al. Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae* // *Food chemistry.* 2019. 271. 606-613.
329. Zhao G.Y., Zhou M. Y., Zhao H.L. et al Tenderization effect of cold-adapted collagenolytic protease MCP-01 on beef meat at low temperature and its mechanism // *Food Chem.* 2012. 134(4). 1738-1744.
330. Ziegelmann M.J., Heslop D., Houlihan M. et al. The Influence of Indentation Deformity on Outcomes With Intralesional Collagenase *Clostridium Histolyticum* Monotherapy for Peyronie's Disease. // *Urology.* 2020. 139. 122-128.
331. Zirk M., Fienitz T., Edel R. et al. Prevention of post-operative bleeding in hemostatic compromised patients using native porcine collagen fleeces—retrospective study of a consecutive case series. // *Oral. Maxillofac. Surg.* 2016. 20. 249–254.
332. Zucker S., Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer // *Cancer Metastasis Rev.* 2004. 23. 101–117.