

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
имени АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА и Ю.А. ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ОТДЕЛ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

На правах рукописи

Комаревцев Сергей Константинович

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ СЕКРЕТИРУЕМОЙ
МИКРОМИЦЕТОМ *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D ПРОТЕАЗЫ-
АКТИВАТОРА ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
кандидат биологических наук
ОСМОЛОВСКИЙ А.А.
доктор химических наук
МИРОШНИКОВ К.А.

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Современное представление о протеолитических ферментах	12
1.2. Протеазы микромицетов.....	16
1.2.1. Аспартильные протеазы	17
1.2.2. Металлопротеазы	20
1.2.3. Субтилизиновые протеазы	23
1.2.4. Консервативные мотивы протеаз микромицетов рода <i>Aspergillus</i>	26
1.3. Получение протеолитических ферментов микромицетов в промышленности	28
1.3.1. Оптимизация условий культивирования	28
1.3.2. Иммуобилизация продуцента	30
1.3.3. Особенности очистки секретируемых протеаз микромицетов	32
1.3.4. Получение протеаз микромицетов в рекомбинантной форме.....	34
1.4. Гемостаз и система свертывания крови.....	36
1.5. Антикоагулянтная система протеина С	40
1.6. Определение активности протеина С в крови человека	41
1.7. Штамм <i>Aspergillus ochraceus</i> ВКМ-F4104D – продуцент протеазы-активатора протеина С плазмы крови.....	44
1.8. Заключение	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Объект исследования	49
2.2. Глубинное культивирование продуцента	49
2.3. Иммуобилизация продуцента	50

2.3.1. Процедура иммобилизации	50
2.3.2. Подбор оптимальных условий для иммобилизации	50
2.3.3. Полунепрерывное культивирование иммобилизованного продуцента	51
2.3.4. Световая и сканирующая электронная микроскопия.....	51
2.4. Фракционирование культуральной жидкости продуцента.....	52
2.5. Хроматографическая очистка препарата белков культуральной жидкости продуцента	52
2.5.1. Гидрофобная хроматография.....	52
2.5.2. Ионообменная хроматография.	53
2.5.3. Гель-фильтрация	53
2.6. Определение и анализ последовательности протеазы-активатора протеина С плазмы крови.....	53
2.6.1. Выделение геномной ДНК из мицелия.....	53
2.6.2. Выделение тотальной РНК из мицелия	54
2.6.3. Синтез и амплификация тотальной кДНК.....	55
2.6.4. Секвенирование концевых фрагментов кДНК.....	55
2.6.5. Секвенирование полноразмерной последовательности.....	56
2.6.6. Биоинформатический анализ последовательности	56
2.7. Получение протеазы-активатора протеина С плазмы крови в бактериальной экспрессионной системе.....	57
2.7.1. Получение плазмиды для бактериальной экспрессии.....	57
2.7.2. Бактериальная экспрессия.....	58
2.7.3. Фракционирование биомассы	58
2.7.4. Аффинная очистка	58

2.8. Методы определения протеолитической активности	59
2.8.1. Определение протеолитической активности с хромогенными пептидными субстратами	59
2.8.2. Определение общей протеолитической активности	59
2.9. Аналитические методы.....	60
2.9.1. Определение концентрации белка.....	60
2.9.2. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле.....	60
2.9.3. Электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1. Иммуобилизация продуцента	62
3.1.1. Подбор оптимального носителя и условий иммуобилизации	62
3.1.2. Культивирование иммуобилизованного микромицета	67
3.2. Очистка протеазы-активатора протеина С плазмы крови из культуральной жидкости	69
3.2.1. Фракционирование культуральной жидкости.....	69
3.2.2. Хроматографическая очистка	73
3.3. Изучение последовательности протеазы-активатора протеина С плазмы крови	76
3.3.1. Определение и анализ нуклеотидной последовательности гена и кДНК	76
3.3.2. Анализ аминокислотной последовательности	78
3.4. Получение протеазы-активатора протеина С плазмы крови в бактериальной экспрессионной системе.....	89
3.4.1. Исследование различных режимов белковой экспрессии	89
3.4.2. Рефолдинг и созревание исследуемого фермента	95

3.5. Возможные технологические схемы производства протеазы-активатора протеина С плазмы крови.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Способность микроскопических грибов образовывать в лабораторных условиях протеолитические ферменты, свойства которых могут иметь практическое применение в медицинских и диагностических целях, начала активно изучаться сотрудниками кафедры микробиологии биологического факультета МГУ в последние годы прошлого века [1]. Эти работы были продолжены, и позднее была показана способность секретируемых протеаз микромицета *Aspergillus ochraceus* напрямую активировать протеин С плазмы крови из неактивного предшественника [2, 3]. Благодаря своим свойствам, антикоагулянтная протеаза микромицета *A. ochraceus* стала рассматриваться как перспективный аналог протеазы-активатора протеина С плазмы крови из яда южноамериканского медноголового щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix*, которая широко используется в современной диагностике и медицине [4, 5]. Анализ активности протеина С плазмы крови, ключевым компонентом которого является протеаза-активатор из змеиного яда, назначают при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы, сепсисе, гемодиализе, во время приема антикоагулянтных препаратов, а также при подготовке к беременности [6, 7]. Помимо этого, поскольку поиск новых тромболитических и антикоагулянтных ферментов продолжает оставаться актуальной задачей фармацевтической отрасли, протеаза микромицета *A. ochraceus* является перспективным кандидатом для использования в терапевтических целях в медицине и ветеринарии.

Для проведения дальнейших исследований и внедрения в практику возникла необходимость получения протеазы-активатора протеина С из *A. ochraceus* в препаративных количествах. Известные в настоящее время способы позволяют получить ограниченное количество активного фермента, однако их масштабирование затруднительно [8, 9]. Настоящая работа направлена на поиск и исследование масштабируемых биотехнологических методов для получения

препаративных количеств антикоагулянтной протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было исследование способов биотехнологического получения протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой штаммом микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние иммобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D на образование протеазы-активатора протеина С плазмы крови;
2. Разработать способ очистки протеазы-активатора протеина С плазмы крови из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D с использованием современных хроматографических носителей;
3. Установить и проанализировать последовательность гена, кодирующего протеазу-активатор протеина С плазмы крови, образуемую микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D;
4. Исследовать возможность бактериальной экспрессии протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, для получения функционально активного фермента.

Объектом исследования являлась секретируемая протеаза-активатор протеина С плазмы крови, образуемая почвенным микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D.

Предметом исследования являлись разнообразные масштабируемые биотехнологические способы, позволяющие получать препаративное количество данного фермента.

Научная новизна работы. Впервые показана возможность многократного использования иммобилизованного в полимерных гранулах микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D для получения протеазы-активатора протеина С плазмы крови, выявлены увеличенная интенсивность образования целевого фермента при

иммобилизации и повышенная стабильность продуцента по сравнению с традиционным глубинным культивированием. Разработан трехстадийный способ хроматографической очистки целевой протеазы из культуральной жидкости.

Впервые установлена и проанализирована последовательность гена протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Показана принадлежность исследуемой протеазы к группе протеиназы-К-подобных субтилизиновых протеаз. Установленная в работе последовательность гена депонирована в международной базе данных NCBI GenBank под регистрационным номером MW183406.

В результате бактериальной экспрессии в штамме *E. coli* BL21 и последующей хроматографической очистки была получена функционально активная форма протеазы-активатора протеина С плазмы крови, идентичная образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, изучены особенности фолдинга и созревания исследуемого фермента.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование влияния иммобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D на образование протеазы-активатора протеина С плазмы крови позволяет глубже понять особенности морфологии, развития и стабильности продуцента при его росте в полимерных гранулах иммобилизирующего носителя. Выявленные особенности взаимодействия исследуемой протеазы с хроматографическими носителями расширяют имеющиеся знания о физико-химических свойствах фермента. Установленная последовательность протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, имеет важное значение для понимания происхождения, строения и функционирования исследуемого фермента.

Практическая значимость работы заключается в формировании научных подходов к промышленному получению исследуемого фермента. В работе предложены три возможные технологические схемы его производства.

Методология и методы исследования. Автором выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, планирование и проведение экспериментальной и биоинформатической частей работы. Полученные результаты были проанализированы и систематизированы, написаны все главы диссертации, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Иммуобилизация микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D является перспективным биотехнологическим подходом, позволяющим увеличить интенсивность образования протеазы-активатора протеина С плазмы крови, повысить стабильность продуцента и сделать возможным его многократное использование в процессе культивирования;
2. Для очистки целевого фермента из культуральной жидкости рекомендуется использовать комбинацию фракционирования сульфатом аммония и гидрофобной, ионообменной и гель-проникающей хроматографии;
3. Протеаза-активатор протеина С плазмы крови, образуемая микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, относится к группе протеиназы-К-подобных субтилизиновых протеаз. Ген исследуемого фермента состоит из 1394 пар оснований и имеет три коротких некодирующих участка (интрона) длиной 58, 59 и 62 пары оснований. Кодированный участок ДНК протеазы состоит из 1215 пар оснований и отвечает за синтез полипептидной цепи неактивного предшественника фермента, состоящего из 404 аминокислот. Первая 21 аминокислота (Met¹-Ala²¹) составляет сигнальную последовательность, далее располагается 101-аминокислотный пропептидный домен (Pro²²-Asp¹²²), за которым следует протеазный домен, состоящий из 282 аминокислот (Ala¹²³-Ala⁴⁰⁴). Фермент имеет два кальций-связывающих домена, каталитическую триаду формируют аминокислоты Asp¹⁶³, His¹⁹⁴ и Ser³⁵⁰.

4. Активная рекомбинантная форма исследуемого фермента, идентичная по своим свойствам нативной из культуральной жидкости продуцента, может быть получена в результате бактериальной экспрессии.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется достаточным объемом проведенных исследований, использованием в работе современных экспериментальных и биоинформатических методов. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах, депонированием генетической последовательности в международную базу данных NCBI GenBank. Результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: 2-й и 3-й Российский микробиологический конгресс (Саранск, 2019; Псков, 2021), European Biotechnology Congress (Валенсия, 2019; София, 2021), ESCI 55th Annual Scientific Meeting (Нидерланды, 2021).

На основании предложенных в работе технологических схем на базе опытного биотехнологического производства Комплексной опытной установки (ОБП КОУ) Института биоорганической химии РАН произведено несколько экспериментальных партий лиофилизированного препарата рекомбинантной формы исследуемого фермента общей массой 25 гр., которые были использованы для проведения доклинических и клинических испытаний.

Личный вклад автора заключается в самостоятельном выполнении теоретических и экспериментальных исследований, представленных в работе, анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных результатов, подготовке публикаций и научных докладов.

Объем работы. Работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список

литературы». Работа изложена на 131 странице, содержит 29 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 200 источников, в том числе 180 иностранных.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, среди них 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, и 8 тезисов. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность за ценные советы, неоценимую помощь и всестороннюю поддержку при выполнении работы своим научным руководителям – кандидату биологических наук Александру Андреевичу Осмоловскому и доктору химических наук Константину Анатольевичу Мирошникову.

Автор благодарит сотрудников лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии РАН Михаила Марковича Шнейдера, Нину Николаевну Сыкилинду и Петра Владимировича Евсеева, профессора кафедры микробиологии биологического факультета МГУ Ирину Борисовну Котову и научных сотрудников Валериану Георгиевну Крейер и Марию Романовну Леонтьеву, руководителя ЦКП «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН Марсея Расимовича Кабилова, руководителя опытного биотехнологического производства Института биоорганической химии РАН Василия Николаевича Степаненко и руководителя цеха выделения и очистки Дмитрия Александровича Макарова за методическую помощь, критические замечания и поддержку.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современное представление о протеолитических ферментах

Протеолитические ферменты, или протеазы, играют важнейшую роль в жизнедеятельности всех известных организмов. Они принимают участие в деградации белков, образовании сигнальных молекул и каскадах передачи сигнала, развитии, делении и апоптозе клеток, канцерогенезе и метастазировании опухолей. Помимо этого, протеазы являются наиболее востребованными ферментами в самых разнообразных отраслях промышленности, занимающими 60% всего рынка ферментов [10, 11].

Согласно рекомендациям Комиссии по ферментам (КФ, англ. EC) при Международном союзе биохимии и молекулярной биологии, к протеазам, или пептидазам, относят ферменты из класса гидролаз, катализирующие расщепление пептидных связей (подкласс КФ 3.4). Это очень большая и разнородная группа ферментов, в связи с чем существует несколько подходов по классификации и систематизации протеаз [12].

Упрощенно активный центр протеаз можно представить в виде желоба, или щели на поверхности фермента, где происходит катализируемая реакция. В нем можно условно выделить субстрат-связывающий центр, отвечающий за связывание и правильную ориентацию субстрата, и каталитический центр, в котором непосредственно осуществляется гидролиз пептидной связи. Строение и пространственная структура субстрат-связывающего центра определяют специфичность фермента по отношению к различным субстратам [13].

Схематически субстрат-связывающий центр протеаз можно представить в виде ряда карманов, соответствующих аминокислотам расщепляемого субстрата. Карманы различаются по способности связывать аминокислотные остатки, среди

них могут быть как высокоспецифичные, связывающие только одну конкретную аминокислоту, так и неспецифичные, способные взаимодействовать с любой аминокислотой. Набор карманов субстрат-связывающего центра со специфическими предпочтениями к различным аминокислотам позволяет ферментам распознавать сайты расщепления. В дополнение к взаимодействиям каждого кармана с соответствующими аминокислотами субстрата существует зависимость общей эффективности связывания от типа соседствующих аминокислот, что также определяет субстратную специфичность протеаз. Помимо этого, некоторые субстраты (нативные белки) имеют структурные ограничения, затрудняющие связывание и расщепление [13, 14].

В 1967 году была предложена номенклатура для обозначения позиций (карманов) субстрат-связывающего центра протеаз и соответствующих этим позициям аминокислот расщепляемого субстрата, которая стала общепринятой и широко используется до сих пор. Согласно этой номенклатуре, позиции субстрат-связывающего центра, связывающие аминокислоты субстрата от N-конца полипептидной цепи до сайта расщепления, обозначаются как $S_n \dots S_3 - S_2 - S_1$, а после сайта расщепления – $S_1' - S_2' - S_3' - \dots - S_n'$, а связываемые ими аминокислоты субстрата – как $P_n \dots P_3 - P_2 - P_1$ и $P_1' - P_2' - P_3' - \dots - P_n'$ соответственно. Наглядная схема этой номенклатуры представлена на рисунке 1 [15-17].

По типу катализируемой реакции все протеазы можно разделить на эндопептидазы, у которых сайты расщепления находятся внутри полипептидной цепи субстрата, и экзопептидазы, отщепляющие от нее концевые аминокислоты. В свою очередь, среди экзопептидаз выделяют аминопептидазы, гидролизующие аминокислоты от N-конца полипептидной цепи, карбоксипептидазы – от C-конца, и омега-пептидазы – от обоих концов. Аминопептидазы, отщепляющие по две и три аминокислоты, называют ди- и трипептидилпептидазами соответственно, а аналогичные карбоксипептидазы – пептидилдипептидазами. Частный вариант экзопептидаз – дипептидазы – гидролизуют дипептиды. Наглядно

систематизированная классификация протеаз по катализируемой реакции приведена в таблице 1 [12, 18].

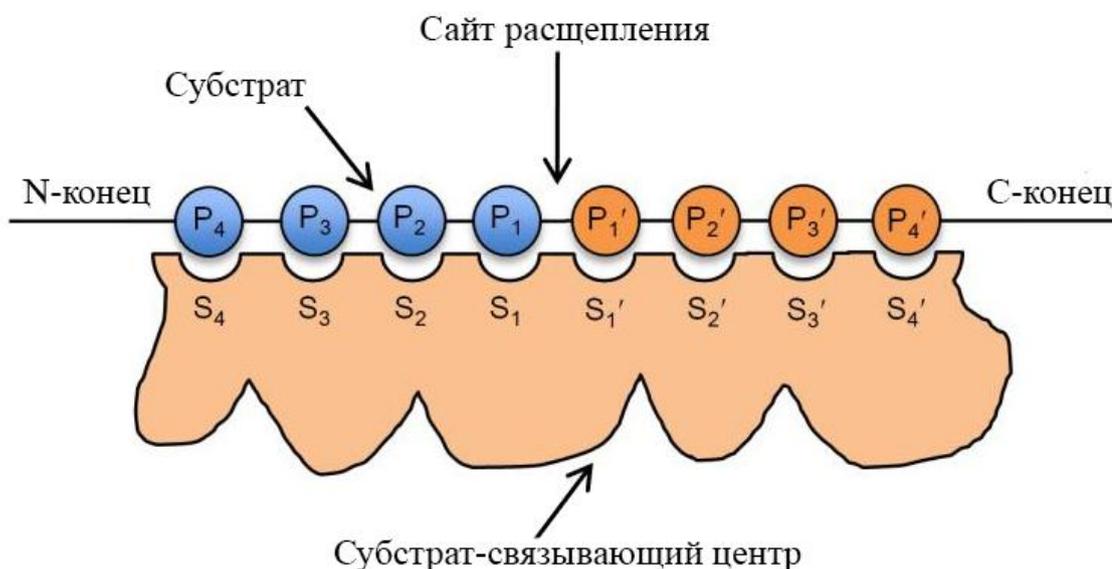


Рис. 1. Схема обозначения позиций субстрат-связывающего центра протеаз и соответствующих им аминокислот расщепляемого субстрата [17].

Таблица 1. Схема классификации протеаз по типу катализируемой реакции

Протеаза	Тип действия ¹
Экзопептидазы	
Аминопептидазы	●↑○-○-○-○-○----
Дипептидил-пептидазы	●-●↑○-○-○-○----
Трипептидил-пептидазы	●-●-●↑○-○-○----
Карбоксипептидазы	----○-○-○-○-○↑●
Пептидил-дипептидазы	----○-○-○-○↑●-●
Дипептидазы	●↑●
Омега-пептидазы	●↑○-○-○-○-○-○-○-○ ----○-○-○-○-○↑●
Эндопептидазы	----○-○-○↑○-○-○-○----

¹ На схеме полипептидной цепи N-концевая часть находится слева, аминокислоты представлены в виде кружков. Закрашенные кружки обозначают концевые аминокислоты. Стрелками обозначены положения сайтов расщепления протеаз относительно концов полипептидной цепи.

Протеазы также разделяют по рН-оптимуму активности, который зависит от природы аминокислот активного центра, их заряженности в разных диапазонах рН и механизма катализа. Согласно этому признаку, протеазы могут быть кислыми, нейтральными и щелочными [19].

Очень широко распространена иерархическая классификация протеаз по структурно-эволюционному типу, которая легла в основу базы данных протеаз MEROPS. Данная классификация предполагает группировку протеаз на каталитические типы, кланы, семейства и подсемейства на основе их структурно-эволюционных взаимоотношений. Каталитические типы являются наиболее крупными группами, они делятся на кланы, а те, в свою очередь, – на семейства и подсемейства. Важное значение для отнесения протеаз к той или иной группе имеет степень гомологии их аминокислотных последовательностей по отношению к представителям этих групп [20, 21].

Каталитический тип протеазы определяется на основании аминокислот, входящих в состав ее каталитического центра, и обозначается большой заглавной буквой в начале идентификационного номера этой протеазы в базе данных MEROPS. В настоящее время известно восемь каталитических типов протеаз: аспартильные (или аспартатные, А), цистеиновые (С), глутаматные (G), металло (M), аспарагиновые (N), сериновые (S), треониновые (Т) и временно неклассифицируемые (unclassified, unknown – U). Самый распространенный каталитический тип протеаз – сериновые, они составляют примерно треть от всех известных в настоящее время протеолитических ферментов [22].

