

## ПОИСК НОВЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕИНАЗ ИЗ БИОКОЛЛЕКЦИИ МИКРОМИЦЕТОВ ФГБНУ ВИЛАР

### З.К. Никитина

д.б.н., профессор, гл. науч. сотрудник,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)  
E-mail: nikitinaz@yandex.ru

### И.К. Гордонова

к.б.н., вед. науч. сотрудник,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)  
E-mail: igordonova777@yandex.ru

### Нгуен Суан Тунг

стажер-исследователь, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Проведено поверхностное культивирование пяти микромицетов из биокolleкции ФГБНУ ВИЛАР на средах с нативным и модифицированным коллагеном. Показано, что наибольшим протеолитическим потенциалом обладают культуры *P. roqueforti* (штамм 42) и *A. mangini* (штамм 30) и *P. martensii* (штамм 47).

**Ключевые слова:** протеиназы, коллаген, микромицеты.

Поиск продуцентов протеиназ представляет несомненный интерес для различных областей жизнедеятельности человека. Протеиназы с различной специфичностью могут использоваться в медицинской практике, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и решении экологических проблем [1, 2]. Ранее авторами были разработаны подходы, позволяющие осуществлять поиск продуцентов протеиназ [3, 4]. Показано, что некоторые микромицеты из коллекции ФГБНУ ВИЛАР обладают коллагенолитической и кератинолитической активностью [5, 6]. Использование при скрининге модифицированных субстратов, обладающих повышенной устойчивостью к протеолизу, является дополнительным критерием при отборе потенциальных продуцентов [7–9].

Цель работы – поиск новых продуцентов протеиназ с использованием модифицированного и немодифицированного коллагена.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культуры *Aspergillus mangini* (штамм 30), *Penicillium martensii* (штамм 47), *Penicillium roqueforti* (штамм 42), *Penicillium steckii* (штамм 43), *Penicillium vitale* (штамм 60) выращивали на скошенной поверхности агаризованной среды Чапека следующего состава (%):  $\text{NaNO}_3$  – 0,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{KCl}$  – 0,05;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{CaCO}_3$  – 0,3; сахароза – 2; агар – 2, pH 6,8 в

течение семи суток в термостате при 26 °С. Для проведения поверхностного культивирования использовали агаризованные среды, содержащие солевой фон среды Чапека с заменой сахарозы на 2% нативного и модифицированного коллагена, полученного так, как это было описано ранее [4]. Протеолитическую способность микроорганизма оценивали по диаметру колоний на соответствующих субстратах после посева микромицета тремя уколами на агаризованную среду. Периодически осуществляли замер диаметра колоний и зон лизиса в двух перпендикулярных направлениях. Активность биосинтеза ферментов оценивали по индексу лизиса субстратов, определяемому соотношением площади лизиса к площади колонии по следующей формуле:

$$I_{\text{лиз}} = R_{\text{лиз}}^2 / R_{\text{кол}}^2,$$

где  $R_{\text{лиз}}$  – радиус зоны лизиса;  $R_{\text{кол}}$  – радиус колонии.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования роста микромицетов при культивировании на различных средах приведены в таблице. Культура *A. mangini* росла значительно медленнее на среде, содержащей модифицированный коллаген, особенно на начальных этапах роста, значительно позднее начали образовываться и зоны лизиса. При этом диаметр зон

лизиса при культивировании на модифицированном субстрате был меньше в 1,5–1,7 раза. Исследования на 10-е сутки на среде с нативным коллагеном не проводились, так как колонии слились. Скорости роста культуры *P. martensii* на средах, содержащих модифицированный и нативный коллаген, отличались примерно в такой же степени, как и в случае первой культуры. На рис. 1 можно видеть значительное превышение размеров колоний и зон лизиса у культуры *P. martensii* при культивировании на нативном субстрате.

Аналогичные закономерности наблюдались и при культивировании *P. steckii* (табл. 1). При этом зоны лизиса на модифицированном субстрате образовывались на сутки позднее, и их размер был меньше зон лизиса на нативном коллагене в 1,2–1,4 раза. Однако необходимо отметить, что размер колоний при росте на обеих средах у этой культу-

ры был наибольшим среди других исследованных дейтеромицетов.

