

УДК 640

СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКИХ ЭКЗОПРОТЕАЗ МИКРОМИЦЕТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

С.Н. Тиморшина, А.А. Осмоловский

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В настоящее время разработка и развитие методов утилизации трудноразлагаемых отходов стали приоритетными направлениями исследований современной науки. В связи с глобальным ростом населения Земли ежегодно увеличивается нагрузка на отрасли сельского хозяйства, в том числе на животноводство, что ведет к образованию большого количества отходов, содержащих трудноразлагаемые фибриллярные белки, например, такие, как кератин. На данный момент в мире ежегодно образуется более 40 млн тонн свободных куриных перьев, являющихся основным побочным продуктом птицеводства и более чем на 80 % состоящих из кератина (Tesfaye et al., 2017). К основным методам утилизации отходов агропромышленного комплекса относятся захоронивание, сжигание и химический гидролиз. Эти подходы приводят к образованию веществ, загрязняющих окружающую среду, а также не являются экономически выгодными. Переход к биodeградации как основному пути переработки трудноразлагаемых белковых материалов позволит не только снизить негативное влияние на окружающую среду, но также использовать соединения, образующиеся в результате ферментативного гидролиза, для производства продуктов с высокой добавленной стоимостью. Вторичное использование продуктов переработки кератина (аминокислот и олигопептидов) возможно в качестве компонентов удобрений, кормовых добавок, субстрата для производства биотоплива, а также компонентов косметических и медицинских препаратов (Hassan et al., 2020).

Таким образом, изучение кератиназ и кератинолитических микроорганизмов является важной задачей современной биотехнологии. Однако стоит отметить, что на данный момент, несмотря на широкую изученность бактериальных протеаз, гидролизующих кератин, кератинолитические ферменты микромицетного происхождения остаются малоизучены, в то время как многие штаммы микроскопических грибов известны в качестве продуцентов широкого спектра протеаз (de Souza et al., 2015). В связи с этим данная работа была посвящена отбору непатогенных или условно патогенных кератинолитических штаммов микромицетов, применение которых возможно в биodeградации отходов животноводства, а также в качестве продуцентов кератиназ, востребованных в медицине, фармацевтике и других отраслях экономики.

Объектами исследования были микромицеты отдела Ascomycota, выделенные из различных почв и растительных субстратов (лесных подстилок и листового опада) на территориях средней полосы России, Камчатки и Вьетнама и полученные из коллекций кафедры микробиологии и кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Всего в работе были использованы 32 штамма микроскопических грибов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Paecilomyces*, *Cladosporium* и *Chaetomium*. Скрининг проводили с использованием полуселективных агаризованных сред, следующего состава (%): KH_2PO_4 – 0.05, MgSO_4 – 0.025, пептон – 0.5, агар – 1.5.

Таблица 1. Энзиматические индексы микромицетов на средах с различными белковыми субстратами

Культура	ЕI _{каз.}	ЕI _{кер.}	ЕI _{жел.}
<i>Aspergillus aculeatus</i> A2	1.00	1.00	1.00
<i>A. alliaceus</i> 7dN1	1.06	1.00	1.09
<i>A. amstelodami</i> A6	1.59	2.00	1.48
<i>A. candidus</i> A4	1.55	1.00	1.54
<i>A. chevalieri</i> 1197	1.09	1.13	1.14
<i>A. chevalieri</i> 1205	1.10	1.13	1.15
<i>A. crustosus</i> A29	1.44	1.00	1.66
<i>A. fischeri</i> A11	1.03	1.06	1.00
<i>A. flavus</i> 4059	1.30	1.00	1.49
<i>A. giganteus</i> A16	1.95	1.39	2.21
<i>A. janus</i> A17	1.33	1.00	1.55
<i>A. niger</i> 443	1.00	1.00	1.00
<i>A. niger</i> 3640	1.00	1.00	1.00
<i>A. niger</i> GS	1.00	1.00	1.00
<i>A. ochraceus</i> 247	1.29	1.25	1.77
<i>A. raperi</i> A13	1.20	1.00	1.43
<i>A. sydowii</i> 1	1.15	1.12	1.37
<i>A. sydowii</i> 21	1.18	1.08	2.29
<i>A. unguis</i> 16	1.89	1.00	1.90
<i>A. unguis</i> 2167	1.64	1.00	1.73
<i>A. ustus</i> 1	1.13	1.00	1.43
<i>A. ustus</i> A9	1.11	1.00	1.56
<i>Chaetomium globosum</i> 2382	1.00	1.00	1.00
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> 1779	2.18	1.33	2.57
<i>C. sphaerospermum</i> 3118	1.94	1.10	2.80
<i>Paecilomyces varoitii</i> 444	1.00	1.00	1.00
<i>P. varoitii</i> 2228	1.00	1.00	1.00
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> 20	1.66	1.00	1.77
<i>P. chrysogenum</i> 1	1.31	1.00	1.49
<i>P. chrysogenum</i> 24	1.40	1.00	1.70
<i>P. expansum</i> 31	1.50	1.00	1.00
<i>Ulocladium botrytis</i> 4037	1.09	1.00	1.11