Как правило, протеазы одного каталитического типа имеют ряд общих консервативных структурных доменов, их последовательности высоко гомологичны по отношению друг к другу и менее гомологичны относительно представителей других каталитических типов. Однако аминокислоты субстрат-связывающих центров, определяющие специфичность, обычно неконсервативны и могут сильно различаться. Это является примером эволюционной

дивергентности протеаз, заключающейся в большом разнообразии специфичностей гомологичных протеолитических ферментов одного каталитического типа, и субстратной конвергентности, выражающейся в сходной субстратной специфичности негомологичных протеаз разных каталитических типов за счет похожей пространственной структуры субстрат-связывающих центров [23, 24].

1.2. Протеазы микромицетов

У микромицетов найдены представители всех каталитических типов протеаз. Они играют ключевую роль в целом ряде жизненно важных метаболических процессов, таких как расщепление внеклеточных белковых питательных субстратов, морфогенез, прорастание конидий и развитие мицелия, определяют вирулентность патогенных штаммов. Этим объясняется широкое разнообразие протеаз, обнаруживаемых у микромицетов [25].

С точки зрения биотехнологии, наибольший интерес представляют секретируемые протеазы микромицетов. Они обладают целым рядом существенных преимуществ: широкое разнообразие специфичности и рН-оптимумов активности, относительно низкая стоимость получения и простота очистки, что делает их очень востребованными во многих отраслях промышленности [26, 27].

Несмотря на высокое разнообразие секретируемых протеаз микромицетов, все они, за редким исключением, относятся к трем типам: кислым пепсиновым аспартильным, нейтральным и слабощелочным металло-, а также щелочным субтилизиновым протеазам. Протеазы остальных типов у микромицетов, как правило, являются внутриклеточными либо мембранными, выполняют функции

белков «домашнего хозяйства» и менее интересны с биотехнологической точки зрения [28].

1.2.1. Аспартильные протеазы

Микромицеты являются незаменимым источником кислых аспартильных протеаз, поскольку это единственная группа микроорганизмов, способных секретировать их в окружающую среду. Аспартильные протеазы, образуемые микромицетами, относятся к семейству пепсиновых (A1 по MEROPS). Для них характерен ряд очень консервативных отличительных структурных особенностей, присущих всем протеазам пепсинового семейства (рис. 2).

В активной форме молекула пепсиновых протеаз имеет две симметричные доли («bilobed molecule»), что объясняется дупликацией гена в процессе эволюционного развития. Между долями находится активный центр фермента, который имеет вид щели (желоба), расположенной перпендикулярно наибольшему диаметру молекулы. Большинство пепсиновых протеаз имеет хотя бы один находящийся на N-домене характерный выступ («flap region»), образуемый шпилькой из β -структуры. Этот выступ обладает высокой гибкостью, за счет чего контролирует доступ субстрата к активному центру, удерживает и обеспечивает его правильную ориентацию во время катализа [29].

В состав каталитического центра входят два остатка аспарагиновой кислоты (Asp), по одному от каждой доли молекулы. Карбоксильные группы этих остатков связывают и ориентируют между собой молекулу воды, которая нуклеофильно атакует карбонильную группу гидролизуемой пептидной связи. Затем происходит перенос протонов и перераспределение заряда, в результате которых образуются продукты реакции и восстанавливается исходная форма фермента. Большинство пепсиновых протеаз проявляет активность в кислом диапазоне pH от 2 до 6, оптимум, как правило, находится в интервале pH от 3 до 5. Ферментативная активность пепсиновых протеаз обратимо (конкурентно) ингибируется пепстатином [30, 31].

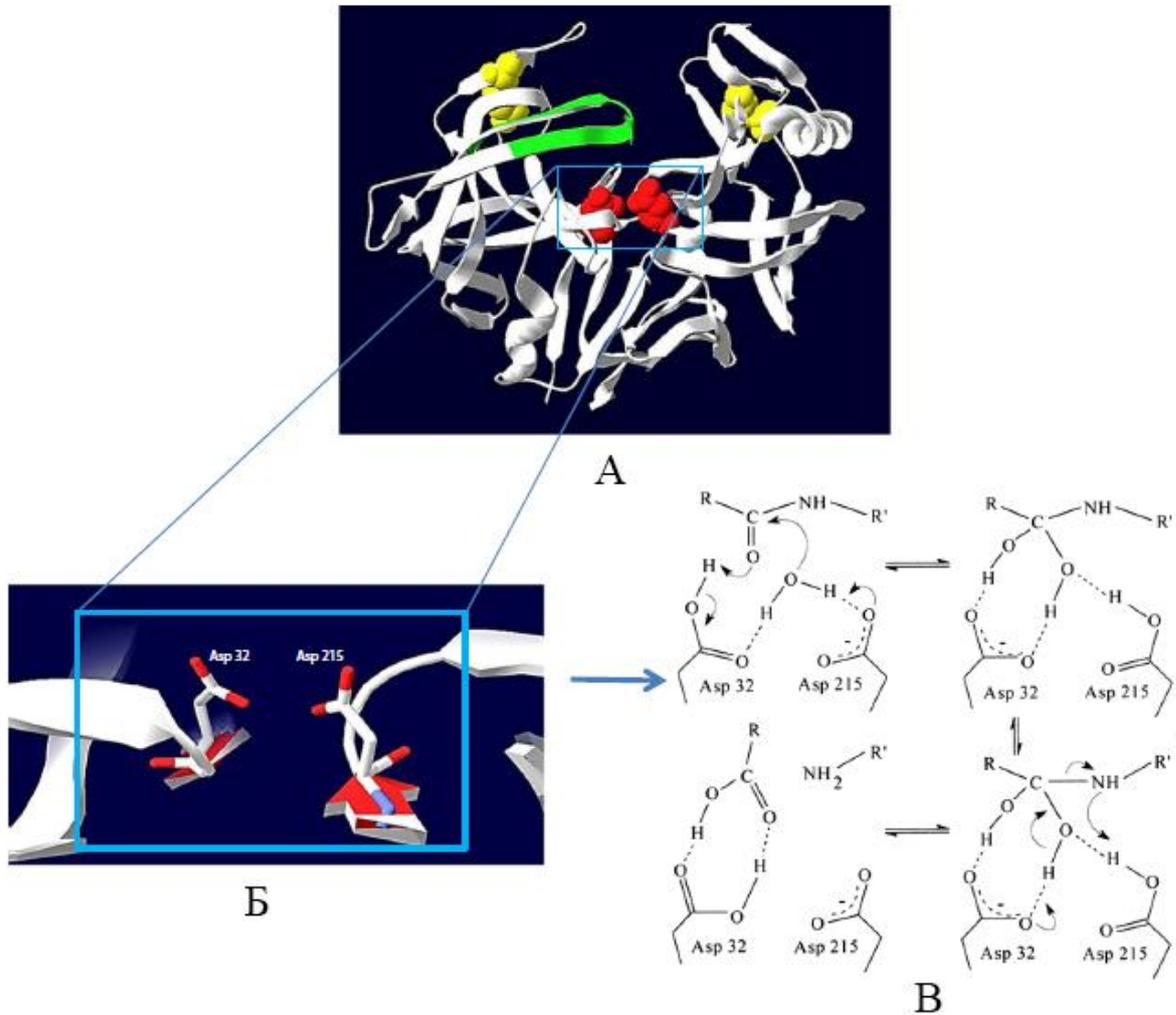


Рис. 2. Схема строения молекул аспартильных протеаз пепсинового семейства и механизм катализируемых ими реакций (на примере секретируемой протеазы *Candida tropicalis*) [29]:

- А – общий вид молекулы зрелой формы: каталитический центр выделен красным, «flap region» – зеленым, дисульфидные мостики – желтым;
 Б – пространственное расположение остатков аспарагиновой кислоты в каталитическом центре;
 В – схема механизма катализируемой реакции.

Интересной особенностью пепсиновых протеаз является значительное количество элементов β -структуры в составе молекулы, одно из наибольших по соотношению к другим структурным элементам среди глобулярных белков. Дополнительную стабилизацию молекулы пепсиновых протеаз обеспечивают дисульфидные связи, число которых в большинстве случаев составляет от 1 до 3 [31].

Пепсиновые протеазы изначально синтезируются в неактивной форме и дополнительно несут на N-конце молекулы сигнальную последовательность (препептид) и препептидный домен. Сигнальная последовательность указывает на принадлежность к секретируемым белкам и отщепляется сигнальной пептидазой в процессе транслокации через мембрану ЭПР. Препептидный домен обеспечивает правильное сворачивание молекулы и ингибирует ферментативную активность до момента секреции протеазы. Отщепление препептидного домена с образованием активной формы фермента (созревание) происходит в аппарате Гольджи при участии мембранной протеазы *KEX2* либо автокаталитически при закислении окружающей среды после секреции [32-34].

Пепсиновые протеазы микромицетов активно используются в различных областях промышленности, где необходима высокая активность и стабильность ферментов в кислых условиях проведения реакции. Наиболее широкое применение они получили в пищевой отрасли, главным образом, в качестве альтернативы сычужным реннинам жвачных животных при коагуляции молока в сыроделии. Помимо этого, пепсиновые протеазы используют в качестве осветляющего агента для предотвращения помутнения при производстве различных напитков и в других сферах пищевой промышленности, где первостепенное значение имеют хорошие вкусовые качества продуктов гидролиза. Кроме пищевой отрасли, пепсиновые протеазы применяют при обесклеивании (дегуммировании) шелка в текстильной промышленности, получении различных пептидов (в т. ч. методом пептидного синтеза), а также для лечения различных пищеварительных расстройств [34-36].

1.2.2. Металлопротеазы

По сравнению с представителями субтилизиновых и аспартильных протеаз, металлопротеазы встречаются среди секретируемых протеолитических ферментов микромицетов реже. Как правило, подавляющее большинство из них принадлежит к семействам M35 и M36 клана MA по MEROPS (дейтеролизины и фунгализины соответственно) и имеет некоторые консервативные структурные элементы, общие для представителей всех семейств этого клана (рис. 3).

Как и другие секретируемые протеазы микромицетов, металлопротеазы синтезируются в виде неактивного предшественника, имеющего на N-конце сигнальную последовательность и пропептидный домен, которые необходимы для секреции и правильного сворачивания фермента и отщепляются в процессе созревания молекулы. В зрелой каталитически активной форме металлопротеаз различают N- и C-домены (субдомены), между которыми располагается щелевидный активный центр фермента [37-39].

Как и для аспартильных протеаз, функцию нуклеофила в процессе гидролиза субстрата металлопротеазами выполняет молекула воды, атакующая карбонильную группу пептидной связи. Однако связывание и активацию молекулы воды выполняет двухвалентный ион металла, в случае представителей клана MA – один ион цинка Zn^{2+} , который играет ключевую роль в процессе катализа. Связывание и координацию иона цинка в активном центре фермента выполняет так называемый Zn-связывающий аминокислотный мотив, в состав которого входят два остатка гистидина (His). В связи с этим, сильные металл-хелатирующие агенты, такие как ЭДТА и фенантролин, высвобождают ион цинка из активного центра и ингибируют активность металлопротеаз [40, 41].

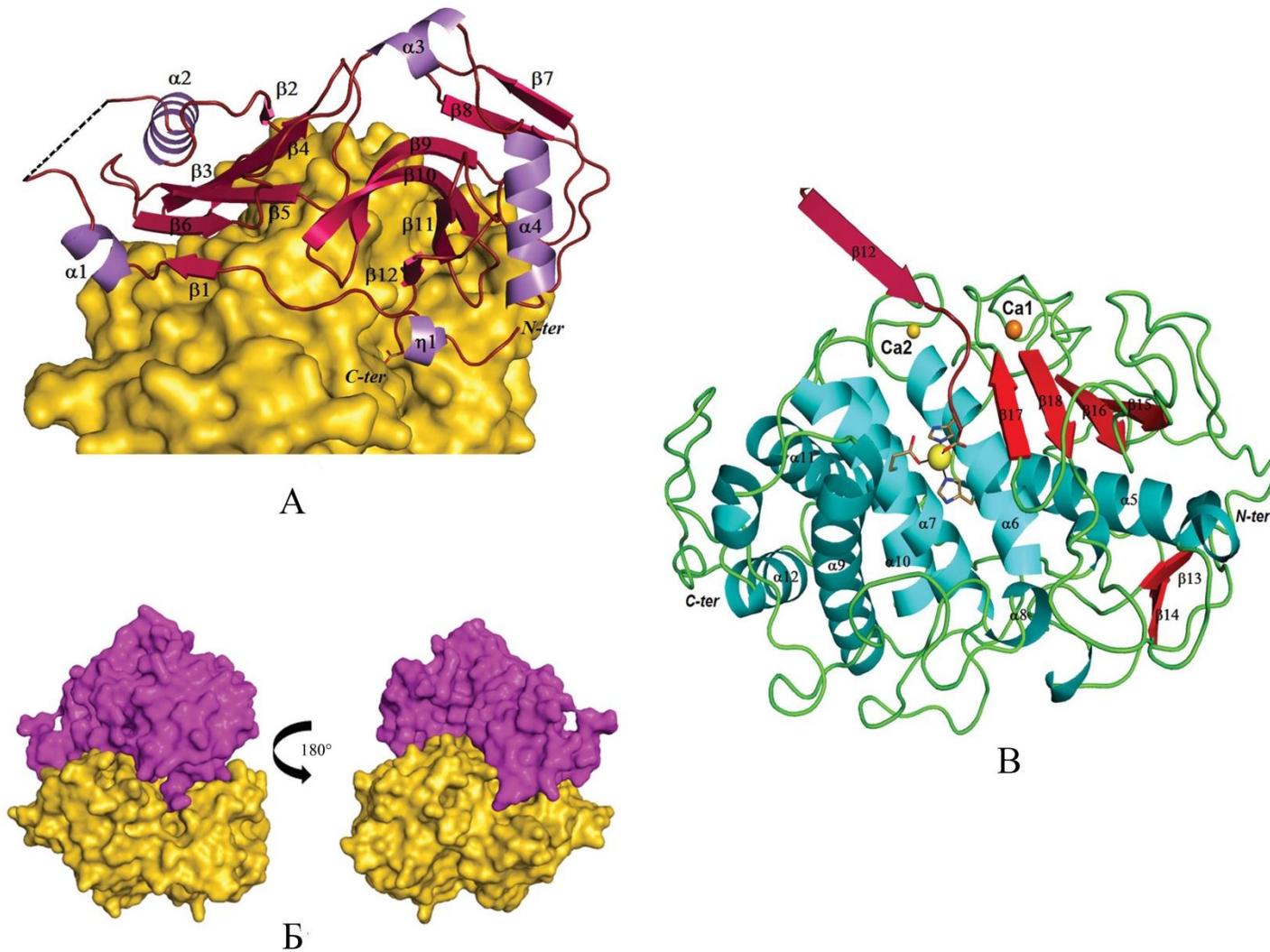


Рис. 3. Схема строения металлопротеаз (на примере секретируемой протеазы микромицета *Aspergillus fumigatus*) [41]:
 А – схема вторичной и третичной структуры пропептидного домена (окрашен оттенками лилового цвета), его ориентация относительно протеазного домена (окрашен желтым цветом);
 Б – общий вид незрелой формы молекулы в разных ракурсах, пропептидный домен окрашен лиловым цветом, протеазный – желтым;
 В – схема вторичной и третичной структуры протеазного домена.

Третичная структура протеазного домена металлопротеаз клана MA может быть относительно разнообразной. Как правило, N-концевой домен имеет шестислойную β -структуру и две расположенные почти перпендикулярно по отношению друг к другу α -спирали, одна из которых несет элементы Zn-связывающего мотива. C-концевой домен состоит преимущественно из α -спиралей, его структура более вариабельна и содержит меньше консервативных элементов. Как правило, металлопротеазы этого клана дополнительно содержат два кальций-связывающих домена и две дисульфидные связи, которые стабилизируют молекулу фермента [41].

По оптимуму pH-активности металлопротеазы микромицетов являются нейтральными либо слабощелочными, поэтому активно используются в тех отраслях промышленности, где протеолитические реакции проводятся в нейтральных и щелочных условиях. Хорошо известна способность многих металлопротеаз эффективно расщеплять трудноразлагаемые фибриллярные белки, такие как коллаген, эластин и кератин, что делает эти ферменты особенно важными для кожевенной промышленности, а также косметологии и медицины [42, 43].

1.2.3. Субтилизиновые протеазы

Субтилизиновые протеазы среди секретируемых протеолитических ферментов мицелиальных грибов встречаются чаще всего. Они относятся к подсемейству S8A семейства S8 клана SB по MEROPS и имеют характерные особенности строения молекулы, которые свойственны всем ферментам этой группы, в том числе и бактериальным субтилизиновым протеазам (рис. 4).

подавляющее большинство секретируемых субтилизиновых протеаз в незрелой форме имеют на N-конце полипептидной цепи сигнальную последовательность и пропептидный домен, необходимые для секреции и правильного сворачивания фермента, которые отщепляются в процессе созревания молекулы. Пропептидный домен имеет высококонсервативные элементы β -структуры, которые взаимодействуют с двумя α -спиралями протеазного домена. Зрелая форма субтилизиновых протеаз (протеазный домен), в отличие от аспартильных и металлопротеаз, имеет однодоменное строение без выраженных субдоменов. Многие элементы протеазного домена, определяющие структуру молекулы, также высококонсервативны [44-47].

Активный центр субтилизиновых протеаз имеет вид щели, расположенной на поверхности протеазного домена. Каталитический центр образован тремя аминокислотами, называемыми каталитической триадой, – серином (Ser), гистидином (His) и аспарагиновой кислотой (Asp). Функцию нуклеофила, атакующего карбонильный атом гидролизуемой пептидной связи субстрата, выполняет гидроксильная группа серина, гистидин выступает в качестве донора протона, а аспарагиновая кислота обеспечивает правильную ориентацию имидазольного кольца гистидина во время катализа. Ферментативная активность субтилизиновых протеаз необратимо ингибируется PMSF за счет ковалентной модификации гидроксильной группы серина, входящего в состав каталитической триады [48-50].

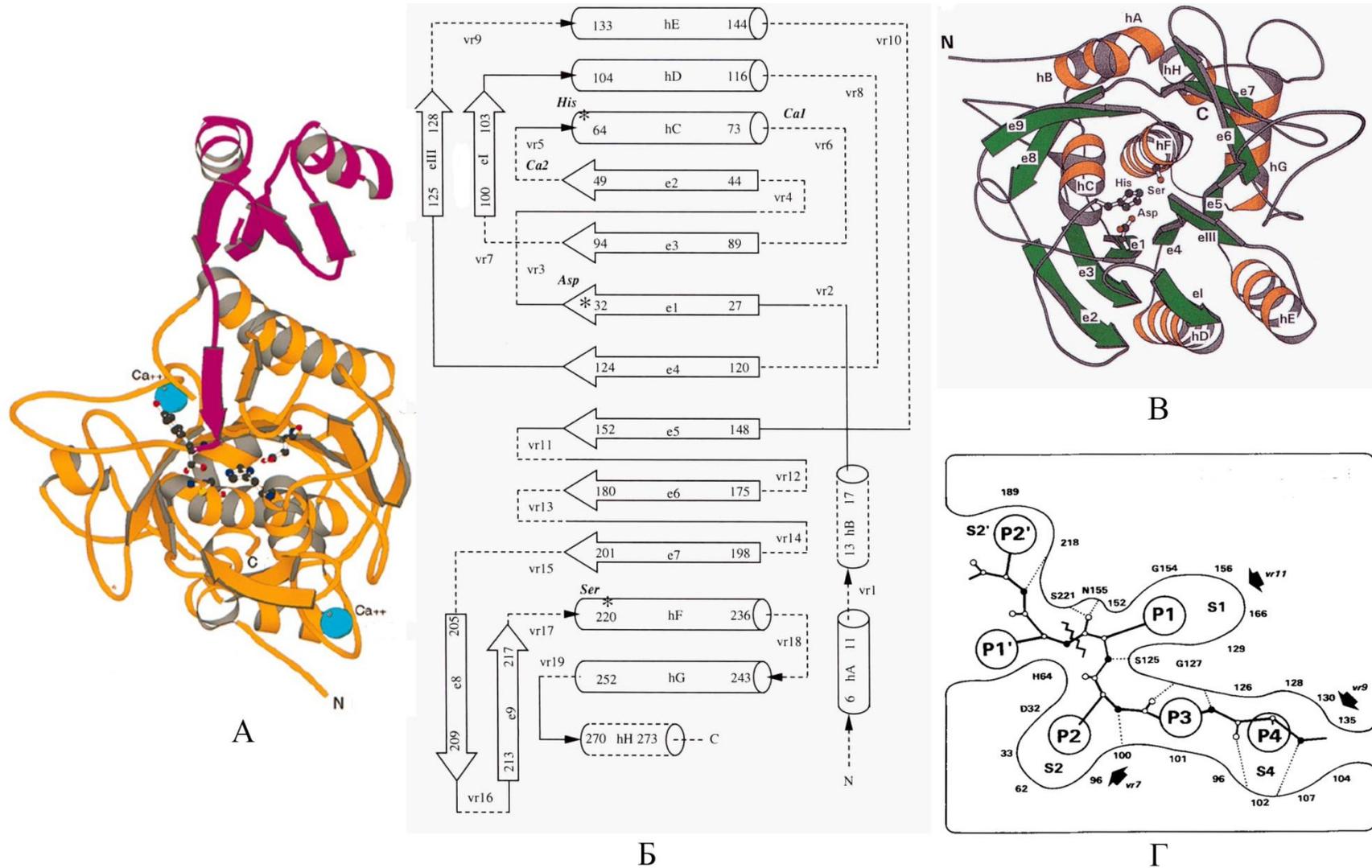


Рис. 4. Схема строения субтилизиновых протеаз (на примере субтилизина E) [49, 50]:
 А – схема вторичной и третичной структуры пропептидного (лиловый) и протеазного (оранжевый) доменов;
 Б – схема элементов вторичной структуры протеазного домена;
 В – схема третичной структуры протеазного домена;
 Г – схема субстрат-связывающего центра.