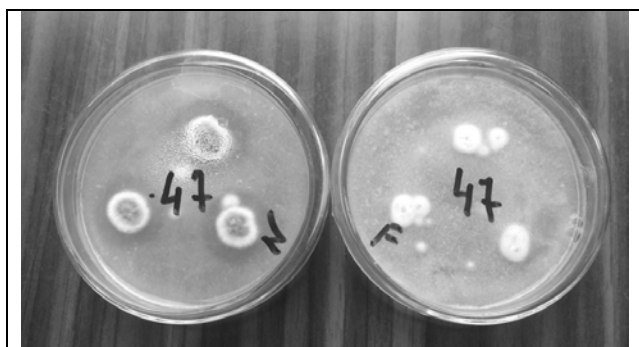
Очень небольшие различия размеров зон лизиса при росте на модифицированных и немодифицированных средах отмечались и при культивировании *P. roqueforti*. В некоторых случаях диаметры зон лизиса на модифицированном коллагене были сравнимы с теми же показателями, что и при росте на нативном (таблица). Кроме того, образование зон лизиса на модифицированной среде начиналось на более ранних сроках (4-е сутки культивирования), чем у всех остальных культур.

Наибольшие различия при росте на указанных субстратах наблюдались у культуры *P. vitale*. Зоны лизиса на модифицированном коллагене отсутствовали на всех этапах культивирования. При этом был значительно замедлен и рост колоний, особенно на начальных этапах (таблица, рис. 2).

**Таблица. Параметры роста культур при поверхностном культивировании на средах, содержащих различные субстраты, мм**

Культура	Субстрат	Время культивирования, сутки											
		3		4		5		6		7		10	
		Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл
<i>A. mangini</i>	кн	11,2	19	14,5	28,5	18	32,3	21,8	40	21,3	55	ин	ин
	км	9,5	0	13,2	0	16,5	20	21,8	25,8	24,5	32,2	30,5	47,3
<i>P. martensii</i>	кн	12,1	20	17,2	27	21,7	36,7	26	41,3	28,2	48,8	30,2	ин
	км	8,7	0	12,7	0	14,8	16,3	20,8	24,7	23,5	32,3	29,7	44,7
<i>P. roqueforti</i>	кн	11	16,7	15,5	27,2	19	34,2	23,8	39,5	25,8	45	30	ин
	км	8,7	0	12,8	14,7	16,7	19,7	20,7	24,3	21,7	29,5	25,2	44
<i>P. steckii</i>	кн	14,8	17,0	19,7	21,3	24,7	31,5	29,8	41	35	45,8	46	67
	км	9,8	0	13,7	0	18,5	0	25,2	27,5	29,2	32,8	38,8	49,3
<i>P. vitale</i>	кн	15,8	16,8	21,2	23,5	25	27,3	27,3	27,3	28,8	28,8	39,2	39,2
	км	2	0	6	0	12,3	0	20	0	23	0	36	0

Примечание: Дк – диаметр колоний; Дл – диаметр зон лизиса; кн – нативный коллаген; км – модифицированный коллаген; ин – исследования не проводились.



**Рис. 1.** Культура *P. martensii* (штамм 47), 4-е сутки культивирования: слева – среда с нативным коллагеном, справа – с модифицированным



**Рис. 2.** Культура *P. vitale* (штамм 60), 3-и сутки культивирования: слева – среда с модифицированным коллагеном, справа – с нативным