В качестве основного источника углерода и азота в среды добавляли 1.0 % казеина по Хаммерштайну или желатина, или 0.5 % кератина. На 7 сутки культивирования при 28 °С негидролизованые белки осаждали 10 % раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и проводили измерения диаметров колоний и зон гидролиза. Энзиматические индексы (EI) рассчитывали по формуле: $EI = d_2/d_1$, где d_1 – диаметр колонии (мм), а d_2 – диаметр зоны гидролиза (мм). Для культур микромицетов с наибольшими рассчитанными энзиматическими индексами также были получены данные при культивировании штаммов на аналогичных средах с фибрином и эластином.

В таблице 1 представлены результаты скрининга микроорганизмов при росте на трёх агаризованных средах, содержащих казеин ($EI_{каз.}$), кератин ($EI_{кер.}$) и желатин ($EI_{жел.}$). Как видно из полученных данных некоторые представители родов *Aspergillus*, *Cladosporium* и *Penicillium* являются активными продуцентами экзопротеаз, что согласуется с данными литературы и делает их интересными объектами для исследований в области биотехнологии, однако лишь 10 культур микромицетов из 32 показали возможность к гидролизу кератина.

Для следующего этапа исследования были отобраны штаммы с высокими значениями энзиматических индексов на всех трёх средах, а именно *Aspergillus giganteus* A16, *A. amstelodami* A6, *A. ochraceus* 247 и *Cladosporium sphaerospermum* 1779 (рис. 1). Для данных культур также были рассчитаны энзиматические индексы на средах с фибрином ($EI_{фibr.}$) и эластином ($EI_{эл.}$). Соотношения энзиматических индексов отобранных культур на средах с различными белковыми субстратами к энзиматическим индексам на среде с казеином приведены в таблице 2.