Субтилизиновые протеазы широкоспецифичны. Их специфичность по отношению к субстратам определяется структурой переменного субстрат-связывающего центра, в котором принято выделять шесть сайтов (карманов). Основной вклад в специфичность вносят крупные сайты S_1 и S_4 , которые у большинства субтилизиновых протеаз гидрофобные, в связи с чем они обладают высоким сродством к субстратам, имеющим крупные гидрофобные аминокислоты в положениях P_1 и P_4 . Однако ряд субтилизиновых протеаз, в том числе секретируемых микромицетами, несут ряд замен в сайте S_1 , что приводит к появлению специфичности по отношению к субстратам, несущим крупные щелочные аминокислоты в положении P_1 . Такие протеазы нередко обладают высоким сродством к так называемым мотивам пептидов активации, в которых несколько щелочных аминокислот располагаются подряд [50-52].

Субтилизиновые протеазы проявляют свою активность при щелочных условиях рН реакционной среды, поэтому очень востребованы во многих отраслях промышленности. Среди наиболее известных областей их использования можно отметить индустрию детергентов (от стиральных порошков до растворов для очистки контактных линз и зубных протезов), кожевенную промышленность (обработка сырых кож: вымачивание, зольение, обезволивание, обеззоливание, обезжиривание и пикелевание), пищевую отрасль (хлебопечение, приготовление пищевых гидролизатов бобовых, производство соевого соуса), пептидный синтез, косметологию и медицину (заживление ран, рубцов, лечение пищеварительных расстройств), переработку трудноразлагаемых отходов [53-55].

1.2.4. Консервативные мотивы протеаз микромицетов рода *Aspergillus*

Среди микромицетов-продуцентов секретируемых протеаз мицелиальные грибы рода *Aspergillus* являются одними из наиболее известных источников разнообразных протеолитических ферментов. В связи с этим, для удовлетворения быстро растущих потребностей промышленности в протеазах, поиск, получение и исследование новых протеолитических ферментов микромицетов рода *Aspergillus* является актуальной научно-исследовательской и прикладной задачей [56-58].

Исследование последовательностей известных протеаз микромицетов рода *Aspergillus* при помощи биоинформатических методов анализа позволило выявить ряд высококонсервативных мотивов, встречающихся у большого числа секретируемых аспартильных (табл. 2) и субтилизиновых (табл. 3) протеаз. Они соответствуют элементам основных структурных доменов, определяющих классовую принадлежность ферментов и обеспечивающих их функционирование. Эти мотивы могут быть использованы при дизайне праймеров и зондов для молекулярно-генетических исследований новых протеолитических ферментов, полноразмерная последовательность которых не известна [59, 60].

Таблица 2. Консервативные аминокислотные последовательности аспартильных протеаз микромицетов рода *Aspergillus*

№	Длина	Последовательность
1	29	LAILGDAFLRKWYVVYDLGNPRLGFAKQK
2	29	VGTPPQKFKVVFDTGSSDLWVFSSECPC
3	50	HNIDAHVRALGQKYM GIRPNIHQELLEENPINDMSRHDVLVDNF LNAQYF
4	50	DCDKRDSLPLDTFTLAGHNFTIGPYDYTLEVQGSCISAFMGMDFP EPVGP
5	50	FAFGRFDGILGLGYDTISV NKIVPPFY NMLDQGLLDEPVFAFYLG DTNKE
6	50	FSSINTVQPKPQTTFD TVKSQLDSPLFAVTLKHHAPGTYDFGYID HSKY

7	50	HYTGELIKIPLRRKAYWEVDFDAIALGDNVAEMENTGVILDTGTS LIALP
8	21	SSSTYKKNGYEWAIKYGDGSH
9	50	YVFPCSTKLPDFTVVIGDYKAVVPGKYINYAPVTEGSSTCYGGIQ SNSGL
10	29	SGFVYQDVTIGDVKVQKQAFEEATKIPG

Таблица 3. Консервативные аминокислотные последовательности субтилизиновых протеаз микромицетов рода *Aspergillus*

№	Длина	Последовательность
1	50	ASFSNYGKVVDIFAPGQDILSCWIGSTTATNTISGTSMATPHIVGL SCYL
2	41	HVEEDQIWYLDALTTQKGAPWGLGSISHKGQQSTDYIYDTS
3	50	SVKVFQGESSTSIILDGFNWAANDIVSKKRTKKAANMSLGGGY SYAFN
4	44	ETRRAAEKIPGKYIVTFKPGIDEAKIQEHTTWATNIHQRNLERR
5	29	GEGTYAYVVDSGINVDHEEFEGRASKAYN
6	41	VENAFEQGVLSVVAAGNENS DACQTSPASAPNALTVAAIQK
7	41	TTGGDPPVGIERNYKIKDFAAYAGSFDDATIEEIRKNEDVA
8	29	HVDSIGHGTHCAGTIGGKTYGVAKKTNLL
9	41	MALENLDGPAAVTKRIKELATKDVVKDVKGSPNLLAYNGNA
10	21	MQSIKRTL LLLGAILPAVFGA

1.3. Получение протеолитических ферментов микромицетов в промышленности

Высокий спрос на протеолитические ферменты в различных отраслях промышленности стимулирует активное развитие методов их получения, направленное на увеличение выхода, повышение чистоты и снижение стоимости конечного ферментного препарата. Это универсальные биотехнологические подходы, которые индивидуально оптимизируются в зависимости от особенностей конкретного продуцента, оснащения и технических возможностей производственной площадки [61, 62].

1.3.1. Оптимизация условий культивирования

Глубинное культивирование микромицета-продуцента является традиционным и наиболее распространенным способом получения широкого спектра биотехнологических продуктов, в том числе протеаз. Как следует из самого названия этого метода, при глубинном культивировании выращиваемый организм находится в толще жидкой питательной среды. Правильный подбор и оптимизация состава питательной среды для глубинного культивирования является ключевым фактором успеха всего технологического процесса [63, 64].

Основными компонентами питательных сред для культивирования микромицетов являются углеводы, источники азота, а также соли макро- и микроэлементов. Для снижения стоимости конечного продукта стараются по возможности использовать в качестве компонентов питательной среды доступное сырье, такое как меласса, сусло, сахароза, крахмал и т.п. Чтобы добиться высокого уровня секреции протеолитических ферментов, обязательно включают в состав среды источники азота белковой природы, такие как гидролизат рыбной муки, пептон, триптон, дрожжевой экстракт, для усвоения которых продуценту необходимо секретировать протеазы [64, 65].

Первоначальное значение рН питательной среды зависит от ее состава, но изменяется в процессе культивирования продуцента. Как правило, мицелиальные грибы способны расти в широком диапазоне значений рН питательной среды, однако для культивирования некоторых представителей необходимо поддерживать определенное значение рН на протяжении всего процесса. Нередко на начальном этапе культивирования мицелиальных грибов выбирают слабокислые значения рН питательной среды, при которых замедляется рост бактерий, способных помешать технологическому процессу [66, 67].

Помимо состава и рН питательной среды, для глубинного культивирования имеет значение ряд других факторов. В частности, существенную роль играют температура, давление, интенсивность аэрации, скорость перемешивания, качество исходного посевного материала. Немаловажными являются также тип, особенности строения и дизайна ферментационного оборудования, на котором проводится технологический процесс [67].

Поскольку на конечный результат глубинного культивирования оказывает влияние множество факторов, для оптимизации процесса исследуют влияние изменения одного из параметров при постоянстве остальных. Такой эмпирический способ позволяет последовательно установить наиболее подходящие значения для каждого из параметров и найти их наилучшую комбинацию. Данный подход получил широкое распространение в современной биотехнологической промышленности [67, 68].

Альтернативным способом выращивания мицелиальных грибов в качестве продуцентов биотехнологических продуктов является твердофазное культивирование. При твердофазном культивировании рост продуцента происходит на поверхности твердых частиц увлажненного носителя, которые колонизируются гифами мицелия. В качестве субстратов твердой фазы используют как разлагаемые природные носители, такие как отруби зерновых

культур, жмых, кокосовое волокно, багасса, так и неразлагаемые (пенополиуретан, перлит, вермикулит) [69, 70].

Преимуществами твердофазного культивирования являются быстрый рост и увеличенная производительность продуцента, растущего на большой суммарной площади поверхности частиц носителя при относительно небольшом его суммарном объеме. Активность воды в таких условиях снижена, что уменьшает вероятность роста контаминантных бактерий. Условия твердофазного культивирования имитируют естественную среду обитания мицелиальных грибов, что делает возможным совместное одновременное выращивание нескольких продуцентов. Основным недостатком твердофазного культивирования является необходимость использования биореакторов особого строения и сопутствующие этому сложности при масштабировании технологического процесса [71-73].

1.3.2. Иммобилизация продуцента

Иммобилизация продуцента получила широкое распространение в современной биотехнологической промышленности. Это технологический прием, направленный на включение клеток (спор) продуцирующего микроорганизма в гранулы иммобилизирующего носителя (агента). При последующем культивировании рост продуцента происходит внутри таких гранул, а не в глубине питательной среды, и выращиваемый микроорганизм оказывается иммобилизованным в гранулах носителя [74-76].

Используемый в качестве иммобилизирующего агента носитель должен обеспечивать технологически простую для осуществления процедуру иммобилизации, обладать достаточной механической прочностью и иметь невысокую рыночную стоимость. Важное значение имеет выживаемость клеток иммобилизуемого организма в процессе проведения процедуры, правильно подобранный носитель и протокол проведения иммобилизации не должны приводить к их существенной гибели. Наиболее часто в качестве носителей для

иммобилизации микромицетов используют акриламид, альгинат и каррагинан [77-79].

Альгинат и каррагинан представляют собой полисахариды, получаемые из водорослей, акриламид – синтетическое органическое соединение, способное к полимеризации в длинные цепи. Все эти соединения имеют сравнительно доступную рыночную стоимость и обладают способностью к формированию гелей с высокой механической прочностью и химической стабильностью. Образование гелей не сопровождается нагреванием до высоких температур и воздействием экстремально высоких или низких значений pH, что обеспечивает хорошую выживаемость клеток микроорганизмов при иммобилизации в таких носителях [80, 81].

Основными преимуществами использования иммобилизации в технологическом процессе является повышенная стабильность иммобилизованного продуцента, защищенность от неблагоприятных факторов окружающей среды, что делает возможным его многократное использование в нескольких циклах культивирования. Часто наблюдается увеличенная продуктивность иммобилизованного продуцента по сравнению с традиционным культивированием свободнорастущего штамма. Кроме этого, иммобилизация существенно облегчает процесс отделения биомассы от культуральной жидкости после окончания культивирования [82-84].

Среди недостатков иммобилизации можно выделить ее плохую переносимость некоторыми организмами, что приводит к снижению выхода целевого продукта. В таких случаях использование иммобилизации в технологическом процессе нецелесообразно. Однако следует отметить, что большинство промышленных продуцентов хорошо переносят процедуру иммобилизации [85-87].

1.3.3. Особенности очистки секретируемых протеаз микромицетов

После окончания культивирования и отделения биомассы продуцента получают культуральную жидкость, которая, помимо целевого фермента, содержит остатки компонентов питательной среды и различные продукты метаболизма культивируемого микромицета. Как правило, культуральная жидкость имеет большой объем, при этом целевой фермент находится в относительно невысокой концентрации. Помимо этого, протеолитические ферменты в большинстве случаев нестабильны при хранении в такой форме и быстро теряют свою активность. Стадии очистки направлены на концентрирование целевого фермента, его отделение от примесных компонентов, а также переводение в стабильную форму, которая наиболее удобна для дальнейшего хранения, транспортировки и использования [88, 89].

Конечная степень очистки фермента зависит от области его использования. Самые высокие требования к степени очистки предъявляются в фармацевтической отрасли, при этом стоимость производства таких ферментных препаратов наиболее высока. В то же время, в тех сферах промышленного применения, где первостепенное значение имеют низкая стоимость и доступность ферментного препарата (индустрия детергентов, кожевенная промышленность и т. д.), обычно используют не более одной-двух стадий грубой очистки фермента [89, 90].

Весь технологический процесс очистки фермента в большинстве случаев можно рассматривать как комбинацию стадий осаждения и хроматографического разделения. Выбор конкретных методов для каждой стадии зависит от природы и свойств фермента и примесных компонентов, а также конечных целей относительно выхода по удельной ферментативной активности, чистоте и желаемой готовой формы получаемого ферментного препарата. Подбор оптимальных условий осуществляется эмпирически [91-93].

Осаждение является способом грубой очистки, концентрирования и стабилизации целевых ферментов. Наиболее распространенными вариантами практической реализации этого способа в промышленности является высаливание сульфатом аммония (значительно реже – другими солями) и осаждение органическими растворителями (ацетон, метанол, этанол). Как правило, именно осаждение чаще всего является первой стадией очистки секретируемых протеаз из культуральной жидкости, поскольку позволяет быстро сконцентрировать целевой фермент и отделить значительное количество примесных компонентов. Также достаточно широкое распространение получило применение осаждения на заключительном этапе очистки для стабилизации ферментного препарата. В то же время, на промежуточных этапах очистки между стадиями хроматографии осаждение применяется достаточно редко [94, 95].

Хроматографическое разделение играет ключевую роль в процессе очистки и обеспечивает достижение требуемой степени чистоты получаемого ферментного препарата. Хроматография используется в процессе очистки практически всегда, за исключением производства низкоочищенных ферментных препаратов, где для снижения их стоимости выполняют только одну стадию осаждения. В зависимости от поставленных задач, для достижения необходимой степени очистки используют одну или несколько последовательных стадий хроматографии с разными носителями и условиями проведения процесса [96-98].

Чаще всего используют ионообменную и гидрофобную хроматографию, а также гель-фильтрацию. Способность к связыванию с ионообменными и гидрофобными сорбентами зависит от зарядовых и гидрофобных свойств молекул целевого фермента и примесей. Ионообменные хроматографические сорбенты являются наиболее доступными по цене, поэтому при возможности стараются использовать именно их. Однако некоторые белки демонстрируют плохое связывание с этими носителями, что требует проведения дополнительных стадий очистки на гидрофобных сорбентах. Гель-фильтрацию используют для

разделения молекул в зависимости от их размера и быстрой смены хроматографического буфера [98-100].

Также известно об успешной хроматографической очистке протеолитических ферментов с использованием аффинных сорбентов со специфическими лигандами, такими как бензамидин и бацитрацин. Эти лиганды являются конкурентными ингибиторами ряда протеаз, которые связываются с ними в процессе хроматографии. Главным недостатком этого метода является неспособность многих протеаз прочно связываться с аффинными лигандами из-за различной субстратной специфичности [101-104].

1.3.4. Получение протеаз микромицетов в рекомбинантной форме

Благодаря активному развитию биотехнологии получение ферментов в рекомбинантной форме с использованием генно-инженерных методов приобрело большую популярность. Современные технологии рекомбинантного синтеза позволяют получать целевые ферменты с высоким выходом, нередко превышающим традиционные способы получения, особенно в тех случаях, когда исходный продуцент очень требователен к условиям культивирования. Еще одним важным преимуществом получения рекомбинантных ферментов является относительная простота их очистки, что требует меньших трудозатрат при разработке методик. Для получения рекомбинантных форм протеаз микромицетов применяют бактериальную и дрожжевую экспрессионные системы [105-108].

Для получения рекомбинантных ферментов в бактериальной экспрессионной системе обычно используют специальные штаммы кишечной палочки *Escherichia coli*, адаптированные для этих целей. В зависимости от дизайна способа экспрессии целевой белок в таких системах может как накапливаться внутри экспрессионной клетки, так и секретироваться в периплазматическое пространство. Как правило, наибольший выход в таких системах наблюдается при накоплении целевого белка внутри клетки. Часто из-за очень высокой скорости синтеза целевой белок не успевает сформировать

правильную функциональную форму, и накапливается в виде нерастворимых тел включения. В таком случае для получения функционально активного белка проводят процедуру рефолдинга, в процессе которого происходит переход из нерастворимых тел включения в растворимую форму [109-112].

В дрожжевой экспрессионной системе также используют специальные штаммы дрожжей, чаще всего это представители видов *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica* и *Arxula adenivorans*. Целевой фермент в данном случае секретируется в среду культивирования и накапливается в ней, нередко в высоких концентрациях. Так, известно о получении протеиназы К в дрожжевой экспрессионной системе с выходом в 8 грамм фермента с литра культуры [113]. Еще одним преимуществом дрожжевой экспрессионной системы перед бактериальной является возможность получения в ней белков с эукариотическими посттрансляционными модификациями. В то же время, получение дрожжевых экспрессирующих линий требует больше трудозатрат по сравнению с бактериальными [114-116].

Начальным этапом рекомбинантной экспрессии является получение молекулярно-генетических конструкций на основе бактериальных или дрожжевых векторов (плазмид), несущих кодирующую последовательность целевого белка. Практика получения рекомбинантных секретируемых протеаз микромицетов свидетельствует о необходимости сохранения пропептидного домена в экспрессионной конструкции, поскольку его отсутствие часто приводит к снижению выхода активного фермента. Это связано с важной ролью пропептидного домена в правильном сворачивании протеазы и формировании пространственной структуры ее активного центра. В то же время, экспериментально показана способность чужеродных сигнальных пептидов подавлять рекомбинантную экспрессию, поэтому кодирующие их фрагменты при получении экспрессионных конструкций удаляют [117-120].

Широкой популярностью при получении рекомбинантных ферментов пользуется внедрение дополнительных коротких концевых последовательностей для упрощения детекции и очистки синтезируемого фермента. Чаще всего используют концевую последовательность из шести остатков гистидина (*His-tag*), которая способна связываться с дивалентными ионами металлов. Это дает возможность проводить аффинную хроматографическую очистку целевых белков на хелатирующих сорбентах, что позволяет значительно повысить качество очистки и снизить ее трудоемкость [121-124].

1.4. Гемостаз и система свертывания крови

Система гемостаза обеспечивает регуляцию жидкого состояния крови и включает в себя первичный гемостаз, заключающийся в активации тромбоцитов и образовании тромбоцитарного тромба (тромбоцитарной пробки), и вторичный гемостаз, включающий процессы свертывания крови, предотвращения распространения тромба и растворения тромба [125-127].