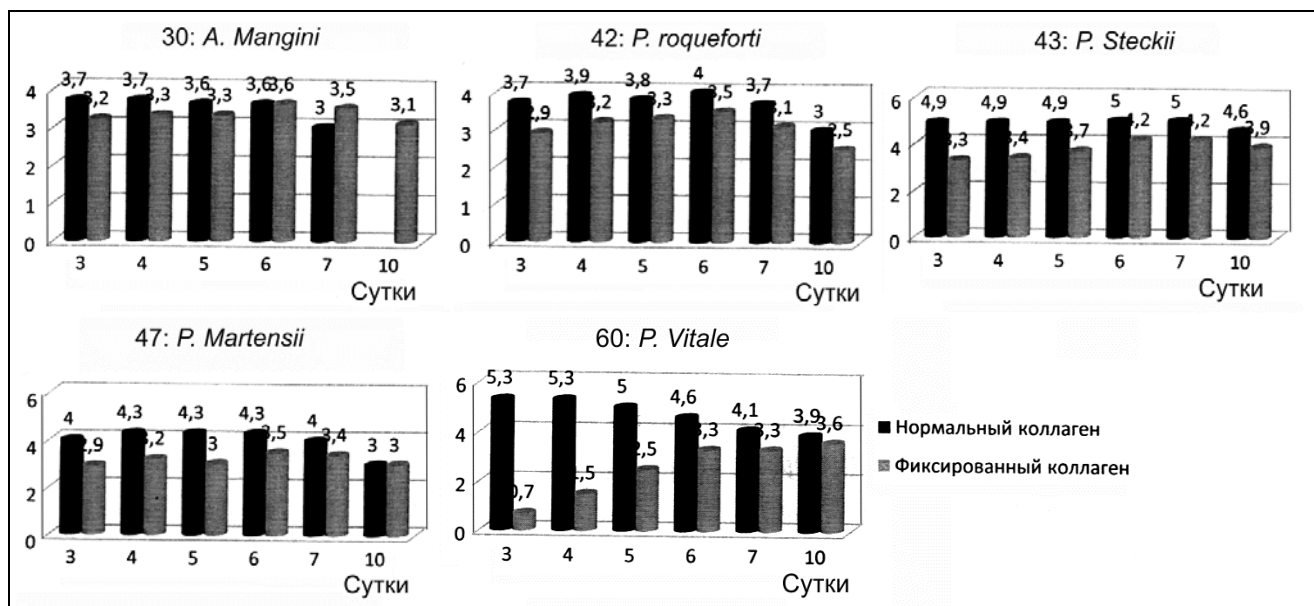


Рис. 3. Скорости роста дейтеромицетов на средах с нативным и модифицированным субстратом

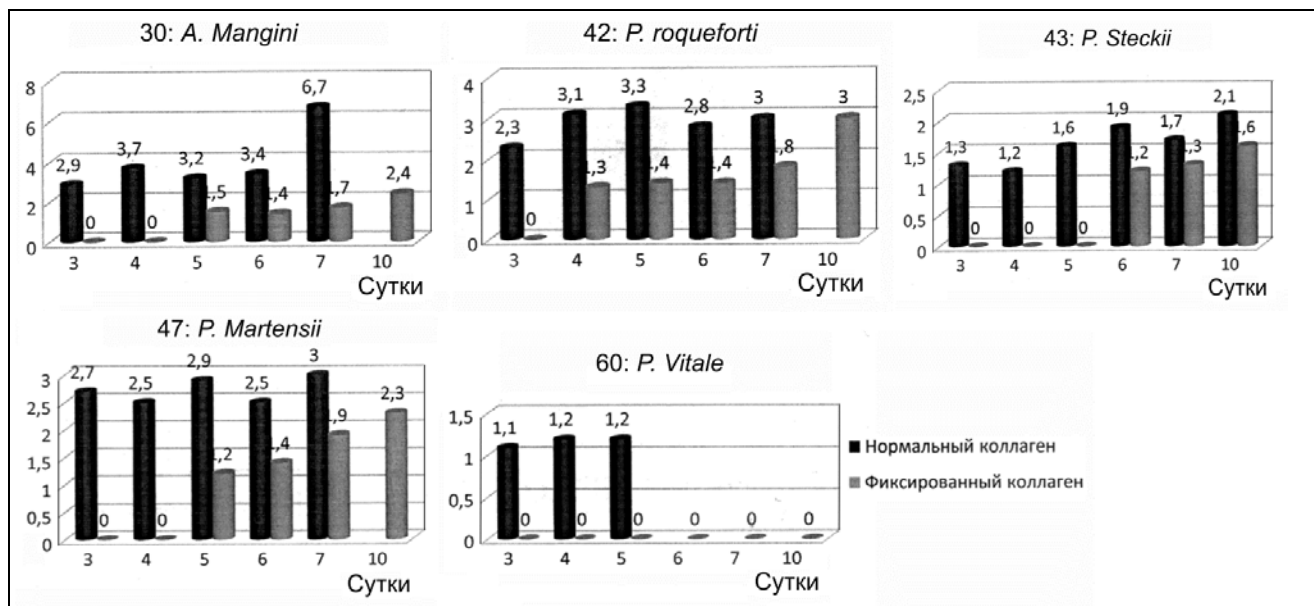


Рис. 4. Индексы лизиса дейтеромицетов на средах с нативным и модифицированными субстратами

Способность к повышению скорости роста в процессе культивирования микроорганизмов на различных субстратах во многом определяет их адаптационный потенциал. В связи с этим было исследовано изменение указанного показателя для пяти видов изучаемых микромицетов (рис. 3). На нативном коллагене максимальные скорости роста отмечались у культур *P. steckii* и *P. vitale* и составляли 5,0 и 5,3 мм/сут соответственно. У всех культур к концу культивирования (7–10-е сутки) наблюдалось снижение скорости роста.

