

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ И МИКРОМИЦЕТОВ

И.К. Гордонова

к.б.н., вед. науч. сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

З.К. Никитина

д.б.н., профессор, гл. науч. сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

E-mail: nikitinaz@yandex.ru

Зон Хы Чол

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

Проведена сравнительная оценка протеолитической активности бактерий и мицелиальных грибов. Все исследованные культуры росли и образовывали зоны лизиса на средах, содержащих различные белки, что свидетельствует о целесообразности их дальнейшего изучения в качестве потенциальных продуцентов протеиназ.

Ключевые слова: микромицеты, бактерии, протеиназы.

Среди самых различных групп микроорганизмов, таких как бактерии, микромицеты, актиномицеты, обнаружены продуценты протеолитических ферментов [1]. Получение этих биологически активных веществ (БАВ) с использованием микроорганизмов имеет ряд преимуществ. Использование современного биотехнологического оборудования обеспечивает неограниченность источников получения ферментов. Возможность управления их образованием за счёт подбора соответствующей питательной среды и условий культивирования позволяет не только увеличивать выход ферментов, но и получать ферментные препараты с определёнными свойствами. Многие микроорганизмы секретируют значительное количество протеолитических биокатализаторов в окружающую среду, что облегчает задачу их выделения и очистки. Методы селекции и генной инженерии увеличивают возможности целенаправленного биосинтеза ферментов. Следует отметить способность микроорганизмов вырабатывать ферменты с уникальной субстратной специфичностью (кератиназы, коллагеназы) [2, 3], которые могут быть использованы в различных областях жизнедеятельности человека, в том числе в медицине.

Ранее авторами была показана возможность секреции протеиназ у некоторых видов мицелиальных грибов [4–6]. При этом для первичного отбора потенциальных продуцентов применялись различные варианты скрининг-методов с введением в агаризованную среду определенных белков, являющихся индукторами выработки ферментов с

соответствующей субстратной специфичностью [7, 8].

Цель исследования – сравнительная оценка протеолитической активности некоторых не изученных ранее видов бактерий и мицелиальных грибов с использованием ранее апробированных подходов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали следующие виды микроорганизмов: бактерии – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10702 (ГКПМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича) и микромицеты – *Aspergillus ruber* FARub-2014, *Penicillium restrictulosum* FPres-2014 (коллекция ФГБНУ ВИЛАР). Бактериальные штаммы выращивали на скошенной поверхности мясо-пептонного агара при 37 и 24 °С, микромицеты – на среде Чапек при 24 °С. Затем проводили посев тремя уколами на агаризованную среду следующего состава (%): NaNO₃ – 0,2; KH₂PO₄ – 0,1; MgSO₄×7H₂O – 0,05; KCl – 0,05; FeSO₄×7H₂O – 0,001; CaCO₃ – 0,3; сахароза – 2; агар-агар – 2, с заменой сахарозы на 2% белковые субстраты: коллаген (Реахим), желатин (Dr. Oetker), кератин волос, полученный по разработанной авторами методике [9], жидкий кератин (Proteina). Протеолитическую активность микроорганизмов оценивали по диаметру колоний на соответствующих субстратах. Диаметр колоний измеряли в двух перпендикулярных направлениях. Кроме того, измеряли диаметр зон лизиса (если они были) и рассчитывали индексы лизиса по ранее предложенной схеме [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные при поверхностном культивировании, представлены в табл. 1–5, где использованы следующие обозначения: Дк – диаметр колоний; Дл – диаметр зон лизиса; ин – исследование не проводилось; рн – роста нет.

Можно видеть (табл. 1, рис. 1), что *E. coli* наиболее активно росла и образовывала зоны лизиса при использовании в качестве белкового субстрата коллагена и желатина. Менее активно культура росла и образовывала зоны лизиса на среде с жидким кератином. Минимальный рост бактерии наблюдался на среде с кератином волос, зон лизиса при этом обнаружено не было. Например, на 3-и сутки культивирования при 37 °С диаметр колоний при росте на среде с коллагеном составлял 88,0%, на среде с жидким кератином – 13,0%, а на среде с кератином волос – 7,5% от диаметра колоний на среде с желатином. Снижение температуры культивирования приводило к значительному снижению диаметров колоний и зон лизиса при росте на среде с коллагеном и практически не влияло на указанные показатели при использовании желатина.