Свертывание крови – это защитный механизм, предназначенный для предотвращения кровотечений при крупном повреждении кровеносных сосудов, когда тромбоцитарной пробки недостаточно для его остановки. В процессе свертывания крови формируется плотный фибриновый сгусток, останавливающий кровотечение. Свертывание крови представляет собой ферментативный процесс, в котором принимает участие комплекс белков, находящихся в плазме крови (плазменные факторы коагуляции). Большинство из этих факторов является проферментами и обозначается римскими цифрами (фактор I, II и т. д.). Активация плазменных факторов происходит под действием протеолиза с отщеплением ингибиторных пептидных фрагментов. Для обозначения активированных плазменных факторов рядом с римской цифрой добавляют букву «а»: фактор Ia, IIa и т. д. В зависимости от синтеза, принято

различать витамин-К-зависимые факторы, образуемые преимущественно в печени при участии витамина К, и витамин-К-независимые, для синтеза которых витамин К не требуется. Краткая характеристика плазменных факторов коагуляции представлена в таблице 4 [128-130].

Таблица 4. Краткая характеристика плазменных факторов коагуляции

Номер	Название фактора	Тип молекулы
I	Фибриноген	Белок
II	Протромбин	Гликопротеин
III	Тромбопластин, или тканевой фактор (TF)	Трансмембранный белок
IV	Ионы Ca ²⁺	Дивалентный катион
V	Акселератор-глобулин	Белок
VII	Проконвертин	Гликопротеин
VIII	Антигемофильный глобулин А (АГГ)	Гликопротеин
IX	Фактор Кристмаса, антигемофильный фактор В	Гликопротеин
X	Фактор Стюарта-Прауэра	Гликопротеин
XI	Плазменный предшественник тромбопластина	Гликопротеин
XII	Фактор Хагемана, или фактор контакта	Белок
XIII	Фибринстабилизирующий фактор (ФСФ), фибриназа	Белок
-	Фактор Флетчера, прекалликреин	Белок
-	Фактор Фицджеральда, высокомолекулярный кининоген (ВМК)	Белок

Принято выделять три фазы свёртывания крови: образование протромбиназы, превращение протромбина в тромбин и превращение

фибриногена в фибрин. Общая схема реакций свертывания крови представлена на рисунке 5 [131-133].

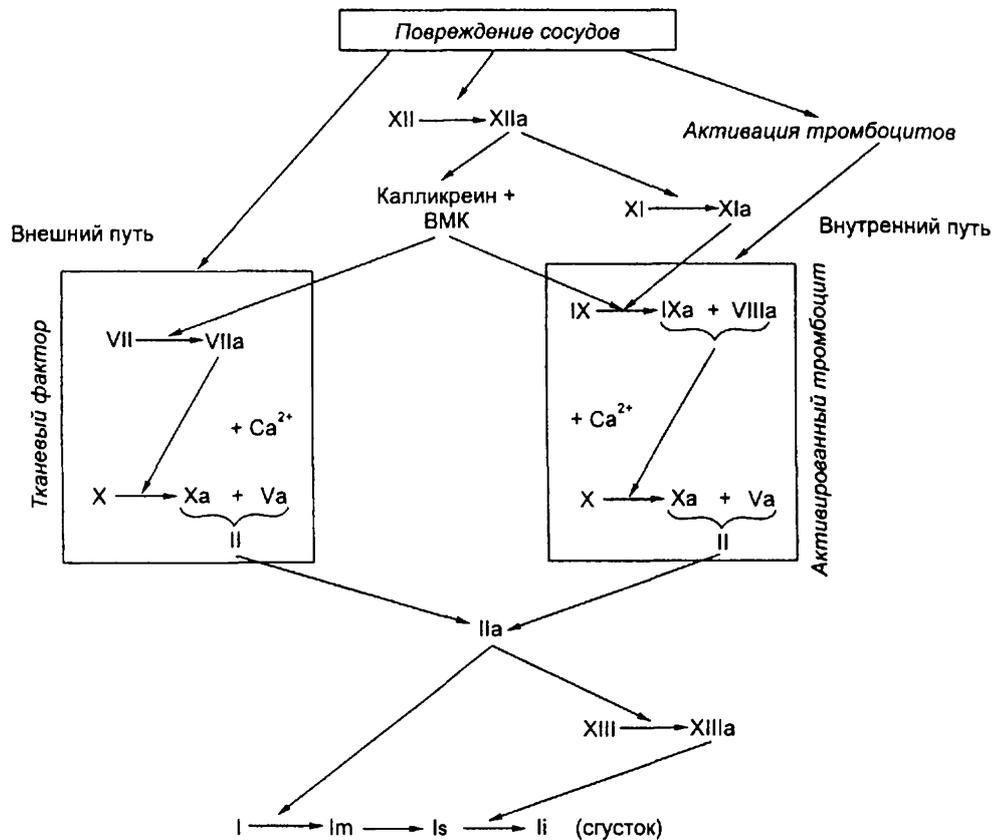


Рис. 5. Общая схема реакций свертывания крови [133].

Образование протромбиназы в первой фазе может идти по внешнему или внутреннему механизму. Обязательным условием внешнего пути является присутствие тромбопластина (ТФ, фактор III). При участии этого фактора происходит активация фактора VII под действием факторов XIIa, IXa, Xa и калликреина. Далее фактор VIIa активирует фактор X, а также IX, дополнительно усиливая образование протромбиназы по внутреннему механизму. Инициатором внутреннего пути образования протромбиназы является фактор XII, который активируется поврежденной поверхностью стенки сосуда, коллагеном, адреналином, после чего переводит фактор XI в XIa. В этой реакции дополнительно участвуют калликреин (также активируется фактором XIIa) и

ВМК (активируется калликреином). Фактор XIa, в свою очередь, активирует фактор IX, после чего образующийся фактор IXa при обязательном участии фактора VIIIa активирует фактор X. Активация фактора X во внутреннем пути образования протромбиназы происходит на поверхности фосфолипидов тромбоцита, комплекс факторов IXa и VIIIa на мембране тромбоцита называется теназным. Благодаря калликреину и ВМК объединяются внешний и внутренний пути свертывания крови [134-136].

Вторая фаза свертывания крови происходит под влиянием протромбиназы (комплекса Xa + Va) и является протеолитическим расщеплением протромбина (фактора II), благодаря которому появляется тромбин (фактор IIa), обладающий свертывающей активностью. Он дополнительно способствует необратимой агрегации тромбоцитов, активации факторов V и VII, что значительно ускоряет образование протромбиназы по внешнему и внутреннему пути [137].

Третья фаза свертывания крови – переход фибриногена в фибрин – происходит в три стадии. На первой стадии под действием тромбина происходит отщепление от фибриногена 2 фибринпептидов A и 2 фибринпептидов B, в результате чего формируются фибринмономеры (фактор I_m). Во второй стадии происходит полимеризация фибринмономеров с образованием протофибрилл легкорастворимого фибрина, или фибрина s (I_s, soluble), чувствительного к воздействию протеаз (плазмина, трипсина). Далее, в третьей стадии, под действием фибринстабилизирующего фактора (ФСФ, фибриназа, фактор XIII, активируется тромбином) в присутствии ионов Ca²⁺ формируются перекрестные сшивки между фибринполимерами с образованием труднорастворимого фибрина i (I_i, insoluble). Сгусток из этого фибрина резистентен к протеолизу и трудно поддается разрушению. Благодаря входящим в его структуру тромбоцитам он дополнительно сокращается, упрочняется и прочно закупоривает поврежденный кровяной сосуд [137, 138].

1.5. Антикоагулянтная система протеина С

Протеин С (РС) – витамин-К-зависимый белок, образующийся в печени и эндотелии в виде неактивного одноцепочечного профермента. Также обнаружен в почках, яичках, кератиноцитах кожи, мозге и легких. В активной форме обладает свойствами сериновой протеазы, инактивирует факторы Va и VIIIa, стимулирует фибринолиз и прерывает тромбиногенез. Был получен в 1969 году из продуктов протеолиза тромбином белков протромбинового комплекса в лаборатории биохимии и физиологии свертывания крови МГУ. В 1976 году был очищен в лаборатории Дж. Стенфло и назван протеином С, поскольку при хроматографии белок элюировался третьим по счету [139-141].

Профермент состоит из нескольких доменов (рис. 6): отрицательно заряженного аминоконцевого; двух доменов, подобных эпидермальному фактору роста (EGF); связывающего дипептида (Lys¹⁵⁶-Arg¹⁵⁷); пептида активации и трипсиноподобного протеазного (SP) домена на карбоксильном конце молекулы. После синтеза профермент претерпевает следующие посттрансляционные модификации [141, 142]:

1. Выщепление связывающего дипептида Lys¹⁵⁶-Arg¹⁵⁷ и превращение одноцепочечной формы в двух цепочечную молекулу, состоящую из тяжелой и легкой цепей, соединенных дисульфидной связью;
2. Дополнительное γ -карбоксилирование девяти остатков глутаминовой кислоты N-конца легкой цепи РС и образование Gla (Гла)-домена;
3. Гидроксилирование остатка Asp в EGF1 домене;
4. Гликозилирование.

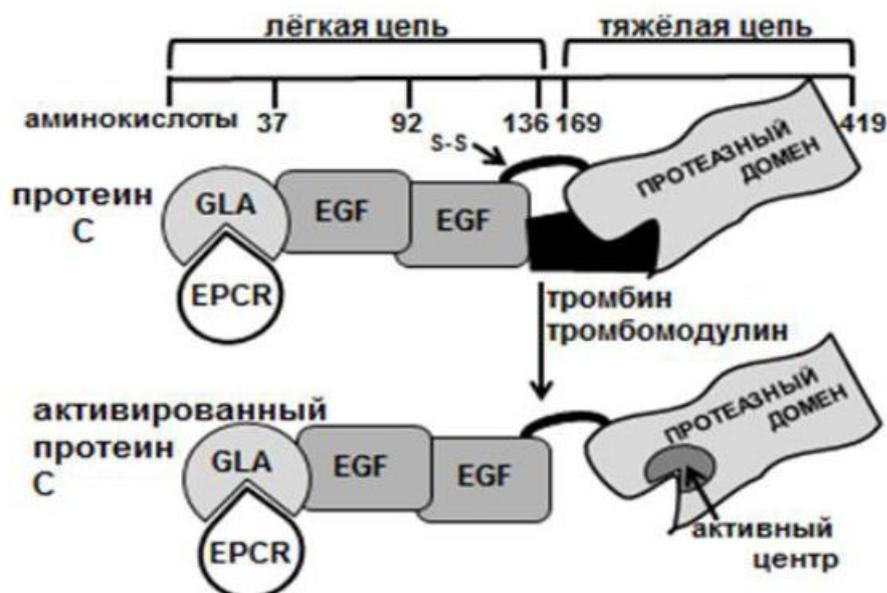


Рис. 6. Доменная структура протеина С и активированного протеина С [141].

В тяжелой цепи протеина С находится пептид активации, отщепляемый тромбином в комплексе с тромбомодулином, и трипсиноподобный протеазный домен. В протеазном домене молекулы после отщепления пептида активации формируется активный центр. Легкая цепь отвечает за связывание с мембраной клетки или эндотелиальным рецептором протеина С (EPCR) через Gla-домен [143, 144].

1.6. Определение активности протеина С в крови человека

Поначалу клинические определения содержания протеина С в плазме крови человека выполняли при помощи иммуноферментных методов анализа с использованием антител к протеину С. Данные методы позволяют оценивать количество протеина С в анализируемых образцах, однако не позволяют судить о его функциональной активности. В связи с этим далее были разработаны методы,

позволяющие селективно оценивать функциональную активность протеина С в плазме крови человека, что очень важно для медицинских и диагностических целей [145-147].

Принцип методов, оценивающих именно функциональную активность протеина С в крови, заключается в измерении параметров, на которые влияет активный протеин С. В настоящее время такими параметрами является время свертывания (clotting time) и появление окрашенных продуктов реакции расщепления специфических к активному протеину С хромогенных субстратов. Методы определения активности протеина С, основанные на измерении указанных параметров, называются соответственно клоттинговым и хромогенным [148, 149].

Поскольку протеин С в крови находится в неактивной форме, для измерения функциональной активности необходимо перевести его в активированную форму. Для этого используют активаторы протеина С. Действие активаторов протеина С при этом должно быть быстрым и специфичным, иначе определение функциональной активности протеина С с использованием таких активаторов будет технически сложной задачей. В настоящее время известно, что этим двум требованиям обладают активаторы из ряда змей, таких как *Agkistrodon contortrix contortrix*, *Agkistrodon contortrix mokasen*, *Agkistrodon contortrix pictigaster*, *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, *Agkistrodon bilineatus*, *Agkistrodon saxatilis*, *Gloydius blomhoffi ussuriensis*, *Gloydius halys halys*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops pradoi*, *Vipera lebetina*, *Daboia russelli*, *Cerastes cerastes*, *Trimeresurus mucrosquamatus* [150-153].

Наиболее известным, хорошо изученным и широко используемым в диагностических целях активатором протеина С является активатор из яда *Agkistrodon contortrix contortrix* (UniProt P09872), выпускаемый швейцарской компанией «Pentapharm» под торговой маркой «Protac[®]», а также самостоятельно получаемый из змеиного яда компаниями-производителями диагностикумов. Он

представляет собой гликозилированный на 16% белок с изоэлектрической точкой в области рН 6,3, состоящий из 231 аминокислоты с подсчитанной суммарной молекулярной массой 25 кДа (молекулярная масса, определяемая электрофоретически, составляет 37-40 кДа из-за иной подвижности гликопротеина). Активный центр белка составляет каталитическая триада His⁵⁷, Asp¹⁰² и Ser¹⁹⁵, важную роль в активации протеина С также играют положительно заряженные углеводные части гликопротеина. По своему строению активатор протеина С из яда *Agk. contortrix* является трипсиновой протеазой и показывает много гомологий с другими сериновыми протеазами из яда змей. Наличие трех сайтов гликозилирования и шести дисульфидных мостиков делает затруднительным получение данного активатора рекомбинантным способом. Модель пространственной структуры этого фермента показана на рисунке 7 [154-158].

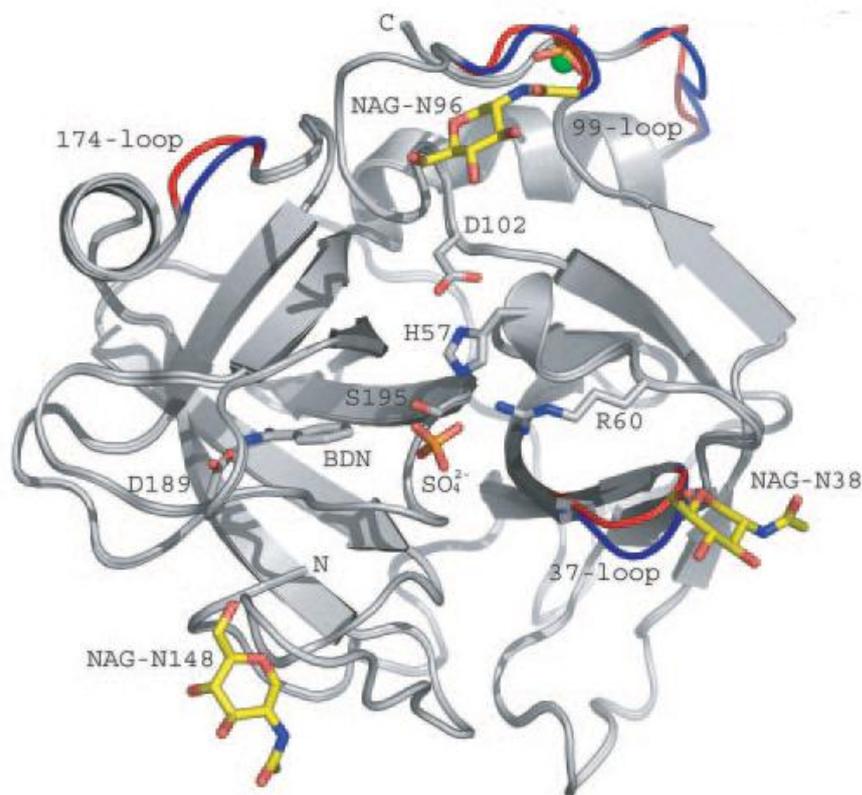


Рис. 7. Модель пространственной структуры активатора протеина С плазмы крови из яда южноамериканского щитомордника *Agk. contortrix contortrix* [158].

1.7. Штамм *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D – продуцент протеазы-активатора протеина С плазмы крови

Аспергиллы, в том числе и *A. ochraceus*, широко распространены в почвах южных регионов, из образцов которых и был выделен штамм-продуцент активатора протеина С. Микробицеты *A. ochraceus* относятся к митоспоровым грибам – анаморфам аскомицентного аффинитета – рода *Aspergillus*, семейства *Trichocomaceae*, порядка *Eurotiales*, класса *Eurotiomycetes*, отдела *Ascomycota*. Они являются космополитными и термотолерантными микроорганизмами, способными расти в широком диапазоне температур от 8 до 55°C с оптимальным ростом при 25-30°C [159].

Новый штамм *A. ochraceus*, предназначенный для получения активатора протеина С, выделен Кураковым А.В. на среду Чапек-агар из образцов погребенной почвы, отобранной в Краснодарском крае (п. Сенной, раскоп древнегреческого города Фанагории), и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ F-4104D. Этот штамм имеет типичные для *A. ochraceus* культурально-морфологические признаки. Колонии на среде Чапека диаметром около 3,5 см бархатистые, обильно спороносящие, охристого и темно-охристого цвета, плоские и со складками, обратная сторона – оранжевато-коричневато-охристого цвета, может иметь красноватые оттенки (рис. 8). Способен образовывать колонии с зонами более светлого мицелия с меньшим спороношением диаметром до 4,5 см и светло-коричневой обратной стороной. Конидиальные головки шаровидные, при старении распадаются на 2-3 компактные колонки. Конидии округлые, гладкие, диаметром 3,5 мкм. Молодой конидиеносец диаметром 4-5 мкм, с возрастом окрашенный, гладкий, диаметром 10 мкм [160, 161].

Штамм *A. ochraceus* ВКМ F-4104D является непатогенным и нетоксичным микроорганизмом, что очень существенно для масштабирования технологических

процессов его культивирования. При внутривенном заражении кроликов не проявляет зоопатогенных свойств. При нанесении экстракта культуры штамма на кожу кролика не вызывает токсической реакции [161].

Активатор протеина С плазмы крови человека, выделяемый штаммом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в среде культивирования, является негликозилированной сериновой протеазой с молекулярной массой около 33 кДа, рI 6,0 и оптимумом активности при рН 8,0-9,0 и температуре 37°C. Протеаза имеет субстратную специфичность, сходную с активатором из яда *Agk. contortrix contortrix*, не расщепляет субстраты трипсиноподобных и химотрипсиноподобных протеаз, а также субтилизина Е. Это позволяет рассматривать активатор протеина С, образуемый *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, как потенциально более доступный для использования в диагностических целях аналог активатора из яда *Agk. contortrix contortrix*. Наглядное сравнение этих активаторов протеина С приведено в таблице 5 [161, 162].



Рис. 8. Штамм микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D [160].

Таблица 5. Сравнение свойств активаторов протеина С из яда *Agk. contortrix contortrix* и *A. ochraceus* ВКМ F-4104D

Свойство	Активатор	
	<i>A. contortrix contortrix</i>	<i>A. ochraceus</i> ВКМ F-4104D
Активация протеина С плазмы крови человека	+	+
Тромбиноподобная активность	+	+
Плазминоподобная активность	-	+
Расщепление субстрата Ха-фактора	+	-
Расщепление субстрата тканевого активатора плазминогена	+	-
Константа Михаэлиса по субстрату тромбина, мМ	1,1	2,3
Молекулярная масса, кДа	36-40	33
Изоэлектрическая точка	6,3	6,0
pH-оптимум для активности	8,4	8,0-9,0
Гликозилирование	+	-

Штамм *A. ochraceus* ВКМ F-4104D хорошо растет на стандартных средах: сусло-агаре, среде Чапека, среде Гетчинсона, глюкозо-пептонной среде при температуре 25°C. Спороношение начинается на 4-5-е сутки, обильно спороносящие колонии формируются к 10-м суткам. Штамм обладает протеолитической (казеинолитической) и целлюлозолитической активностями. Термостабилен, выдерживает прогревание в течение 1 ч до 100°C, растет при температуре до 43°C. Штамм поддерживают на косяках с сусло-агаром 4-5°Б с начальным pH 6,0-6,2 или стандартной среде Чапек-агар при комнатной температуре с пересевом через 1-3 месяца, а при хранении при 5°C – с пересевом через 6-12 месяцев [162, 163].