Скорости роста исследованных дейтеромицетов на модифицированном коллагене были меньше на всех этапах культивирования, что свидетельствует о большей устойчивости этого субстрата к протеолизу. Максимальная скорость роста на модифицированном белке регистрировалась у *P. steckii* и была на 16% меньше, чем на нативном коллагене. Необходимо отметить, что в отличие от скоростей роста на нативном субстрате, которые в процессе культивирования менялись незначительно, при использовании модифицированного суб-

страта этот показатель у всех дейтеромицетов постепенно повышался. Наибольшее повышение скорости роста на модифицированном белке наблюдалось у *P. vitale* (в 5,14 раза), что может свидетельствовать о максимальном адаптационном потенциале штамма среди всех исследованных культур.

Индекс лизиса является интегральным показателем, который свидетельствует о способности культуры секретировать протеолитические ферменты, гидролизующие соответствующий субстрат. В процессе проведенного исследования выявлено (см. рис. 4), что у всех микромицетов индексы лизиса были существенно ниже при росте на модифицированном белке и регистрировались на более поздних этапах культивирования. При этом у *P. vitale* отсутствовали видимые зоны лизиса на модифицированном коллагене и были очень небольшими индексы лизиса на нативном, что может быть связано с быстрым ростом колонии (см. таблицу). Максимальный индекс лизиса на нативном коллагене отмечался у *A. mangini* на 7-е сутки культивирования (6,7) и был выше максимального индекса лизиса у других культур в 2,0–5,6 раза. Относительно высокий индекс лизиса отмечался также *P. roqueforti* и *P. martensii*. При росте на модифицированном белке максимальный индекс лизиса зарегистрирован для *P. roqueforti* на 10-е сутки. У *A. mangini* и *P. martensii* указанный показатель был ниже на 20 и 24% соответственно.

## ВЫВОДЫ

1. На всех стадиях развития культур все изученные показатели были ниже при росте на модифицированном коллагене, чем на нативном, что подтверждает большую устойчивость модифицированного белка к протеолитическим ферментам изученных дейтеромицетов.
2. Показана возможность адаптации протеолитических систем у всех дейтеромицетов к использованию в качестве субстрата модифицированного коллагена.
3. Комплексное изучение диаметров колоний, зон лизиса, скоростей роста и индексов лизиса при поверхностном культивировании пяти микромицетов из биокolleкции ФГБНУ ВИЛАР на средах с нативным и модифициро-

ванным коллагеном показало, что наибольшим протеолитическим потенциалом обладают культуры *P. roqueforti* (штамм 42), *A. mangini* (штамм 30) и *P. martensii* (штамм 47). Указанные культуры перспективны для использования в качестве продуцентов протеиназ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Mussallam A.A. A review: potentials for biotechnological application of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources // *Bioresource Technol.* 1998. № 66. P. 1–11.
2. Демина Н.С., Лысенко С.В. Коллагенолитические ферменты, секретируемые микроорганизмами (обзор) // *Микробиология.* 1996. Т. 65. № 3. С. 293–304.
3. Гордонова И.К., Никитина З.К., Зон Х.Ч., Томашевич С.В., Быков В.А. Изучение протеолитических свойств дейтеромицетов при росте на модифицированных и немодифицированных кератинсодержащих субстратах // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2009. № 1. С. 19–24.
4. Яковлева М.Б., Зон Х.Ч., Никитина З.К., Быков В.А. Рост и синтез внеклеточных ферментов некоторыми видами дейтеромицетов, культивируемых на различных белковых субстратах // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2009. № 1. С. 6–10.
5. Сухосырова Е.А., Никитина З.К., Яковлева М.Б., Вещицкова Е.В., Быков В.А. Характеристика коллагенолитических ферментов, секретируемых дейтеромицетом *Aspergillus flavus*. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2003. Т. 35. № 5. С. 526–530.
6. Никитина З.К., Гордонова И.К. Выделение, очистка и биохимические свойства кератинолитического фермента, секретируемого *Penicillium citrinum* // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2013. № 1. С. 36–41.
7. Гордонова И.К., Никитина З.К. Оценка протеолитической активности мицелиальных грибов – потенциальных деструкторов белковых субстратов // *Сб. науч. трудов по итогам Междунар. науч.-практич. конф. «Актуальные вопросы естественных и математических наук в современных условиях развития страны».* СПб. Выпуск III. 2016. С. 56–59.
8. Gordonova I.K., Nikitina Z.K. Search of proteinases secreting deuteromyces // *Materials of the X International research and practice conference «Science, Technology and Higher Education».* Canada. April 28–29 2016. P. 111–118.
9. Никитина З.К., Гордонова И.К. Использование нативных и модифицированных белков кожи при поиске продуцентов протеиназ // *Сб. науч. трудов Междунар. конф. «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине»*, посвященной 85-летию ВИЛАР. 23-25 июня 2016 г. С. 401–405.