Культура *B. subtilis* также наиболее активно росла и образовывала зоны лизиса на среде с коллагеном и желатином (табл. 2). Диаметр колоний *B. subtilis* на среде с жидким кератином был меньше, чем на среде с коллагеном и желатином на всех сроках культивирования, то есть наблюдались те же закономерности, что и для *E. coli*.



Рис. 1. Колонии *E. coli* при росте на среде с коллагеном (слева) и желатином (справа) на 2-е сутки культивирования

Таблица 1. Параметры роста культуры *Escherichia coli* при поверхностном культивировании на средах, содержащих различные субстраты, мм

Субстрат		Время культивирования, сутки											
		1		2		3		6		7		8	
		Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл
Коллаген	37 °С	12,5	16,4	21,4	34,7	29,2	37,4	46,6	53,3	ин	ин	ин	ин
	24 °С	4,0	5,1	8,8	12,0	15,6	22,0	30,2	37,4	ин	ин	ин	ин
Желатин	37 °С	13,9	17,2	25,6	32,3	33,2	40,7	ин	ин	ин	ин	ин	ин
	24 °С	15,8	19,4	23,5	28,8	31,6	39,5	ин	ин	ин	ин	ин	ин
Жидкий кератин		3,0	–	3,9	6,5	4,3	7,5	10	11,7	12,1	15,2	14,3	19,3
Кератин волос		рн	–	рн	–	2,5	–	3,7	–	3,7	–	3,7	

Таблица 2. Параметры роста культуры *Bacillus subtilis* при поверхностном культивировании на средах, содержащих различные субстраты, мм

Субстрат		Время культивирования, сутки											
		1		2		3		6		7		8	
		Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл
Коллаген	37 °С	8,3	9,8	16,1	20,6	23,5	27,7	40,8	50,1	ин	ин	ин	ин
	24 °С	4,3	5,4	10,1	13,6	17,3	25,6	26,8	34,1	31,8	38,0	ин	ин
Желатин	37 °С	11,0	13,2	17,3	21,3	22,9	28,4	ин	ин	ин	ин	ин	ин
	24 °С	8,1	9,7	13,5	16,5	17,3	22,7	31,8	37,3	32,0	38,6	ин	ин
Жидкий кератин		2,0	–	2,7	5,3	2,9	6,5	7,9	11,0	9,3	12,8	11,5	14,8
Кератин волос		рн	–	рн	–	рн	–	рн	–	рн	–	рн	–

Диаметр зон лизиса на жидком кератине был значительно меньше по сравнению с диаметром при росте на коллагене и желатине. Возможно, этот факт объясняется присутствием в жидком кератине большого количества относительно низкомолекулярных компонентов, утилизация которых микроорганизмом не требует секреции значительного количества протеолитических ферментов. Снижение температуры до 24 °С приводило к замедлению роста колоний и образованию зон лизиса на средах с коллагеном и желатином. Роста культуры на среде с кератином волос не обнаружено за все время наблюдения.

Закономерности, отмеченные для культуры *B. subtilis*, наблюдались и при изучении параметров роста *B. cereus* на средах, содержащих различные белковые субстраты (табл. 3). Культура наиболее активно росла и образовывала зоны лизиса на среде с желатином. При культивировании на средах, содержащих жидкий кератин, диаметры колоний были ниже в 5,5 раза в начале культивирования и в 2,2 – в конце. Диаметр колоний на среде с коллагеном был несколько меньше, чем на среде с желатином, который, как известно, является частично гидролизованным коллагеном, то есть

отличается большей биодоступностью для микроорганизмов. Снижение температуры приводило к уменьшению диаметра колоний и зон лизиса на одних и тех же сроках культивирования. Из трех исследованных бактериальных культур *B. cereus* наиболее активно рос на среде с кератином волос, хотя, так же как и остальные бактерии, не образовывал зон лизиса.

Микромицет *A. rubber* наиболее активно рос и образовывал зоны лизиса на среде с желатином. Следует подчеркнуть, что культивирование осуществлялось только при 24 °С – оптимальной температуре для роста этих микроорганизмов. Рост культуры на среде с коллагеном и образование зон лизиса были значительно замедлены, особенно в первые трое суток культивирования, по сравнению с культивированием на среде с желатином. При культивировании микромицета на среде с жидким кератином наблюдался заметный рост культуры и образование уже на ранних этапах выраженных зон лизиса.