Были подобраны оптимальные условия культивирования штамма микромицета для наибольшего выхода активатора протеина С. Установлено, что наиболее эффективный синтез активатора протеина С происходит при температуре 28°C, рН около 6,5 и наличии в среде культивирования органических источников азота – пептона и гидролизата рыбной муки. Также было показано, что интенсивность образования штаммом активатора протеина С увеличивается при твердофазном культивировании микромицета на твердых увлажненных субстратах (отрубях) или инертных носителях (пенополиуретан, перлит и др.) с добавлением питательной среды. Максимальный выход при твердофазном культивировании наблюдали при использовании в качестве носителя силикагеля и вермикулита (соответственно в 2,3 и 3,5 раз выше, чем при глубинном культивировании) [163].

1.8. Заключение

Протеазы – группа ферментов класса гидролаз, катализирующих реакции расщепления пептидных связей. В зависимости от входящих в состав их каталитического центра аминокислот выделяют несколько каталитических типов ферментов, которые в высокой степени гомологичны между собой и имеют ряд консервативных доменов, обеспечивающих формирование структуры молекулы. Субстрат-связывающие центры протеаз обычно являются переменными, их пространственное строение определяет субстратную специфичность фермента.

Протеазы представляют собой наиболее востребованную в промышленности группу ферментов. Микромицеты являются важнейшими продуцентами секретируемых протеаз, представляющих большой интерес с точки зрения биотехнологии. Подавляющее большинство секретируемых протеаз микромицетов принадлежат к группам аспартильных, субтилизиновых и металлопротеаз.

Штамм микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D является продуцентом секретлируемой протеазы, способной напрямую активировать протеин С плазмы крови – один из важнейших антикоагулянтных факторов системы гемостаза. Ранее изученные свойства этого фермента позволяют предполагать о перспективности его использования в диагностических и медицинских целях, в частности, в качестве альтернативы используемым в настоящее время активаторам протеина С плазмы крови, получаемым из яда некоторых змей. В связи с этим разработка биотехнологических способов получения секретлируемой протеазы-активатора протеина С, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, является актуальной научно-исследовательской задачей.

Ранее были подобраны оптимальные условия глубинного и твердофазного культивирования штамма-продуцента, необходимые для секреции целевого фермента. В то же время, первичную очистку и исследование фермента проводили методом изоэлектрофокусирования, который хоть и позволяет получать небольшие количества высокоочищенного фермента, но является немасштабируемой технологией. Анализ данных литературы свидетельствует о целесообразности исследования влияния иммобилизации продуцента на образование целевого фермента, а также необходимости разработки условий его хроматографической очистки.

Анализ свойств протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, позволяет предполагать о принадлежности данного фермента к группе субтилизиновых протеаз. Отсутствие у большинства известных секретлируемых субтилизиновых протеаз микромицетов дисульфидных связей и гликозилирования делает возможным их получение в рекомбинантной форме с большим выходом. Установление и исследование первичной последовательности протеазы микромицета *A. ochraceus* позволит получить рекомбинантную форму этого фермента и принесет дополнительные знания о его природе.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Для проведения исследования была использована культура микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Поддержание культуры осуществляли на скошенном сусло-агаре при хранении в комнатных условиях. Для получения посевного материала микромицет выращивали в пробирках на скошенном сусло-агаре 3°Б в течение 7-ми суток при 28°C.

2.2. Глубинное культивирование продуцента

Культивирование проводили в две последовательные стадии по ранее отработанной схеме [8]. На предварительной стадии смыв спор микромицета вносили в посевную среду (состав в %: сусло – 6,7; глюкоза – 1; пептон – 0,1; рН 5,5-6,0) и выращивали в течение 2-х суток, после чего часть биомассы переносили в ферментационную среду (состав в %: глюкоза – 3,5; гидролизат рыбной муки – 1,0; NaCl – 0,2; крахмал – 0,125; пептон – 0,1; K_2HPO_4 – 0,05; MgSO_4 – 0,05; рН 5,5-6,0) для основной стадии культивирования, во время которой происходит наработка протеазы-активатора протеина С. Культивирование проводили в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды, при температуре 28°C, на орбитальной качалке при 200 об./мин в течение 2-х суток.

2.3. Иммобилизация продуцента

2.3.1. Процедура иммобилизации

В качестве иммобилизирующих агентов использовали акриламид, альгинат натрия и каррагинан. С поверхности культуры микромицета делали смыв спор стерильной водой, содержащей 0,0001% Твин-80, после чего смешивали с растворами иммобилизирующих агентов. Полимеризацию акриламида проводили добавлением персульфата аммония и ТЕМЕДа, после чего разрезали полученный гель простерилизованным скальпелем на кубики с размером ребра около 3-5 мм и промывали стерильной водой. Смеси спор с растворами альгината и каррагинана по каплям добавляли к охлажденным 0,3 М CaCl_2 и 2%-ному КСl соответственно, инкубировали в течение 8 ч при 4°C для формирования гранул, после чего промывали стерильной водой. Полученные гранулы иммобилизованного *A. ochraceus* ВКМ F-4104D вносили в питательную среду для дальнейшего культивирования [77-79].

2.3.2. Подбор оптимальных условий для иммобилизации

Для выбора наиболее подходящего носителя проводили культивирование иммобилизованного *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в 4,0%-ном полиакриламиде (состав в %: акриламид – 3,9; метиленбисакриламид – 0,1), 3,5%-ном альгинате и 3,0%-ном каррагинане в ферментационной среде в двух вариантах: с предварительным выращиванием в течение 2-х суток в посевной среде (вариант 1) и без него (вариант 2). Оценивали максимальную активность и динамику образования протеазы-активатора протеина С в культуральной жидкости во время культивирования. Для подбора оптимальной концентрации иммобилизирующего носителя, показавшего лучшие результаты, варьировали ее от 2,5 до 5,5% с шагом в 1%. Культивирование проводили в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды с суммарным объемом гранул иммобилизирующего носителя 25 мл, при температуре 28°C, на орбитальной качалке при 200 об./мин.

2.3.3. Полунепрерывное культивирование иммобилизованного продуцента

Проводили культивирование с подобранными на предыдущем этапе оптимальными параметрами. После выхода активности протеазы-активатора протеина С в культуральной жидкости на постоянный уровень проводили замену питательной среды свежей и продолжали культивирование.

2.3.4. Световая и сканирующая электронная микроскопия

Для изучения влияния иммобилизации на полимерных носителях на морфологию мицелия *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, на 4-е сутки культивирования, в фазу максимальной продукции протеазы-активатора протеина С, отбирали гранулы полимеров, содержащих гифы микромицета.

Световую микроскопию проводили, непосредственно изучая поверхность гранул с помощью микроскопа Микромед-1 («ЛОМО», Россия), оснащенного камерой TOUPCAM UCMOS05100KPA. Для цифровой визуализации и обработки видеоизображения использовали программу TopView.

Для сканирующей электронной микроскопии гранулы фиксировали 2,5%-ым раствором глутарового альдегида в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,3) в течение 12-ти часов и обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации (30-96%). После окончательной дегидратации в абсолютном этаноле гранулы выдерживали 12 часов в 100%-ом ацетоне и высушивали при «критической точке» на установке HCP-2 («Hitachi», Япония). Далее образцы гранул напыляли смесью металлов Au-Pd (Eiko IB-3 Ion Coater, «Hitachi», Япония) и исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA («Jeol», Япония), при ускоряющем напряжении 15 кВ.

2.4. Фракционирование культуральной жидкости продуцента

После окончания культивирования мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через фильтровальную бумагу («ФС», Россия). Протеазу-активатор протеина С осаждали из полученного фильтрата культуральной жидкости сульфатом аммония, подбирая оптимальную для осаждения белка степень насыщения. Для этого к аликвотам культуральной жидкости медленно добавляли кристаллический сульфат аммония, получая различные степени насыщения: 0,5; 0,55; 0,6; 0,65; 0,7; 0,75 и 0,8 (за насыщенный раствор принимали 4,1 М раствор сульфата аммония, содержащий 767 г соли на 1 л), инкубировали в течение 12 ч при 4°C, после чего осадок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 15000 г на роторе JA-20 («Beckman J2-21», Германия). В супернатантах измеряли остаточную активность целевого белка для определения оптимальной для осаждения белка степени насыщения сульфатом аммония.

2.5. Хроматографическая очистка препарата белков культуральной жидкости продуцента

2.5.1. Гидрофобная хроматография

Полученный при осаждении из культуральной жидкости белок, содержащий активатор протеина С, растворяли в 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, содержащим сульфат аммония 0,35 степени насыщения, центрифугировали для удаления нерастворившихся белков при 15000 г в течение 20 мин, после чего супернатант наносили на колонку с фенил-сефарозой CL-4В («GE Healthcare», США), уравновешенной тем же буфером. Элюцию проводили нисходящим градиентом концентрации сульфата аммония в 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, от степени насыщения 0,35 до 0.

2.5.2. Ионообменная хроматография.

Полученные после гидрофобной хроматографии активные фракции, содержащие активатор протеина С, объединяли и наносили для дальнейшей очистки на колонку с ДЭАЭ-сефарозой («GE Healthcare», Швеция), предварительно уравновешенной 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 1,0 М в стартовом буфере.

2.5.3. Гель-фильтрация

Обогащенные целевым белком фракции, полученные после ионообменной хроматографии, объединяли и концентрировали центрифугированием на мембранном фильтре Millipore MWCO 10 кДа («Merck», Германия), после чего наносили для дальнейшей очистки на колонку с Сефадексом G-50 («Pharmacia», Швеция), уравновешенную 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Элюцию проводили тем же буфером. Активные очищенные фракции, содержащие протеазу-активатор протеина С, объединяли для дальнейшего анализа.

2.6. Определение и анализ последовательности протеазы-активатора протеина С плазмы крови

2.6.1. Выделение геномной ДНК из мицелия

500 мг мицелия, полученного после первой стадии глубинного культивирования, замораживали в жидком азоте, после чего гомогенизировали в фарфоровой ступке с добавлением новых порций жидкого азота для охлаждения. Полученный мелкодисперсный гомогенат суспендировали в 600 мкл лизирующего буфера (200 мМ Трис-НСl, рН 8,5; 250 мМ NaCl; 25 мМ ЭДТА; 0,5% SDS) и инкубировали в течение 15 мин при 68°C, с дальнейшим центрифугированием лизата в течение 15 мин при 13000 g и температуре 4°C. К супернатанту добавляли 150 мкл охлажденного 3 М ацетата натрия, рН 5,2, и

инкубировали при температуре -20°C в течение 20 мин, после чего проводили повторное центрифугирование при тех же условиях. К полученному супернатанту добавляли равный объем охлажденного изопропанола, инкубировали при температуре -20°C в течение 30 мин, после чего снова центрифугировали при тех же условиях для осаждения ДНК. Супернатант отбрасывали, а полученный осадок ДНК трижды промывали охлажденным 70%-м этанолом, каждый раз центрифугируя в течение 5 мин (13000 g , 4°C). Полученную ДНК высушивали на воздухе до полного испарения этанола, после чего растворяли в 200 мкл деионизированной воды и хранили при температуре -20°C [164].

2.6.2. Выделение тотальной РНК из мицелия

Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора реактивов ExtractRNA («Евроген», Россия) по методике, рекомендованной производителем. Замороженный в жидком азоте мицелий (100 мг), полученный после первой стадии глубинного культивирования, гомогенизировали в фарфоровой ступке при добавлении жидкого азота для охлаждения и суспендировали в 1 мл лизирующего реагента ExtractRNA, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали лизат в течение 15 мин при 13000 g и температуре 20°C . К супернатанту добавляли 200 мкл хлороформа и инкубировали 5 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая образец, после чего центрифугировали в течение 15 мин при 13000 g и температуре 4°C . Отбирали верхнюю водную фазу, к которой добавляли 500 мкл изопропанола для осаждения РНК и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 13000 g и температуре 20°C . Супернатант отбрасывали, а полученный осадок РНК дважды промывали 75%-м этанолом, каждый раз центрифугируя в течение 5 мин (13000 g , 20°C). Полученную РНК высушивали на воздухе в течение 7 мин, после чего растворяли в 50 мкл деионизированной воды и хранили при температуре -20°C .

2.6.3. Синтез и амплификация тотальной кДНК

Синтез первой цепи кДНК проводили при помощи модифицированной MMLV-ревертазы Mint («Евроген», Россия) по методике, рекомендованной производителем, с использованием олиго(dT)- и олиго(dC)-праймеров, фланкированных 5'-концевой последовательностью M1 (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC). Амплификацию тотальной кДНК проводили методом ПЦР при помощи ДНК-полимеразы Encuslo («Евроген», Россия) по методике, рекомендованной производителем, с праймером M1 со следующими параметрами: предварительная денатурация 95°C – 1 мин; денатурация 95°C – 15 сек; отжиг праймеров 66°C – 20 сек; элонгация 72°C – 1,5 мин; финальная элонгация 72°C – 3 мин.

2.6.4. Секвенирование концевых фрагментов кДНК

Амплификацию концевых фрагментов кДНК протеазы-активатора протеина С плазмы крови проводили методом Step-Out RACE с селективной супрессией ПЦР [165-167] на матрице тотальной кДНК с использованием ДНК-полимеразы Encuslo («Евроген», Россия), набором праймеров Mint RACE («Евроген», Россия) и вырожденными ген-специфическими праймерами к консервативным участкам субтилизиновых протеаз микромицетов рода *Aspergillus* (табл. 3) в соответствии с методиками, рекомендованными производителем, со следующими параметрами: предварительная денатурация 95°C – 1 мин; денатурация 95°C – 15 сек; отжиг праймеров 50-60°C – 20 сек; элонгация 72°C – 1 мин; финальная элонгация 72°C – 3 мин. Амплифицированные концевые фрагменты очищали на спин-колонках Cleanup S-Cap («Евроген», Россия) и клонировали в pAL2-T вектор («Евроген», Россия). Секвенирование ДНК полученных клонов проводили по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе в компании «Евроген», Россия.

2.6.5. Секвенирование полноразмерной последовательности

На основе результатов секвенирования концевых фрагментов кДНК протеазы-активатора протеина С плазмы крови проводили дизайн встречных концевых ген-специфических праймеров. Амплификацию полноразмерных последовательностей протеазы-активатора протеина С плазмы крови проводили методом ПЦР на матрицах геномной ДНК и кДНК продуцента с использованием ДНК-полимеразы Tersus («Евроген», Россия) и концевых ген-специфических праймеров по методике, рекомендованной производителем, со следующими параметрами: предварительная денатурация 95°C – 1 мин; денатурация 95°C – 15 сек; отжиг праймеров 60°C – 20 сек; элонгация 72°C – 1,5 мин; финальная элонгация 72°C – 3 мин. Амплифицированные последовательности очищали на спин-колонках Cleanup S-Cap («Евроген», Россия) и клонировали в pAL2-T вектор («Евроген», Россия). Секвенирование ДНК полученных клонов проводили по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе в компании «Евроген», Россия.

2.6.6. Биоинформатический анализ последовательности

Анализ и первичную обработку результатов секвенирования проводили при помощи программы FlicnTV версии 1.4.0. Трансляцию нуклеотидной последовательности в аминокислотную проводили при помощи ресурсов сервера EMBOSS Translation Tools (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/), после чего анализировали полученные результаты на сервере NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Аминокислотные последовательности гомологичных протеаз для анализа загружали из базы данных UniProtKB (<https://www.uniprot.org/uniprot/>), множественные выравнивания проводили с использованием ресурсов серверов EBI Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) и EBI EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Расчет сайтов трипсинолиза и масс получаемых фрагментов при масс-спектрометрии проводили с

использованием ресурсов сервера ExPasy PeptideMass (https://web.expasy.org/peptide_mass/).

2.7. Получение протеазы-активатора протеина С плазмы крови в бактериальной экспрессионной системе

2.7.1. Получение плазмиды для бактериальной экспрессии

Фрагмент кДНК протеазы-активатора протеина С, кодирующий пропептидный и протеазный домен фермента, амплифицировали методом ПЦР на матрице кДНК продуцента с использованием ДНК-полимеразы Tersus («Евроген», Россия) и встречных ген-специфических праймеров, фланкированных на 5'-концах сайтами рестрикции *NcoI* (прямой) и *XhoI* (обратный), по методике, рекомендованной производителем, со следующими параметрами: предварительная денатурация 95°C – 1 мин; денатурация 95°C – 15 сек; отжиг праймеров 60°C – 20 сек; элонгация 72°C – 1,5 мин; финальная элонгация 72°C – 3 мин. Амплифицированный фрагмент очищали на спин-колонках Cleanup S-Cap («Евроген», Россия), обрабатывали рестриктазами *NcoI* и *XhoI* («NEB», США) и лигировали в вектор pET23d («Novagen», США) по рестриктным сайтам *NcoI* и *XhoI* для получения плазмиды для экспрессии целевого белка, несущего С-концевой 6xHis-tag. Трансформировали лигазной смесью компетентные клетки штамма *E. coli* NovaBlue («Novagen», США) и проводили селекцию клонов на чашках Петри со средой LB-агар (состав в %: триптон – 1; NaCl – 1; дрожжевой экстракт – 0,5; агар – 1,5), содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Отбор клонов проводили методом ПЦР-скрининга с использованием *Taq*-полимеразы («Евроген», Россия) и T7-праймеров (прямой: 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ; обратный: 5'-АТГСТАГТТАТТГСТСАГ) по методике, рекомендованной производителем, со следующими параметрами: предварительная денатурация 95°C – 1 мин; денатурация 95°C – 15 сек; отжиг праймеров 55°C – 20 сек; элонгация 72°C – 1,5 мин; финальная элонгация 72°C – 3 мин. Правильность

полученных молекулярно-генетических конструкций проверяли секвенированием по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе в компании «Евроген», Россия.

2.7.2. Бактериальная экспрессия

Свежетрансформированные экспрессионной плазмидой клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3) засеивали в среду LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина, после чего выращивали культуру при температуре 37°C на орбитальной качалке при 200 об./мин до достижения оптической плотности при длине волны 600 нм $OD_{600} \approx 0,6$. Индукцию белкового синтеза проводили добавлением IPTG до конечной концентрации 0,25-1 мМ. Синтез белка проводили в двух вариантах: в течение 18 часов при 16°C и 4 часов при 37°C. После окончания белкового синтеза осаждали биомассу центрифугированием в течение 15 мин при 4000 g и 4°C и хранили в замороженном виде при температуре -20°C [168].

2.7.3. Фракционирование биомассы

Биомассу ресуспендировали в 20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, после чего гомогенизировали ультразвуком при охлаждении на льду. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g и 4°C, после чего анализировали полученные фракции методом полиакриламидного SDS-электрофореза по Леммли.

2.7.4. Аффинная очистка

Очищаемые фракции рекомбинантной протеазы-активатора протеина С плазмы крови наносили на Ni-NTA-сефарозу («GE Healthcare», США), уравновешенную хроматографическим буфером (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂). Элюцию проводили ступенчатым градиентом имидазола с концентрациями 20, 60 и 200 мМ в хроматографическом буфере. Анализировали белковый состав и ферментативную активность в полученных фракциях.