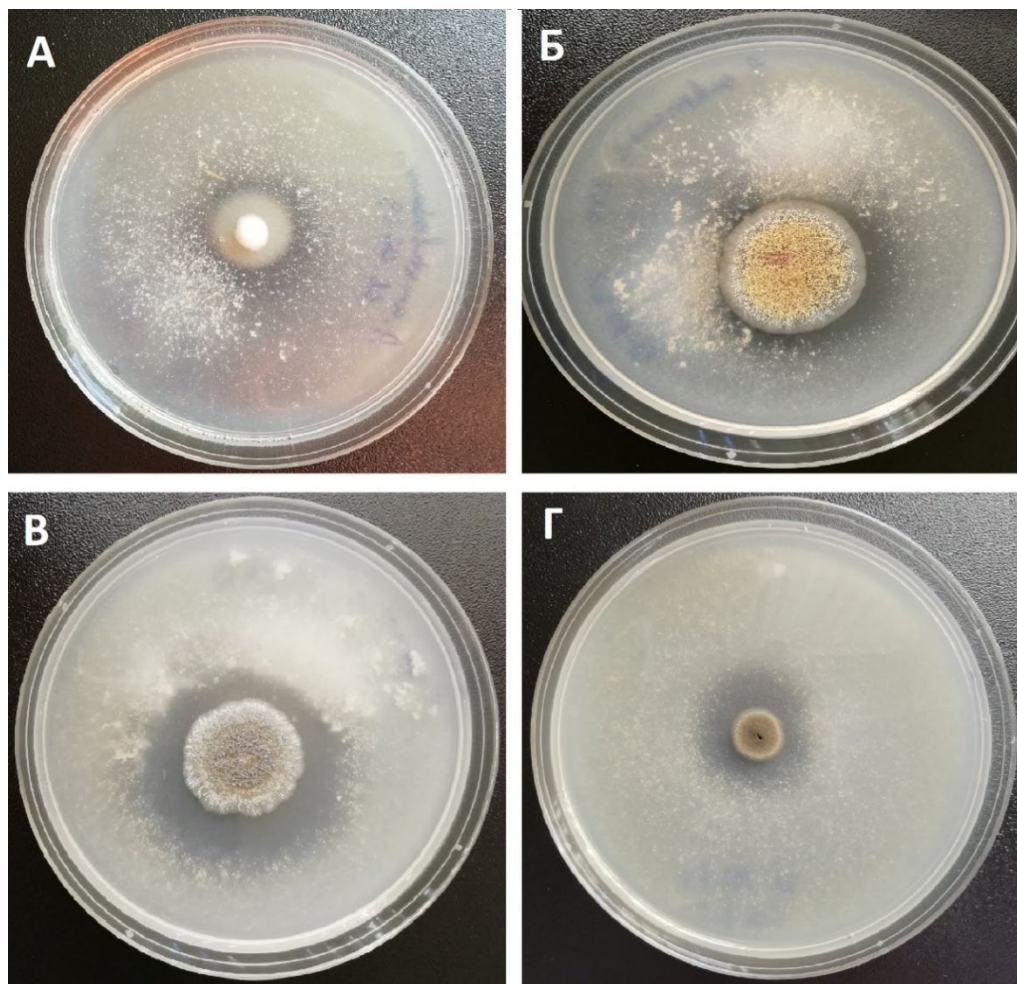


Рис. 1. Микромицеты *Aspergillus amstelodami* A6 (А), *A. ochraceus* 247 (Б), *A. giganteus* A16 (В) и *Cladosporium sphaerospermum* 1779 (Г) на среде с казеином.

Таблица 2. Соотношения энзиматических индексов микромицетов *Aspergillus giganteus* A16, *A. amstelodami* A6, *A. ochraceus* 247 и *Cladosporium sphaerospermum* 1779

Культура	ЕI _{кер.} / ЕI _{каз.}	ЕI _{жел.} / ЕI _{каз.}	ЕI _{фибр.} / ЕI _{каз.}	ЕI _{эл.} / ЕI _{каз.}
<i>A. amstelodami</i> A6	1.26	0.93	1.28	0.70
<i>A. giganteus</i> A16	0.71	1.13	0.75	0.58
<i>A. ochraceus</i> 247	0.97	1.37	1.05	0.90
<i>C. sphaerospermum</i> 1779	0.61	1.18	0.72	0.67

Как видно из таблицы 2, соотношения энзиматических индексов на среде с эластином к энзиматическим индексам на среде с казеином ($EI_{эл.} / EI_{каз.}$) у всех исследуемых микромицетов меньше единицы, что может свидетельствовать о низкой специфичности экзопротеаз данных культур по отношению к эластину. Низкий уровень эластолитической активности обычно указывает на низкую степень патогенности микроорганизмов (Kothary et al., 1984; Tamura et al., 1992; Khosravi et al., 2012), что является необходимым свойством для промышленных продуцентов.

Протеолитические ферменты, секретируемые *A. amstelodami* A6, по-видимому, обладают высоким сродством к кератину (1.26) и фибрину (1.28), но не к желатину (0.93), являющимся частично гидролизированным коллагеном, что может говорить о специфичности этих протеаз по отношению к фибриллярным белкам. Ферменты других отобранных штаммов микромицетов не показали высокой специфичности к фибриллярным белкам, однако абсолютные значения их энзиматических индексов позволяют предположить о существовании у них потенциала в качестве продуцентов кератиназ.

Таким образом, в результате данной работы были отобраны штаммы микроскопических грибов, способных к синтезу экзопротеаз с кератинолитической активностью, что делает их перспективными объектами для изучения в области биотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА:

- De Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C. A biotechnology perspective of fungal proteases //Brazilian Journal of Microbiology. 2015. V. 46. № 2. P. 337–346.
- Hassan M.A., Abol-Fotouh D., Omer A.M., Tamer T.M., Abbas E. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review //International Journal of Biological Macromolecules. 2020. V. 154. P. 567–583.
- Khosravi A.R., Mahdavi Omran S., Shokri H., Lotfi A., Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis //Journal de mycologie medicale. 2012. V. 22. № 2. P. 167–172.
- Kothary M.H., Chase T. Jr., Macmillan J.D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice //Infection and Immunity. 1984. V. 43. № 1. P. 320–325.
- Tamura Y., Suzuki S., Sawada T. Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice //Microbial pathogenesis. 1992. V. 12. № 3. P. 237–244.
- Tesfaye T., Sithole B., Ramjugernath D. Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route – current status and future prospects //Clean Technologies and Environmental Policy. 2017. V. 19. № 10. P. 2363–2378.