Из пяти исследованных культур *A. rubber* была единственной, которая не только росла на средах с кератином волос, но и образовывала небольшие зоны лизиса (табл. 4, рис. 2).

Таблица 3. Параметры роста культуры *Bacillus cereus* при поверхностном культивировании на средах, содержащих различные субстраты, мм

Субстрат		Время культивирования, сутки											
		1		2		3		6		7		8	
		Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл
Коллаген	37 °С	14,5	17,0	22,7	27,3	31,3	36,9	48,5	56,1	ин	ин	ин	ин
	24 °С	11,1	13,1	17,6	21,6	23,5	29,1	37,0	44,9	ин	ин	ин	ин
Желатин	37 °С	16,4	19,8	26,0	31,8	33,0	40,4	ин	ин	ин	ин	ин	ин
	24 °С	15,8	19,4	16,5	19,9	22,2	28,7	ин	ин	ин	ин	ин	ин
Жидкий кератин		3,0	6,1	4,3	8,8	5,3	8,7	11,3	15,7	13,3	17,0	15,7	18,7
Кератин волос		1,8	–	3,3	–	4,2	–	5,0	–	5,7	–	6,6	–

Таблица 4. Параметры роста культуры *Aspergillus rubber* при поверхностном культивировании на средах, содержащих разные субстраты, мм

Субстрат		Время культивирования, сутки											
		1		2		3		6		7		8	
		Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл
Коллаген		рн	–	2,1	–	2,4	7,0	23,3	32,0	ин	ин	ин	ин
Желатин		2,1	–	8,2	10,5	17,9	21,4	34,5	41,8	ин	ин	ин	ин
Жидкий кератин		1,5	3,0	2,8	4,9	5,9	7,3	12,7	16,7	14,3	18,1	16,2	19,3
Кератин волос		рн	–	3,0	6,3	6,3	7,9	6,8	7,8	7,2	7,5	7,5	7,5



Рис. 2. Колонии *A. rubber* при росте на среде с жидким кератином (слева) и кератином волос (справа) на 6-е сутки культивирования

При исследовании параметров роста *P. restrictulosum* (табл. 5) на средах с коллагеном и желатином были выявлены практически такие же закономерности, как и для *A. rubber*. Рост микромицета на среде с коллагеном и образование зон лизиса были значительно замедлены, особенно в первые трое суток культивирования, по сравнению с культивированием на среде с желатином. При культивировании на среде с жидким кератином наблюдался заметный рост культуры и образование уже на ранних этапах видимых зон лизиса. На средах, содержащих кератин волос, микромицет также рос, однако зон лизиса не образовывал.

Наряду с такими параметрами роста микроорганизмов, как диаметр колоний и зон лизиса, важным показателем является индекс лизиса. Индекс лизиса определяется соотношением площади колонии и площади зоны лизиса и характеризует удельную протеолитическую активность культу-

ры, так как площадь колонии пропорциональна ее биомассе, а площадь зоны лизиса – активности секретируемых протеиназ. В связи с этим на следующем этапе исследования были рассчитаны индексы лизиса исследованных микроорганизмов при росте на средах, содержащих в качестве субстратов различные белки (табл. 6).

Индексы лизиса бактерий при культивировании на средах, содержащих коллаген или желатин, менялись в диапазоне от 1,31 до 2,63 (37 °С), тогда как при использовании в качестве субстрата жидкого кератина указанные показатели варьировали от 1,24 до 5,02. В подавляющем большинстве случаев на одних и тех же этапах культивирования индексы лизиса у бактерий были выше при росте на средах с жидким кератином по сравнению с таковыми на средах с коллагеном или желатином. При этом индексы лизиса на желатиновых средах в процессе культивирования изменялись несущественно в отличие от этого показателя при росте на других субстратах. Снижение температуры при культивировании бактерий вызывало неоднозначный эффект. В одних случаях наблюдалось снижение индекса лизиса, в других – его повышение.

У исследованных микромицетов наибольшие индексы лизиса отмечены при росте на средах с коллагеном. Значения указанного показателя при росте на средах с жидким кератином были снижены. Еще меньшие индексы лизиса у грибов зафиксированы при росте на средах с желатином. Зоны лизиса при росте на среде кератином волос отмечены только для одного микромицета – *A. rubber*, при этом значения индексов лизиса были сравнимы с таковыми на средах с жидким кератином. При росте грибов на всех изученных средах максимальные индексы лизиса наблюдались на первых этапах культивирования, а затем снижались.