Поступила 14 декабря 2016 г.

# THE SEARCH OF NEW PRODUCERS OF PROTEASES FROM FGBNU VILAR MICROMYCETES BIOCOLLECTION

© Authors, 2017

## Z.K. Nikitina

Dr.Sc. (Biol.), Professor, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: nikitinaz@yandex.ru

## I.K. Gordonova

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: igordonova777@yandex.ru

## Nguen Suan Tung

Research Intern, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

The obtaining various biologically active substances using of biotechnological approaches is one of perspective directions of the modern scientific research. In recent years the list of such substances, including the proteases with different substrate specificity was significantly expanded. It should be noted, the different collagenases with their ability to hydrolyze collagen are among these enzymes. These enzymes are promising for use in medicine, cosmetics, various industries and agriculture. Most of the collagenases are produced abroad. The reviewed work is devoted to the search for promising producers of these enzymes, which may further solve the problem of import substitution. All of the above determines the novelty and relevance of the submitted work.

In the present study, the ability of 5 not previously studied types of deuteromycetes from the collection of FGBNU VILAR to hydrolyze different collagen substrates was investigated by a screening method during the surface cultivation. The native collagen and the modified protein, having increased resistance to proteolysis, as an additional factor in the evaluation of proteolytic activity of microorganisms were used.

The possibility of the adaptation of all deuteromycetes proteolytic systems for the modified collagen using as the substrate was shown. A comprehensive study of the diameters of the colonies, zones of lysis, growth rates and indices of lysis of 5 micromycetes from biocollection FGBNU VILAR using native and modified collagen showed the greatest proteolytic potential of culture *P. roqueforti* (42), *A. mangini* (30) and *P. martensii* (47). These cultures are promising for use as the producers of the proteases.

**Key words:** proteases, collagenases, micromycetes.

## References

1. Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Mussallam A.A. A review: potentials for biotechnological application of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources // *Bioresource Technol.* 1998. № 66. P. 1–11.
2. Demina N.S., Lysenko S.V. Kollagenoliticheskie fermenty, sekretiruemye mikroorganizmami (obzor) // *Mikrobiologija.* 1996. T. 65. № 3. S. 293–304.
3. Gordonova I.K., Nikitina Z.K., Zon H.Ch., Tomashevich S.V., Bykov V.A. Izuchenie proteoliticheskikh svojstv deiteromicetov pri roste na modifitsirovannykh i nemodifitsirovannykh keratinsoderzhashchih substratah // *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii.* 2009. № 1. S. 19–24.
4. Jakovleva M.B., Zon H.Ch., Nikitina Z.K., Bykov V.A. Rost i sintez vnekletochnykh fermentov nekotorymi vidami deiteromicetov, kul'tiviruemykh na razlichnykh belkovykh substratah // *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii.* 2009. № 1. S. 6–10.
5. Suhosyrova E.A., Nikitina Z.K., Jakovleva M.B., Veshhikova E.V., Bykov V.A. Harakteristika kollagenoliticheskikh fermentov, sekretiruemykh deiteromicetom *Aspergillus flavus*. // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny.* 2003. T. 35. № 5. S. 526–530.
6. Nikitina Z.K., Gordonova I.K. Vydelenie, ochildka i biohimicheskie svojstva keratinoliticheskogo fermenta, sekretiruемого *Penicillium citrinum* // *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii.* 2013. № 1. S. 36–41.
7. Gordonova I.K., Nikitina Z.K. Ocenka proteoliticheskoy aktivnosti micelial'nykh gribov – potencial'nykh destrukturov belkovykh substratov // *Sb. nauch. trudov po itogam Mezhdunar. nauch.-praktich. konf. «Aktual'nye voprosy estestvennykh i matematicheskikh nauk v sovremennykh uslovijah razvitiya strany».* SPb. Vypusk III. 2016. S. 56–59.
8. Gordonova I.K., Nikitina Z.K. Search of proteinases secreting deuteromyces // *Materials of the X International research and practice conference «Science, Technology and Higher Education».* Canada. April 28–29 2016. P. 111–118.
9. Nikitina Z.K., Gordonova I.K. Ispol'zovanie nativnykh i modifitsirovannykh belkov kozhi pri poiske producentov proteinaz // *Sb. nauch. trudov Mezhdunar. konf. «Biologicheskie osobennosti lekarstvennykh i aromaticeskikh rastenij i ih rol' v medicine».* posvjashhennoj 85-letiju VILAR. 23-25 ijunja 2016 g. S. 401–405.