2.8. Методы определения протеолитической активности

2.8.1. Определение протеолитической активности с хромогенными пептидными субстратами

Ферментативную активность активатора протеина С определяли по реакции специфического расщепления бесцветных хромогенных пептидных субстратов, имеющих в качестве хромофора *n*-нитроанилидную группу (-pNA), гидролиз которых сопровождается накоплением окрашенного в желтый цвет свободного *n*-нитроанилина. Для качественного определения активности в хроматографических фракциях, соответствующих максимумам поглощения при 280 нм, использовали дот-метод на парафильме. Для этого к 20 мкл 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, содержащего 1 мМ CaCl₂, добавляли по 20 мкл фермента и субстрата и визуально оценивали интенсивность окраски смеси против контроля, в который вместо субстрата вносили буфер.

Количественное измерение активности проводили с использованием планшетного спектрофотометра Wallac 1420 («PerkinElmer», Финляндия) при 405 нм. Реакцию проводили в 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, содержащем 1 мМ CaCl₂, при 37°C. К 50 мкл раствора фермента добавляли 50 мкл раствора субстрата (0,5 мг/мл), инкубировали 1 мин в описанных выше условиях и останавливали реакцию добавлением 100 мкл 50%-й уксусной кислоты. За единицу ферментативной активности (Ед.) принимали количество фермента, расщепляющее 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Измерения проводили в условиях линейной зависимости скорости накопления продукта реакции от времени, для расчетов строили калибровочную кривую по *n*-нитроанилину.

2.8.2. Определение общей протеолитической активности

Общую протеолитическую активность определяли методом Ансона-Хагихары, заключающегося в определении количества тирозина в неосаждаемых ТХУ продуктах протеолиза после десятиминутного гидролиза 1% раствора

казеина в 100 мМ Трис-НСl, рН 8,0-8,2, при 37°C. К 200 мкл анализируемой фракции фермента добавляли 400 мкл раствора казеина. Останавливали реакцию добавлением 600 мкл 10%-й ТХУ. Для формирования осадка пробирки после проведения реакции выдерживали 30 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g и определяли оптическое поглощение супернатанта при 275 нм. За единицу активности (Ед.) принимали количество фермента, которое за 1 мин в условиях определения высвобождает 1 мкмоль тирозина, для расчетов строили калибровочную кривую [169, 170].

2.9. Аналитические методы

2.9.1. Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом по оптическому поглощению при 280 нм на приборе BioSpectrometer («Eppendorf», Германия). Оптическую плотность раствора белка с концентрацией 1 мг/мл при длине волны 280 нм и оптическом пути 1 см принимали равной 0,667 (нормализация на БСА) [171].

2.9.2. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Проводили горизонтальный электрофорез в 1,5%-ом агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия, в ТАЕ буфере (40 мМ Трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0) с напряжением электрического тока между электродами 8 Вольт/см. Детекцию проводили по флуоресценции нуклеиновых кислот, связанных с бромистым этидием, в ультрафиолетовом свете [172].

2.9.3. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Для определения белкового состава полученных фракций проводили электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS по Леммли (концентрация акриламида в концентрирующем геле – 6%, в разделяющем –

12,5%). После окончания электрофореза гель окрашивали 0,1%-м раствором Кумасси бриллиантового голубого R-250 [173].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ²

3.1. Иммобилизация продуцента

3.1.1. Подбор оптимального носителя и условий иммобилизации

В результате иммобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в 4,0%-м полиакриламиде, 3,5%-м альгинате кальция и 3,0%-м каррагинане были получены однородные гранулы с размером около 3-5 мм, механически устойчивые, не склонные к агрегации или распаду в процессе культивирования и подготовительных к нему манипуляций. Рост мицелия во время культивирования иммобилизованного микромицета происходил внутри и на поверхности гранул носителя, без образования пеллет, характерных для свободнорастущей формы. При иммобилизации микромицета в использованных полимерных материалах наблюдали инкорпорацию структур гриба в полимерный носитель, сопровождающийся ростом мицелия как внутри, так и на поверхности гранул носителя (рис. 9), без образования флоккул в питательной среде, характерных для роста не иммобилизованной культуры.

² Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. **Комаревцев С.К.**, Evseev P.V., Shneider M.M., Popova E.A., Tupikin A.E., Stepanenko V.N., Kabilov M.R., Shabunin S.V., Osmolovskiy A.A., Miroshnikov K.A. Gene analysis, cloning, and heterologous expression of protease from a micromycete *Aspergillus ochraceus* capable of activating protein C of blood plasma // *Microorganisms*. 2021. 9, 1936, 1-13.
2. **Комаревцев С.К.**, Тиморшина С.Н., Леонтьева М.Р., Шабунин С.В., Лобакова Е.С., Осмоловский А.А. Влияние иммобилизации микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D на полимерных носителях на образование фибринолитической протеазы-активатора протеина С плазмы крови // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021. 57, 4, 374-379.
3. **Комаревцев С.К.**, Попова Е.А., Крейер В.Г., Мирошников К.А., Осмоловский А.А. Очистка протеазы-активатора протеина С плазмы крови человека, продуцируемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. 56, 1, 39-44.

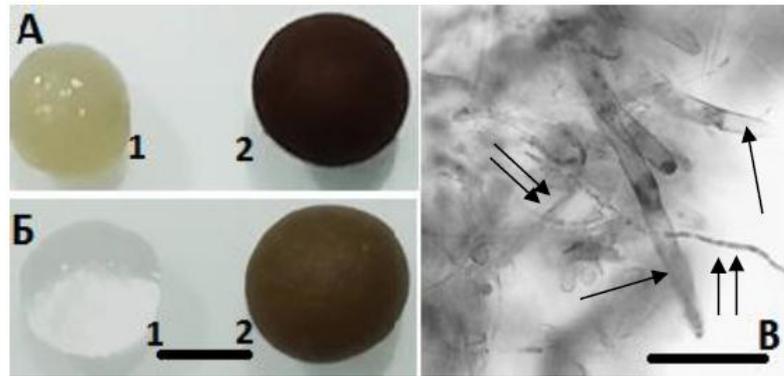


Рис. 9. Гранулы полимерных носителей каррагинана (А) и альгината (Б) без мицелия гриба (1) и с иммобилизованным мицелием *A. ochraceus* VKM F-4104D (2), В – гифы тонкого и толстого мицелия *A. ochraceus* VKM F-4104D на поверхности гранул альгината (одиночными стрелками обозначены толстые гифы, двойными – тонкие). Масштабный отрезок на фрагментах А и Б составляет 5 мм, на фрагменте В – 20 мкм.

В таблице 6 приведены результаты экспериментов по выбору оптимального иммобилизирующего носителя и условий культивирования для микромицета *A. ochraceus* VKM F-4104D. Наибольшую активность протеазы-активатора протеина С, превысившую соответствующее значение в экспериментах с неиммобилизованным микромицетом, наблюдали при культивировании иммобилизованного в альгинате кальция продуцента. При этом наилучшие результаты были достигнуты при культивировании в ферментационной среде без предварительного выращивания в посевной среде (вариант № 2). Активность целевого фермента при культивировании иммобилизованного микромицета в каррагинане была также высока, однако ниже, чем при иммобилизации в альгинате кальция. Полиакриламид, в опытах с которым активность протеазы-активатора протеина С оказалась существенно ниже по сравнению с неиммобилизованным продуцентом, показал худшие результаты среди всех остальных носителей. Таким образом, для дальнейших экспериментов в качестве иммобилизирующего носителя выбрали альгинат кальция с оптимальным режимом культивирования в ферментационной среде (вариант № 2).

Таблица 6. Подбор оптимальных условий для иммобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D

Носитель для иммобилизации	Максимальная протеолитическая активность при различных вариантах культивирования, Ед./мл $\times 10^{-3}$	
	Вариант № 1	Вариант № 2
Альгинат	71	139
Каррагинан	24	124
Полиакриламид	12	2
Без иммобилизации	118	-

Морфо-цитологические особенности иммобилизованного *A. ochraceus* ВКМ F-4104D изучали при помощи сканирующей электронной микроскопии (рис. 10). Микроскопию проводили для вариантов иммобилизации в альгинате кальция и каррагинане без предварительного культивирования в посевной среде (вариант № 2). Как видно из рисунков 10А и 10Г, наиболее плотный слой мицелия иммобилизованного продуцента располагался на поверхности гранул и обладал толщиной около 200 мкм. При иммобилизации микромицета в обоих типах полимерных носителей развивались гифы разной толщины: внутри гранул – около 4 мкм (рис. 10В и 10Е), а на поверхности в результате культивирования продуцента наблюдалось образование тонких гиф диаметром 2,0-3,0 мкм и толстых гиф диаметром 7,0-7,5 мкм (рис. 9В, 10Б и 10Д). Такая морфологическая дифференциация мицелия оказалась характерна для *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, иммобилизованного в гранулах как альгината кальция, так и каррагинана. Однако только при иммобилизации в альгинате кальция микромицет образовывал в условиях глубинного культивирования малиново-бордовый пигмент, характерный для продуцента при росте в не иммобилизованном состоянии, что подтверждает наличие физиологических различий при иммобилизации *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в разных типах полимерных носителей.

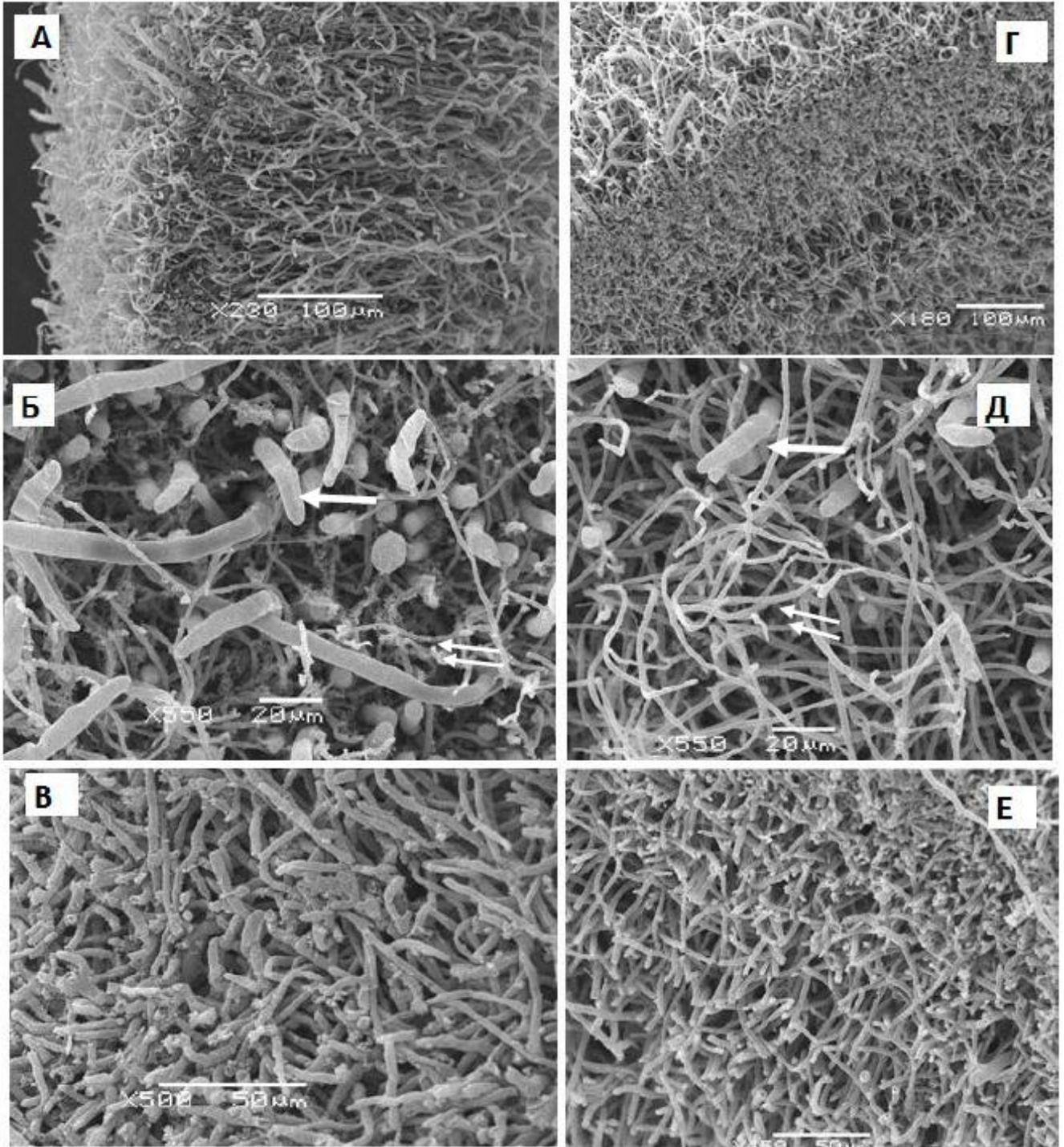


Рис. 10. Сканирующая электронная микроскопия. Фрагменты гранул альгината (А-В) и каррагинана (Г-Е) с иммобилизированным мицелием *A. ochraceus* ВКМ F-4104D:

А, Г – наружный мицелий;

Б, Д - поверхность гранул (одиночными стрелками обозначены толстые гифы, двойными – тонкие);

В, Е – мицелий, инкорпорированный во внутренней части гранул.

Для подбора наиболее подходящей концентрации альгината кальция при иммобилизации измеряли максимальную активность протеазы-активатора протеина С во время культивирования иммобилизованного микромицета с концентрациями альгината от 2,5 до 5,5%. Как видно из результатов этого эксперимента на рисунке 11, разброс значений максимальной активности в исследуемом диапазоне концентраций альгината оказался небольшим, наивысшее значение наблюдали при концентрации 3,5%, которую выбрали для проведения дальнейших экспериментов по изучению динамики образования целевого фермента и полунепрерывному культивированию. Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы, согласно которым оптимальная концентрация альгината кальция для иммобилизации микроорганизмов лежит в диапазоне от 2,0 до 5,0%.

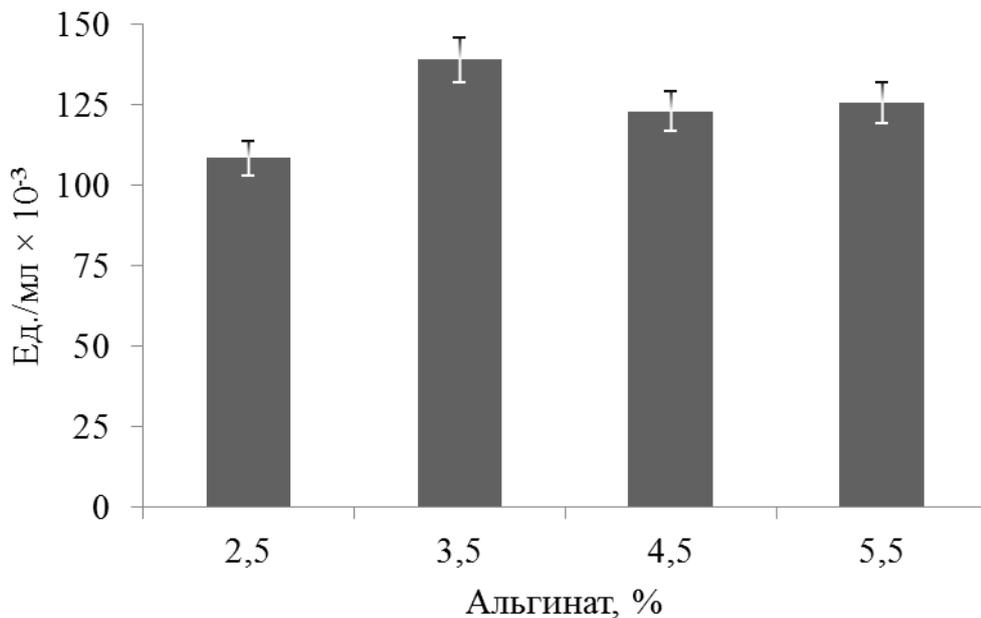


Рис. 11. Зависимость максимальной активности протеазы-активатора протеина С от концентрации альгината кальция при иммобилизации.

3.1.2. Культивирование иммобилизованного микромицета

На рисунке 12 приведена динамика образования протеазы-активатора протеина С при глубинном культивировании иммобилизованного в альгинате кальция и свободнорастущего микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в течение 14 суток. Видно, что активность целевого фермента достигла своего максимального значения на 3-4-е сутки культивирования свободнорастущего продуцента, после чего снизилась примерно вдвое на 6-7-е сутки и вчетверо – на 10-е сутки. В то же время, при культивировании иммобилизованного микромицета выход на максимальный уровень значений активности целевого фермента также происходил к 4-м суткам культивирования, однако он практически не изменялся в течение последующих 10-ти суток, что свидетельствует о стабильности синтеза целевого продукта иммобилизованным продуцентом по сравнению со свободнорастущим.

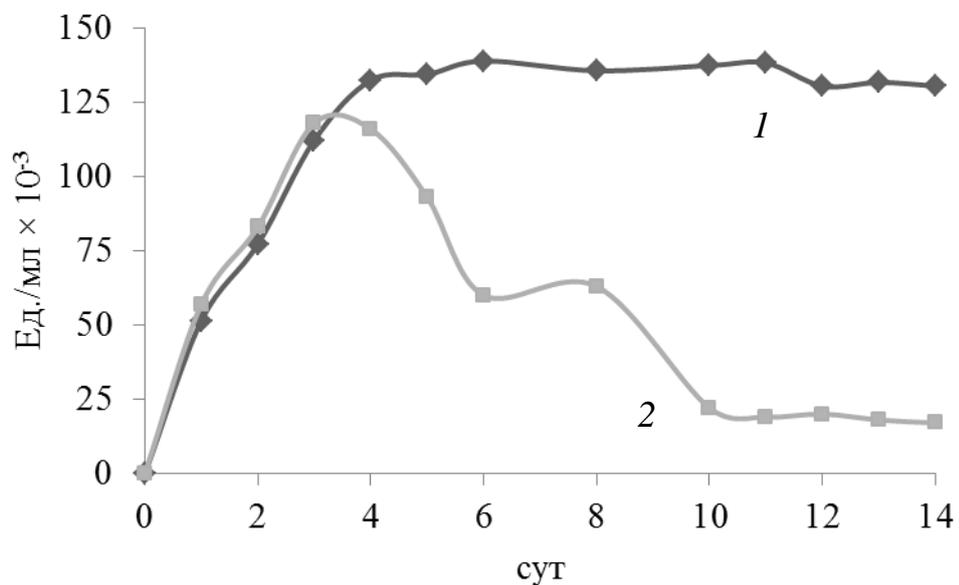


Рис. 12. Динамика образования протеазы-активатора протеина С при глубинном культивировании иммобилизованного в альгинате кальция (1) и свободнорастущего (2) микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D.

Для исследования потенциала иммобилизованного в альгинате кальция микромицета к многократному использованию в биотехнологических процессах провели пять циклов полунепрерывного культивирования с заменой питательной среды на свежую перед каждым циклом. Активности целевого фермента в культуральной жидкости, полученные в процессе полунепрерывного культивирования, показаны на рисунке 13. Наибольшую активность наблюдали в первых трех циклах, после чего произошло снижение примерно на треть от первоначальных значений. Полученные результаты указывают на возможность многократного культивирования иммобилизованного в альгинате кальция микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D для получения протеазы-активатора протеина С.

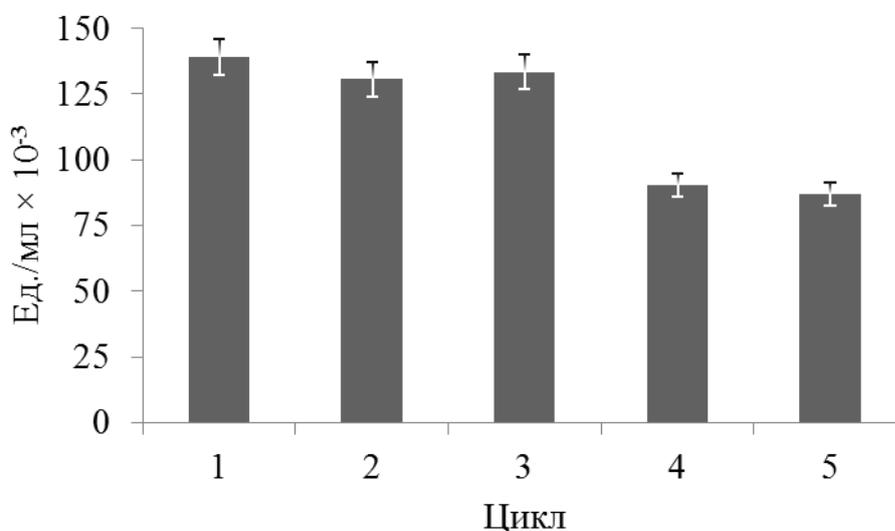


Рис. 13. Образование протеазы-активатора протеина С в нескольких циклах полунепрерывного культивирования иммобилизованного в альгинате кальция микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D.