Таблица 5. Параметры роста культуры *Penicillium restrictulosum* при поверхностном культивировании на средах, содержащих разные субстраты, мм

Субстрат	Время культивирования, сутки											
	1		2		3		6		7		8	
	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл	Дк	Дл
Коллаген	рн	–	1,8	–	5,5	13,7	28,6	35,8	ин	ин	ин	ин
Желатин	1,2	–	7,8	10,3	15,5	19,6	37,5	42,8	ин	ин	ин	ин
Жидкий кератин	2,3	3,8	3,7	6,0	7,3	9,3	17,7	21,3	20,5	24,0	23,3	27,3
Кератин волос	рн	–	3,7	–	8,8	–	9,8	–	9,7	–	9,5	–

Таблица 6. Индексы лизиса исследованных культур на различных средах

Культура	Субстрат		Время культивирования, сутки					
			1	2	3	6	7	8
<i>E. coli</i>	Коллаген	37 °С	1,71	2,63	1,64	1,31	ин	ин
		24 °С	1,60	1,86	1,99	1,53	ин	ин
	Желатин	37 °С	1,54	1,59	1,50	ин	ин	ин
		24 °С	1,50	1,50	1,56	ин	ин	ин
	Жидкий кератин		–	2,76	3,04	1,24	1,58	1,82
Кератин волос		рн	рн	–	–	–	–	
<i>B. subtilis</i>	Коллаген	37 °С	1,40	1,64	1,39	1,51	ин	ин
		24 °С	1,60	1,82	2,19	1,62	1,43	ин
	Желатин	37 °С	1,45	1,52	1,54	ин	ин	ин
		24 °С	1,44	1,50	1,72	1,38	1,46	ин
	Жидкий кератин		–	3,78	5,02	1,93	1,78	1,65
Кератин волос		рн	рн	рн	рн	рн	рн	
<i>B. cereus</i>	Коллаген	37 °С	1,38	1,45	1,39	1,34	ин	ин
		24 °С	1,40	1,51	1,53	1,47	ин	ин
	Желатин	37 °С	1,46	1,50	1,50	ин	ин	ин
		24 °С	1,50	1,67	1,45	ин	ин	ин
	Жидкий кератин		4,13	4,19	2,70	1,93	1,63	1,42
Кератин волос		–	–	–	–	–	–	
<i>A. rubber</i>	Коллаген		рн	–	8,39	1,88	ин	ин
	Желатин		–	1,65	1,42	1,47	ин	ин
	Жидкий кератин		4,00	3,07	1,54	1,73	1,60	1,43
	Кератин волос		рн	4,41	1,58	1,33	1,09	1
<i>P. restrictulosum</i>	Коллаген		рн	–	6,17	1,56	ин	ин
	Желатин		–	1,74	1,60	1,30	ин	ин
	Жидкий кератин		2,78	2,68	1,59	1,46	1,37	1,37
	Кератин волос		рн	–	–	–	–	–

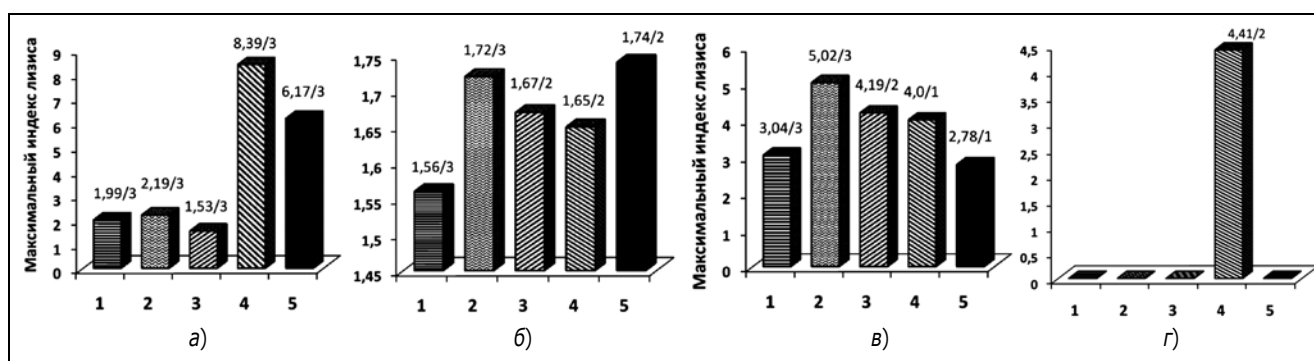


Рис. 3. Максимальные индексы лизиса у микроорганизмов при росте на различных средах: а – коллаген; б – желатин; в – жидкий кератин; г – кератин волос; 1 – *E. coli*; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. cereus*; 4 – *A. ruber*; 5 – *P. Restriculosum* (цифрами указан индекс/время культивирования, сут)