Таким образом, в результате работы установлено, что иммобилизация микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D увеличивает интенсивность образования фибринолитической протеазы-активатора протеина С плазмы крови, повышает

стабильность продуцента и делает возможным его многократное использование в процессе полунепрерывного культивирования.

3.2. Очистка протеазы-активатора протеина С плазмы крови из культуральной жидкости

3.2.1. Фракционирование культуральной жидкости

Культуральная жидкость микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, полученная по окончании срока культивирования продуцента, после удаления биомассы представляла собой прозрачную жидкость коричневого цвета, содержащую остатки компонентов питательной среды и различные, в том числе окрашенные, метаболиты микромицета. Суммарная концентрация белка в культуральной жидкости составила 5,7 мг/мл, а удельная ферментативная активность активатора протеина С – 0,02 Ед./мг (табл. 7). На первой стадии очистки использовали высаливание сульфатом аммония, поскольку оно является доступным способом концентрирования целевого белка из большого объема культуральной жидкости и при этом одновременно позволяет отделить значительное количество примесей, остающихся в растворенном виде.

Для определения оптимальной степени насыщения сульфата аммония, необходимой для осаждения активатора протеина С, измеряли ферментативную активность в культуральной жидкости до и после высаливания с разными концентрациями сульфата аммония. На рисунке 14 приведена зависимость между степенью насыщения сульфата аммония и остаточной ферментативной активностью культуральной жидкости после высаливания. Видно, что значительное снижение остаточной активности до минимальных значений произошло в опытах со степенями насыщения сульфата аммония 0,7, 0,75 и 0,8. Отсюда следует, что степень насыщения сульфата аммония 0,7 является оптимальной для осаждения активатора протеина С из культуральной жидкости в

процессе его выделения и очистки. Использование более высоких степеней насыщения 0,75 и 0,8 нецелесообразно, поскольку это не приводит к существенному увеличению выхода целевого белка и повышает количество соосаждающихся с ним примесей.

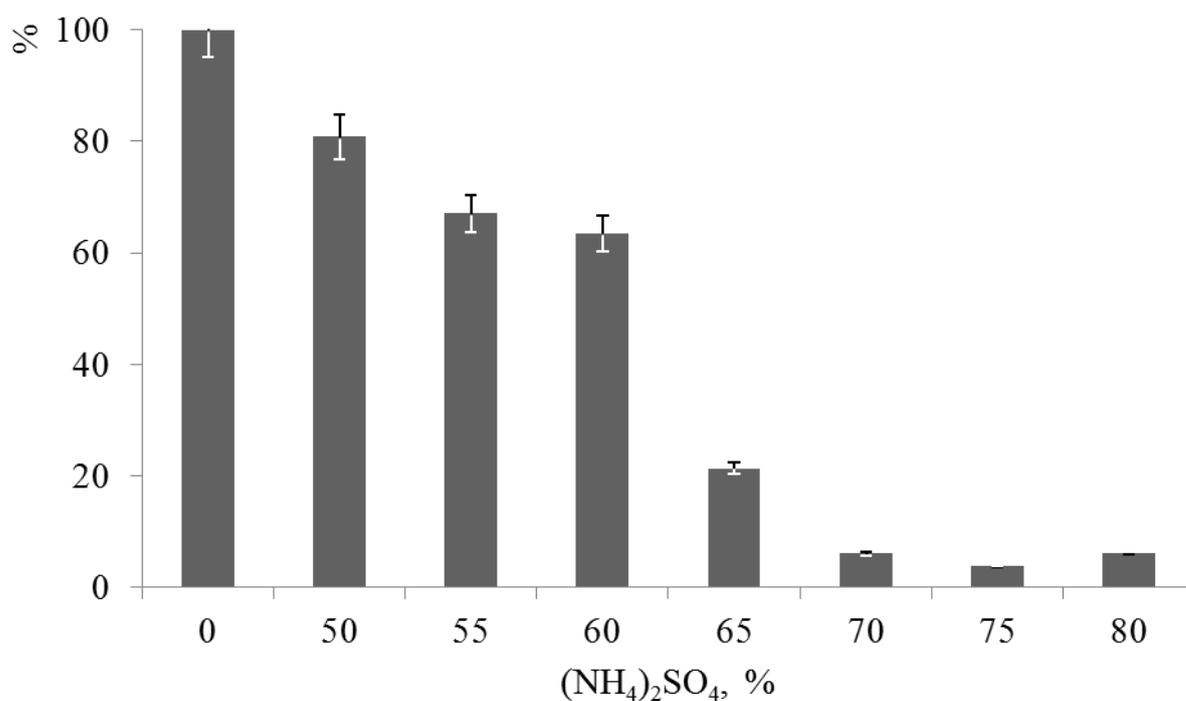


Рис. 14. Зависимость от степени насыщения сульфата аммония (%) остаточной ферментативной активности активатора протеина С в культуральной жидкости *A. ochraceus* ВКМ F-4104D (%) после высаливания.

Электрофоретический анализ осадка, полученного в процессе высаливания культуральной жидкости сульфатом аммония при степени насыщения 0,7, показал, что вместе с целевым белком массой около 35 кДа он содержит значительное количество примесей и нуждается в дальнейшей очистке (рис. 15, дорожка 2). Визуально осадок имел насыщенный коричневый цвет из-за содержания окрашенных продуктов метаболизма микромицета. Следует отметить, что основная часть примесей также начинала осаждаться при степенях насыщения сульфата аммония 0,65-0,7, поэтому проведение предварительных стадий высаливания при степенях насыщения ниже 0,65 для осаждения посторонних компонентов культуральной жидкости нерационально, поскольку не приводит к

существенному увеличению чистоты препарата, получаемого на данном этапе очистки.

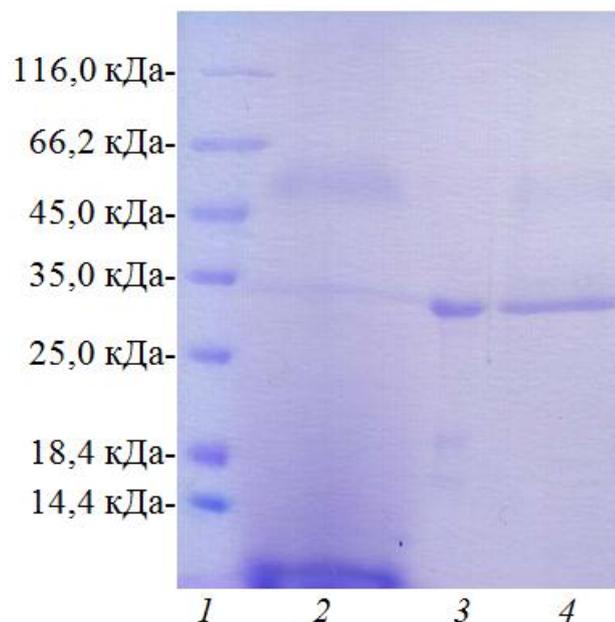


Рис. 15. Электрофоретический анализ белкового состава фракций, полученных в процессе очистки протеазы-активатора протеина С, образуемой *A. ochraceus* ВКМ F-4104D:

1 – маркеры молекулярных масс, 2 – осадок после высаливания культуральной жидкости, 3 – фракции, обогащенные активатором протеина С, после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе, 4 – очищенный препарат протеазы-активатора протеина С после гель-фильтрации.

Таблица 7. Очистка протеазы-активатора протеина С плазмы крови из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D

Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Суммарный белок, мг	Удельная активность, Ед./мг	Степень очистки, раз	Суммарная активность, Ед.	Выход по активности, %
Культуральная жидкость	740	5,7	4218	0,02	1	84	100
Гидрофобная хроматография	35	0,7	24,5	2	100	49	58
Ионообменная хроматография (после концентрирования)	1	5,6	5,6	5,5	275	31	37
Гель-фильтрация	7,5	0,4	3	7,5	375	23	27

3.2.2. Хроматографическая очистка

В качестве следующей стадии очистки выбрали гидрофобную хроматографию на фенил-сефарозе, полученный в процессе ее проведения профиль элюции приведен на рисунке 16А. Использованный хроматографический буфер, содержащий сульфат аммония 0,35 степени насыщения, обеспечил растворение протеазы-активатора протеина С из осадка и его хорошую сорбцию на фенил-сефарозе, в то время как значительное количество примесей в этих условиях не связалось с носителем и элюировалось в первых фракциях. Элюция целевого белка произошла в конце снижающегося градиента сульфата аммония, что обеспечило его эффективную грубую очистку. Раствор активатора протеина С, полученный после данного этапа очистки, имел желтый оттенок, удельная активность целевого белка в нем возросла в 100 раз по сравнению с первоначальной (табл. 7).

При дальнейшей очистке с использованием ДЭАЭ-сефарозы произошло прочное связывание большого количества оставшихся примесей с хроматографическим носителем. Из полученного в процессе хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе профиля элюции (рис. 16Б) видно хорошее разделение целевого белка, элюировавшегося в первых фракциях, и примесей, элюция которых произошла только при значительном увеличении концентрации NaCl в хроматографическом буфере. Фракции активатора протеина С после данного этапа очистки имели бледно-желтый цвет, удельная активность при этом возросла в 275 раз по отношению к первоначальной (табл. 7). Электрофоретический анализ полученных фракций показал их значительное обогащение целевым белком и снижение количества примесей (рис. 15, дорожка 3).

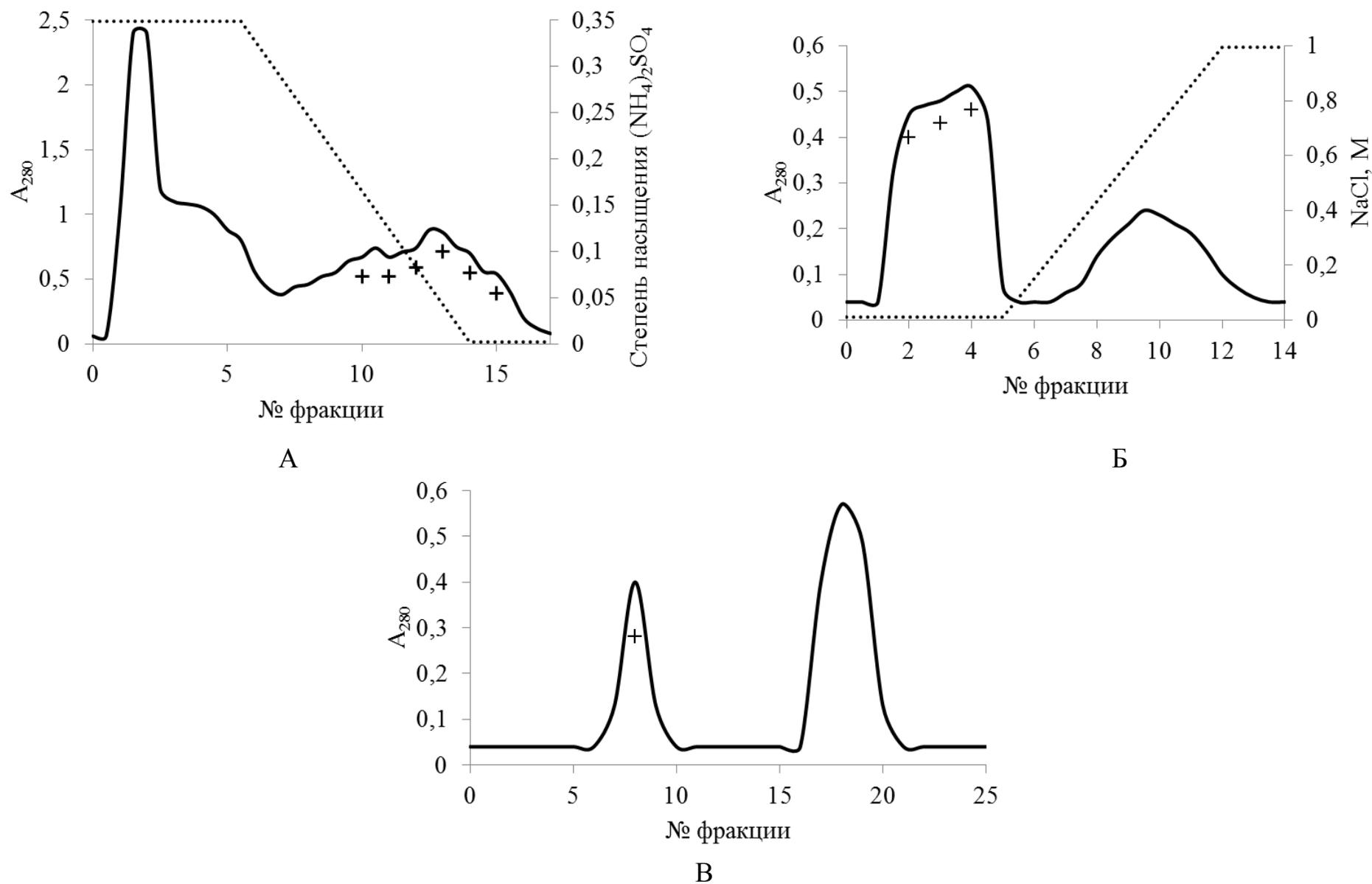


Рис. 16. Профили элюции, полученные в ходе хроматографии на фенол-сефарозе (А), ДЭАЭ-сефарозе (Б) и Сефадексе G-50 (В). Сплошными линиями показаны величины оптической плотности элюата при 280 нм, точечными – градиенты сульфата аммония (А) и NaCl (Б), знаками «+» отмечены фракции, содержавшие протеазу-активатор протеина С.

На заключительном этапе очистки использовали гель-фильтрацию на Сефадексе G-50, предварительно сконцентрировав наносимый препарат на мембранном фильтре для лучшего разделения. Элюция протеазы-активатора протеина С произошла в первых фракциях (рис. 16В), что обеспечило практически полное его отделение от оставшихся примесей. Полученные после данного этапа очистки фракции активатора протеина С, образуемого *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, были бесцветны, его удельная активность возросла в 375 раз по сравнению с первоначальной (табл. 7). Электрофоретический анализ этих фракций показал, что они содержат высокоочищенный целевой белок (рис. 15, дорожка 4).

Суммарный выход активатора протеина С после всех стадий очистки составил 27% (табл. 7), что незначительно ниже по сравнению с ранее опубликованным способом очистки протеазы другого штамма – *A. ochraceus* 513, основанном на использовании бациллина-силохрома, где он составил 35% [9]. Однако возрастание итоговой степени очистки целевого белка в 375 раз, достигнутое при использовании нового способа, значительно превышает ранее полученные результаты, где степень очистки возросла в 36 раз [9]. Это, а также труднодоступность бациллина-силохрома в настоящее время, делают новый метод очистки более перспективным и легкодоступным для получения протеазы-активатора протеина С, образуемой *A. ochraceus* ВКМ F-4104D.

3.3. Изучение последовательности протеазы-активатора протеина С плазмы крови

3.3.1. Определение и анализ нуклеотидной последовательности гена и кДНК

Для определения и анализа нуклеотидной последовательности протеазы-активатора протеина С провели выделение тотальной РНК и ДНК продуцента в момент максимальной секреции целевого фермента на 2-ые сутки культивирования в ферментационной среде. На матрице полученной РНК синтезировали первую цепь кДНК методом обратной транскрипции, после чего амплифицировали библиотеку кДНК продуцента с использованием адаптерных праймеров к фланкирующей последовательности M1. Для амплификации концевых фрагментов кДНК целевого фермента использовали метод RACE с вырожденными праймерами к консервативным районам субтилизиновых протеаз микромицетов рода *Aspergillus* на матрице полученной библиотеки кДНК продуцента. На основании результатов секвенирования амплифицированных концевых фрагментов кДНК протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D провели дизайн генспецифических праймеров и амплифицировали полноразмерные последовательности кДНК и гена исследуемого фермента.

В результате анализа данных секвенирования установлено, что кодирующий участок ДНК протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, состоит из 1215 пар оснований и отвечает за синтез полипептидной цепи фермента. Соответствующий этому участку ген содержит 1394 пар оснований и имеет три коротких некодирующих участка (интрона) длиной 58, 59 и 62 пар оснований соответственно. Полная последовательность гена с выделенными некодирующими участками представлена на рисунке 17. Данная последовательность была депонирована в международную биоинформатическую базу данных NCBI GenBank под записью с номером MW183406.

ATGCCTTCCTTCAAGCAGACTTTGCTCCTCCTTGGAGCTATGCTCCCCGCCGTCTTCGGT 60
 GCTCCCGTCGAGAACACCCGCCGGGCTTCCGAGAAGATCGCTGGAAAGTACATTGTCACT 120
 TTCAAGAACGGCATCGACACCGCCAAGATCGAGCAGCACACCACCTGGGCTACCAACATC 180
 CACAAGCGCAACCTTGCCCGCGTGATGGTTCCGACGATTCTGACCTCCCCGTCGGTATC 240
 GAGAAGAAATTCAAGATCAAGGACTTCGCCGCCTACTTCGGTTCCTTCGATGACTCCACC 300
 ATCGAGGAGATCCGCAAGAGCGCCGATGTACGTTTTGAACTTAGAAGAATGAAAATTAGG 360
 ACCAGCTGTGCTAATCTGCCTTTAGGTTGCTCACATCGAGGAGGACCAGGTCTGGCACCT 420
 CGATGCTCTGACCACCCAGACCGGTGCTACCTGGGGCTGGGTTCCATCTCGCACAAAGG 480
 TGAATCCAGCACCAGCTACGTCTACGACTCCAGCGCCGGCGAGGGCACCTACGGCTACGT 540
 CGTTGACACCGGTATCAACGTCGACCACAGCGAGTTCGGCGGCCGTGCGAGCCTCGCCTA 600
 CAACGCTGTTGGCGGCCAGCACGTTGACAGCGTCGGCCACGGAACCTCACGTTGCCGGCAC 660
 CATTGGTGGCAAGACCTACGGTGTCTCCAAGAAGGCCAACCTCCTCTCCGTCAAGGTCTT 720
 CCAGGGCGAATCTTCTTCTACCTCCATCATTCTTGACGGATACAACCTGGGCCGCCAACGA 780
 CATCGTGAGCAAGTCCCGTACCGGAAAGGCCCATCAACCTGTCTCTCGGTTCAGTAGCT 840
 CCTATTTCTCTAGATTGGGAGATCCATGGTTGCTAATTTCCGTTTCATAGGTGGTGGATAC 900
 TCCTATGCCTTCAACCAGGCTGTGCGAGAACGCCTTCGATGAGGGTGTCTTGACCGTCGTC 960
 GCCGCCGGTAACGAGAACGTACGTGTTCCACTTCCCCGACCACCATCCCATCGCGGGTTG 1020
 AGCTAATTCAAACGATTTAGTCCGATGCTGGCAACACCAGCCCTGCCTCTGCCCCAACG 1080
 CTTGACCGTCGCTGCCAGCACCAACCGCAACGCCCGTGCCTCTTTCTCCAACCTACGGCT 1140
 CCGTCGTTGATGTCTTCGCTCCCGGTCAGGACATCAAGTCTGCCTGGATCGGCGGCAGCT 1200
 CTGCCACCAACACCATCTCCGGTACCTCCATGGCTACTCCCCACATCGTTGGTCTGGCCA 1260
 TCTACCTGCAGGCTCTTGAGGGTCTCACCAGCCCCGCCCGTCACCAAGCGCATCAAGG 1320
 AGCTCGCCACCTCCGGCGTTGTACCGATGTCAAGGGCAGCCCCAACCTCCTTGCCCTACA 1380
 ACGGCGCTGCTTAA 1394

Рис. 17. Последовательность гена протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Некодирующие участки показаны шрифтом серого цвета.