Следует отметить, что индексы лизиса при росте на коллагене для всех бактерий были ниже, чем для микромицетов (рис. 3). Максимальный индекс лизиса на коллагене составлял соответственно для *A. Rubber* и *P. restrictulosum* 8,39 и 6,17, а для *E. coli*, *B. Subtillis* и *B. cereus* – 1,99; 2,19 и 1,53 при 24 °С. При росте на средах с желатином и жидким кератином различия между бактериями и грибами были значительно менее выражены. Так, максимальные индексы лизиса при росте на среде с жидким кератином менялись в диапазоне 5,02–2,78. Максимальный индекс лизиса у *A. rubber*, единственной культуры, образующей зоны лизиса, лежал в том же диапазоне.

ВЫВОДЫ

1. Все впервые исследованные культуры росли и образовывали зоны лизиса на средах, содержащих коллаген, желатин и жидкий кератин, что свидетельствует о целесообразности их дальнейшего изучения в качестве потенциальных продуцентов коллагено- и кератинолитических протеиназ.
2. Как бактерии, так и грибы менее активно росли и образовывали зоны лизиса на средах, содержащих кератин, по сравнению со средами с коллагеном или его производным – желатином. Наименее активно происходил рост на средах, содержащих кератин волос. Только одна культура – *A. rubber* образовывала на этой среде зоны лизиса.
3. Сравнительный анализ индексов лизиса у бактерий и грибов показывает, что последние обладают более высоким протеолитическим потенциалом, однако при этом для бактерий показана высокая скорость накопления биомассы, что может обеспечить преимущества их использования в качестве продуцентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Миленьтеева И.С., Остроумов Л.А., Бабиц О.О. Изучение критериев качества продуктов питания, полученных из вторичных продуктов переработки // Современные наукоемкие технологии. 2012. № 12. С. 24–27.
2. 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 // Bio-resource Technol. 1998. V. 66. P. 1–11.
3. Можина Н.В., Руденская Г.Н. Коллагенолитические ферменты патогенных микроорганизмов // Биомедицинская химия. 2004. Т. 50. Вып. 6. С. 539–553.
4. Яковлева М.Б., Никитина З.К., Савина Т.А., Савин П.С. Технологические подходы получения протеиназ и коллагеназ *Aspergillus flavus* при глубинном культивировании в ферментерах // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. № 5. С. 38–42.
5. Никитина З.К., Гордонова И.К. Выделение, очистка и биохимические свойства кератинолитического фермента, секретируемого *Penicillium citrinum* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 9. С. 36–41.
6. Никитина З.К., Гордонова И.К. Некоторые свойства кератинолитического фермента, секретируемого *Cladosporium sphaerospermum* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. № 5. С. 36–41.
7. Яковлева М.Б., Никитина З.К. Скрининг-методы в биотехнологии (обзор). Часть 1. Поиск микроорганизмов-продуцентов ферментов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016. № 4. С. 23–32.
8. Яковлева М.Б., Никитина З.К. Скрининг-методы в биотехнологии (обзор). Часть II. Поиск микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016. № 5. С. 435–437.
9. Гордонова И.К., Дмитриев Г.В., Никитина З.К. Поиск микроорганизмов – продуцентов кератиназ // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2007. № 4. С. 11–15.
10. Яковлева М.Б., Козельцев В.Л. Протеолиз коллагена некоторыми видами микромицетов и спорообразующих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. Вып. 1. С. 121–126.

Поступила 28 апреля 2017 г.

PROTEOLYTIC ACTIVITY COMPARATIVE EVALUATION OF BACTERIA AND MICROMYCETES

© Authors, 2017

I.K. Gordonova

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

Z.K. Nikitina

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

E-mail: nikitinaz@yandex.ru

Zon Khy Chol

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

Obtaining various biologically active substances using of biotechnological approaches is one of perspective directions of modern scientific research. In recent years the list of such substances, including proteases with different substrate specificity was significantly

expanded. It should be noted, the different collagenases and keratinases with their ability to hydrolyze collagen and keratin are among these enzymes. These enzymes are promising for use in medicine, cosmetics, various industries and agriculture. Most of proteases are produced abroad. Previously it was shown that some micromycetes from FGBNU VILAR biocollection secrete proteolytic enzymes to the culture media. This investigation is devoted to the proteolytic activity comparative study of some bacteria and filamentous fungi to assess the prospects for their further use as producers.

In the present work, we first estimated the ability of 3 species of bacteria and 2 species of micromycetes from the collection of FGBNU VILAR to hydrolyze various substrates containing collagen or keratin by using the screening method during surface cultivation of microorganisms.

It was shown that all investigated cultures were grown and formed zones of lysis in media containing collagen, gelatin and liquid keratin that indicates the suitability for their further study as potential producers of collagenases and keratinases. Fungi as well as bacteria less actively grew and formed zones of lysis in media containing keratin, in comparison with media containing collagen or gelatin. The growth on media containing keratin of the hair was minimal. *Aspergillus rubber* was the only culture which formed zones of lysis on this medium. Indexes of lysis in bacteria and fungi comparative analysis was shown that the fungi proteolytic potential was higher. However bacteria had the high rate of biomass accumulation, which can provide their advantages use as producers.

Key words: micromycetes, bacteria, proteases.

REFERENCES

1. Milen'teva I.S., Ostroumov L.A., Babich O.O. Izuchenie kriteriev kachestva produktov pitaniya, poluchennyh iz vtorichnyh produktov pererabotki // Sovremennye naukoemkie tehnologii. 2012. № 12. S. 24–27.
2. 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. V. 66. P. 1–11.
3. Mozhina N.V., Rudenskaja G.N. Kollagenoliticheskie fermenty patogennyh mikroorganizmov // Biomedicinskaja himija. 2004. T. 50. Vyp. 6. S. 539–553.
4. Jakovleva M.B., Nikitina Z.K., Savina T.A., Savin P.S. Tehnologicheskie podhody poluchenija proteinaz i kollagenaz *Aspergillus flavus* pri glubinnom kul'tivirovanii v fermentjorah // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2014. № 5. S. 38–42.
5. Nikitina Z.K., Gordonova I.K. Vydelenie, ochildka i biohimicheskie svojstva keratinoliticheskogo fermenta, sekretiruemogo *Penicillium citrinum* // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2013. № 9. S. 36–41.
6. Nikitina Z.K., Gordonova I.K. Nekotorye svojstva keratinoliticheskogo fermenta, sekretiruemogo *Cladosporium sphaerospermum* // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2011. № 5. S. 36–41.
7. Jakovleva M.B., Nikitina Z.K. Skringing-metody v biotehnologii (obzor). Chast' 1. Poisk mikroorganizmov-producentov fermentov // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2016. № 4. S. 23–32.
8. Jakovleva M.B., Nikitina Z.K. Skringing-metody v biotehnologii (obzor). Chast' 11. Poisk mikroorganizmov-producentov biologicheski aktivnyh veshhestv // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2016. № 5. S. 435–437.
9. Gordonova I.K., Dmitriev G.V., Nikitina Z.K. Poisk mikroorganizmov – producentov keratinaz // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2007. № 4. S. 11–15.
10. Jakovleva M.B., Kozel'cev V.L. Proteoliz kollagena nekotorymi vidami mikromicetov i sporoobrazujushhh bakterij // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. 1994. T. 30. Vyp. 1. S. 121–126.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Хелепин (таблетки, мазь) рег. №№ 87/1186/10; 87/1186/7 – противовирусное средство при заболеваниях, вызываемых ДНК-геномными вирусами группы герпеса, получаемое из травы дикорастущего растения леспециды копеечникомой (*Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag.).

Хелепин Д (таблетки, мазь, глазные капли), рег. №№ 94/108/6; 94/108/7; 99/47/11 – противовирусное средство, получаемое из травы культивируемого растения десмодиума канадского (*Desmodium canadense* D.C.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Fax: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii@mail.ru; www.vilarnii.ru