3.3.2. Анализ аминокислотной последовательности

Кодирующая ДНК протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, отвечает за синтез полипептидной цепи фермента длиной 404 аминокислоты. Известные в настоящее время данные литературы о природе и строении секретируемых протеаз мицелиальных грибов свидетельствуют о том, что данная полипептидная цепь может представлять собой неактивный предшественник зрелого фермента, состоящий из сигнальной последовательности, пропептидного и протеазного доменов. Для проверки данного предположения провели биоинформатическое исследование установленной последовательности.

При помощи биоинформатического сервера EBI EMBOSS Transeq провели трансляцию кодирующей последовательности ДНК исследуемого фермента и установили полную аминокислотную последовательность его полипептидной цепи. Из международной базы данных UniProt извлекли аминокислотные последовательности подробно исследованных типичных представителей субтилизиновых протеаз и провели их выравнивание с установленной последовательностью протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, используя вычислительные ресурсы биоинформатических серверов EBI Clustal Omega и EBI EMBOSS Needle. В качестве типичных представителей субтилизиновых протеаз выбрали субтилизин E (UniProt P04189) [46, 49], субтилизин BPN (UniProt P00782) [47], наттокиназу (антикоагулянтная фибринолитическая субтилизиновая протеаза штамма *Bacillus subtilis natto*, UniProt P35835) [174-176] и Tk-субтилизин (из термофильной бактерии *Thermococcus kodakarensis*, UniProt P58502) [177-179]. Результаты полученного множественного выравнивания представлены на рисунке 18.

<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	MPSFKQT---LLLLGAMLPVAVFGAPVENTRRASEKIAGKYIVTFKNGIDTAKIEQHTTWA	57
Тк-субтилизин	<u>MK---KSIALVLSIVLLA-ALFA---VPASAGEQNTI-RVIVSV-----DKAKFNP---</u>	43
Субтилизин BPN	<u>MRGKKVWISLLFALALIFTMAFGSTSSAQAGKSNGEKKYIVGFQTMSTMSAAKKK---</u>	57
Субтилизин E	<u>MRSKKLWISLLFALTLIFTMAFSNM-SAQAGKSSSTEKKYIVGFQTMSSAMSSAKKK---</u>	56
Наттокиназа	<u>MRSKKLWISLLFALTLIFTMAFSNM-SAQAGKSSSTEKKYIVGFQTMSSAMSSAKKK---</u>	56
	* :: : : * : ** . . :	
<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	TNIHKRNLRDRGSDSDLPVGIKKFKIKDFAAYFGSFDDSTIEEIRKSADVAHIEEDQ	117
Тк-субтилизин	-----HEVLGIGGHIVYQFKLIPAVVVDVPANAVGKLLKMPGVEKVEFDH	88
Субтилизин BPN	-----DVISEGGKVQKQFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSVAYVEEDH	102
Субтилизин E	-----DVISEGGKVQKQFKYVNAATAATLDEKAVKELKKDPSVAYVEEDH	101
Наттокиназа	-----DVISEGGKVQKQFKYVNAATAATLDEKAVKELKKDPSVAYVEEDH	101
	. * . ::* . * . .:: :::* . * :* * :	
<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	VWHLDAIT-----TQTGATWGLGSIHKGESSTSYVYDSSAGEGTYGYVVDTGINV	168
Тк-субтилизин	<u>QAVLLGKPSWLGGGSTOPAQITIPWGIERVKAPSVWSITD----GSVSVIQVAVIDTGVVDY</u>	144
Субтилизин BPN	<u>VAHAY-----AQSVPYGVISQIKAPALHSQGY-----TGSNVKVAVIDSGIDS</u>	144
Субтилизин E	<u>IAHEY-----AQSVPYGVISQIKAPALHSQGY-----TGSNVKVAVIDSGIDS</u>	143
Наттокиназа	<u>IAHEY-----AQSVPYGVISQIKAPALHSQGY-----TGSNVKVAVIDSGIDS</u>	143
	:* : : . . * : . *:*:* :	
<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	DHSEFGGRASLAYNAV-----GGQHVDVSVGHGTHVAGTIGGKT-----YGVSKKANLL	216
Тк-субтилизин	<u>DHPDLAANIAWCVSTLRGKVKSTKLKRCADQNGEIGTHVIGTIAALNNDIGVVGVPVQIY</u>	204
Субтилизин BPN	<u>SHPDLKVAGGA-----SMVPSETNPFQDNNSEIGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLY</u>	198
Субтилизин E	<u>SHPDLNVRGGA-----SFVPSETNPNYQDGSSEIGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSASLY</u>	197
Наттокиназа	<u>SHPDLNVRGGA-----SFVPSETNPNYQDGSSEIGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSASLY</u>	197
	. * : : . * .***** * : . . * : : . : :	

Рис. 18 (начало). Множественное выравнивание аминокислотной последовательности протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* BKM F-4104D, с последовательностями типичных представителей класса субтилизиновых протеаз. Шрифтом серого цвета показаны участки полипептидных цепей, отщепляющиеся в процессе созревания ферментов, сигнальные последовательности подчеркнуты сплошной линией, инсерционная последовательность Тк-субтилизина подчеркнута точечной линией. На последовательностях протеазных доменов выделены аминокислоты каталитической триады. Участки полипептидных цепей, в которых наблюдается полное совпадение аминокислот, отмечены звездами (*), значительное сходство аминокислот – двоеточиями (:), сходство аминокислот – точками (.)

<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	SVKVFQGEES-STSIILDGYNWAANDIVSK-----SRTGKAAINLSLGGGYS	262
Тк-субтилизин	SVRVLDARGSGSYSDIAIGIEQAILGPDGVADKDGDI IAGDPDDDAEVISMSLGGPAD	264
Субтилизин BPN	AVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIAN-----NMDVINMSLGGPSPG	238
Субтилизин E	AVKVL DSTGSGQYSWIINGIEWAISN-----NMDVINMSLGGPTG	237
Наттокиназа	AVKVL DSTGSGQYSWIINGIEWAISN-----NMDVINMSLGGPTG	237
	:*:*: . . * . * * * : * . . * :**** .	
<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	Y-AFNQAVENAFDEGVLTVVAAGNENS DAG---NTSPASAPNAL TVAASTNRNARASF SN	318
Тк-субтилизин	DSYLYDMI IQAYNAGIVIVAASGNEGAPS----PSYPAAYPEVIAVGAIDSNDNIASF SN	320
Субтилизин BPN	SAALKA AVDKAVASGVVVVAAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRAFSS	298
Субтилизин E	STALKTVVDKAVSSGIVVAAAAGNEGSSGSTSTVGYPAKYPSTI AVGAVNSSNQRAFSS	297
Наттокиназа	STALKTVVDKAVSSGIVVAAAAGNEGSSGSTSTVGYPAKYPSTI AVGAVNSSNQRAFSS	297
	: : :* *:: ..*:***.: . * . *...:*. * . : ****.	
<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	YGSVVDVFAPGQDIKSAWIGGSSATNTISGTS MATPHIVGLAIYLQALEGLTS----PAA	374
Тк-субтилизин	RQPE--VSAPGVDILSTYPDDSY--ETLMGTS MATPHVSGVVALIQ AAYYQKYGKILPVG	376
Субтилизин BPN	VGPELDVMAPGVS IQSTLPGNKY--GAYNGTS MASPHVAGAAALILSKHPN-----	347
Субтилизин E	AGSELDVMAPGVS IQSTLPGGTY--GAYNGTS MATPHVAGAAALILSKHPT-----	346
Наттокиназа	VGSELDVMAPGVS IQSTLPGGTY--GAYNGTS MATPHVAGAAALILSKHPT-----	346
	* ** * . * * : . . . : *****: * . : :	
<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	VTKRIKELATSGV---VTDVKGSPNLLAYNGAA-----	404
Тк-субтилизин	TFDDISKNTVRGILHITADDLGPTGWDADYGYGVVRAALAVQAAALG	422
Субтилизин BPN	----WTNTQVRSSLENTTTKLG D---SFYYGKGLINVQAAAQ----	382
Субтилизин E	----WTNAQVRDRLESTATYLG N---SFYYGKGLINVQAAAQ----	381
Наттокиназа	----WTNAQVRDRLESTATYLG N---SFYYGKGLINVQAAAQ----	381
	:: . . . : * * .	

Рис. 18 (продолжение). Множественное выравнивание аминокислотной последовательности протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* BKM F-4104D, с последовательностями типичных представителей класса субтилизиновых протеаз. На последовательностях протеазных доменов выделены аминокислоты каталитической триады. Участки полипептидных цепей, в которых наблюдается полное совпадение аминокислот, отмечены звездами (*), значительное сходство аминокислот – двоеточиями (:), сходство аминокислот – точками (.).

Как видно из результатов выравнивания (рис. 18), последовательность протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, демонстрирует высокую степень гомологии с типичными представителями класса субтилизиновых протеаз. В частности, доли полностью идентичных и сходных аминокислот исследуемой протеазы с последовательностями субтилизина Е составили 29,5 и 43,4% от их общего числа соответственно, субтилизина ВРН – 29,7 и 45,4%, наттониказы – 29,5 и 43,4%, Тк-субтилизина – 24,2 и 38%. Это свидетельствует о принадлежности протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D к группе субтилизиновых протеаз.

При анализе участков с высокой гомологией видно, что наибольшее сходство наблюдается в районах полипептидных цепей, которые отвечают за формирование β -структуры протеазного домена, взаимодействующих с ней α -спиралей на поверхности протеазного домена, а также аминокислот, составляющих каталитическую триаду активного центра и обеспечивающих ее правильную пространственную ориентацию. Степень гомологии в районе сигнальных пептидов оказалась невелика, что было ожидаемо и объясняется различиями их строения у бактерий и эукариотических организмов. Отсутствие гомологии в области инсерционной последовательности Тк-субтилизина, а также ряда характерных для него специфических участков свидетельствует в пользу наличия у протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D типичного для субтилизиновых протеаз мезофильных организмов механизма фолдинга и созревания, для которого наличие пропептидного домена является крайне важным. Данную особенность следует учитывать при планировании экспериментов по получению рекомбинантной формы исследуемого фермента.

Для более углубленного биоинформатического анализа аминокислотной последовательности протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D при помощи вычислительных ресурсов сервера NCBI BLAST выполнили поиск наиболее гомологичных к ней ферментов, после чего провели множественное выравнивание с наиболее изученными из них (рис. 19).

Протеиназа К	IAGMDFVASDKNNRNC PKGVVASLSLGGGYSSSVNSAAARLQSSGVMVAVAAGNNNADAR	272
<i>A. flavus</i> 28	LDGFNWAANDIVSKKRTGKAAINMSLGGGYSKAFNDAVENAFNEGVL SIVAAGNENTDAS	290
<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	LDGYNWAANDIVSKSRTGKAAINLSLGGGYSYAFNQAVENAFDEGVLTVVAAGNENS DAG	291
<i>A. fumigatus</i> ATCC MYA-4609	LDGFNWA VNDIVSKGRT KKAAINMSLGGGYSYAFNNAVENAFDEGVLSVVAAGNENS DAS	290
<i>A. oryzae</i> ATCC 42149	LDGFNWAANDIVSKKRTSKAAINMSLGGGYSKAFNDAVENAF EQVLSVVAAGNENS DAG	290
	: * : : : : * . : . . . : * * * * * * : . * . * * * : * * * * * : * : * *	
Протеиназа К	NYSPASEPSVCTVGASDRYDRSSFSNYGSVLDIFGPGT SILSTWIGGST--RSISGT SM	330
<i>A. flavus</i> 28	RTSPASAPDAFTVAAINVNTRAYFSNYGSVVDIFAPGQ NILSAWIGSNTATNTISGT SM	350
<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	NTSPASAPNALTVAASTNRNARASFSNYGSVVDVFAPGQDIKS AWIGGSSATNTISGT SM	351
<i>A. fumigatus</i> ATCC MYA-4609	NTSPASAPNALTVAAINKSNARASFSNYGSVVDIFAPGQ DILSAWIGSTTATNTISGT SM	350
<i>A. oryzae</i> ATCC 42149	QTSPASAPDAITVAAIQKSNNRASFSNFGKVVDVFAPGQ DILSAWIGSSATNTISGT SM	350
	. * * * * * * . . * * . * : * : * * * : * . * : * . * * * . * * * : * * * * * . : * * * * * *	
Протеиназа К	ATPHVAGLAAYLMTLGKTTAASACR-YIADTANKGDL SNIPFGTVNLLAYNNYQA	384
<i>A. flavus</i> 28	ATPHIVGLSIYLM SLEVLSSPKAVSDRIKELATRGVVS-NVAGSPNLLAYNGNA-	403
<i>A. ochraceus</i> BKM-F4104D	ATPHIVGLAIYLQALEGLTSPAAVTKRIKELATSGVVT-DVKGSPNLLAYNGAA-	404
<i>A. fumigatus</i> ATCC MYA-4609	ATPHIVGLSVYLMGLENLSGPAAVTARIKELATNGVVT-NVKG SPNKLAYNGNA-	403
<i>A. oryzae</i> ATCC 42149	ATPHIVGLSLYLAAL ENLDGPAAVTKRIKELATKD VVK-DVKG SPNLLAYNGNA-	403
	* * * * * : . * * : * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * .	

Рис. 19 (продолжение). Множественное выравнивание аминокислотной последовательности протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* BKM F-4104D, с последовательностями наиболее гомологичных ферментов. На последовательностях протеазных доменов выделены аминокислоты каталитической триады. Участки полипептидных цепей, в которых наблюдается полное совпадение аминокислот, отмечены звездами (*), значительное сходство аминокислот – двоеточиями (:), сходство аминокислот – точками (.).

Результаты анализа последовательности протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, выполненного с использованием вычислительных ресурсов сервера NCBI BLAST, свидетельствуют о принадлежности исследуемого фермента к семейству протеиназы-К-подобных (proteinase-K-like) субтилизиновых протеаз. Это семейство секретируемых субтилизиновых протеаз микроорганизмов (главным образом, мицелиальных грибов), обладающих разнообразной субстратной специфичностью, структурно гомологичных протеиназе К из гриба *Tritirachium album* (UniProt P06873). Идентичность аминокислотных последовательностей протеазы-активатора протеина С, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, и протеиназы К из *Tritirachium album* составляет 41%, доля сходных аминокислот – 53%.

Были установлены наиболее близкие к протеазе микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D ферменты, которые ранее были подробно изучены в других лабораториях. Это протеазы микромицетов *A. fumigatus* ATCC MYA-4609 (UniProt P28296), *A. oryzae* ATCC 42149 (UniProt P12547) и *A. flavus* 28 (UniProt P35211). Все эти протеазы принадлежат к семейству протеиназы-К-подобных субтилизиновых протеаз и имеют в своих последовательностях соответственно 80, 77 и 74% идентичных, или 89, 88 и 85% сходных аминокислот с последовательностью протеазы *A. ochraceus* ВКМ F-4104D.

Протеаза микромицета *A. fumigatus* ATCC MYA-4609 была впервые обнаружена и исследована в качестве одного из факторов вирулентности при микозах легких, которые вызывает образующий ее штамм [180, 181]. В дальнейшем важная роль этой протеазы в развитии микозов была подтверждена, а также выявлены ее эластинолитическая и коллагенолитическая активности, способность расщеплять белки системы комплемента крови, а также аллергенное действие [182-184]. Последовательность фермента, регуляция его образования, доменное строение и основные свойства были подробно исследованы. Фермент синтезируется в виде неактивного предшественника длиной 403 аминокислоты, который имеет сигнальную последовательность Met¹-Ala²¹, пропептидный

участок Pro²²-Asp¹²¹ и протеазный домен Ala¹²²-Ala⁴⁰³. Каталитическую триаду формируют аминокислоты Asp¹⁶², His¹⁹³ и Ser³⁴⁹ [185-187].

Продукты гидролиза пищевых белков протеазой микромицета *A. oryzae* ATCC 42149 обладают хорошими вкусовыми качествами, что обеспечило активное использование этого фермента в пищевой промышленности, в частности, при производстве соевых соусов и сакэ. Ее последовательность, доменное строение и свойства также подробно исследованы. Полипептидная цепь предшественника этого фермента состоит из 403 аминокислот и включает в себя сигнальную последовательность Met¹-Ala²¹, пропептид Pro²²-Asp¹²¹ и протеазный домен Gly¹²²-Ala⁴⁰³. Каталитическая триада протеазы сформирована аминокислотами Asp¹⁶², His¹⁹³ и Ser³⁴⁹ [188-191].

Штамм микромицета *A. flavus* 28 был выделен из больного, умершего от микоза. Протеаза, секретируемая этим микромицетом, обладает выраженной эластинолитической активностью и является одним из факторов патогенности данного штамма. Синтезируется в форме предшественника длиной 403 аминокислоты, имеющего сигнальную последовательность Met¹-Gly²¹, пропептид Pro²²-Phe¹²¹ и протеазный домен Asp¹²²-Ala⁴⁰³. Каталитическая триада фермента представлена аминокислотами Asp¹⁶², His¹⁹³ и Ser³⁴⁹ [192].

Протеаза, секретируемая микромицетом *T. album*, обладает высокой протеолитической активностью по отношению к кератину, благодаря чему изначально была названа протеиназой К [193]. Позднее была обнаружена ее способность к быстрой инактивации нуклеаз и устойчивость к детергентам, что привело к широкому использованию фермента при выполнении молекулярно-биологических реакций [194]. Протеиназа К синтезируется в виде неактивного предшественника длиной 384 аминокислоты, состоящего из сигнальной последовательности Met¹-Gly¹⁵, пропептида Ala¹⁶-Asn¹⁰⁵ и протеазного домена Ala¹⁰⁶-Ala³⁸⁴. Методами рентгеноструктурного анализа установлено наличие у зрелой формы фермента двух кальций-связывающих доменов, стабилизирующих

структуру молекулы. Каталитическую триаду протеазы составляют аминокислоты Asp¹⁴⁴, His¹⁷⁴ и Ser³²⁹ [195-197].

Поскольку доменное строение перечисленных гомологичных протеаз мицелиальных грибов подробно исследовано и основано на многочисленных экспериментальных данных, по результатам множественного выравнивания (рис. 19) можно с высокой степенью вероятности предсказать доменную структуру протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Предположительно, первая 21 аминокислота исследуемого фермента (Met¹-Ala²¹) составляет сигнальную последовательность, далее располагается 101-аминокислотный пропептидный домен (Pro²²-Asp¹²²), за которым следует протеазный домен, состоящий из 282 аминокислот (Ala¹²³-Ala⁴⁰⁴). По всей видимости, зрелая форма протеазы *A. ochraceus* ВКМ F-4104D содержит два кальций-связывающих домена, стабилизирующих ее молекулу. Наиболее вероятно, каталитическая триада фермента сформирована аминокислотами Asp¹⁶³, His¹⁹⁴ и Ser³⁵⁰. Предполагаемая доменная структура фермента представлена на рисунке 20.

Интересно заметить, что несмотря на высокую гомологию, субстратная специфичность исследованных в данном разделе протеаз различается. Это свидетельствует о том, что специфичность ферментов в данном случае обеспечивается неконсервативными варибельными участками аминокислотной цепи и является наглядным примером эволюционной дивергентности протеаз. В то время как сходные специфичности протеаз микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D и яда змеи *Agk. contortrix contortrix*, которые относятся к разным семействам сериновых протеаз, демонстрируют их эволюционную субстратную конвергентность.

10 20 30 40 50 60
MPSFKQTLLLLGAMLPVFGAPVENTRRASEKIAGKYIVTFKNGIDTAKIEQHTTWATNI

70 80 90 100 110 120
 HKRNLARRDGSDDSDLPVGIKFKIKDFAAYFGSFDDSTIEEIRKSADVAHIEEDQVWH

130 140 150 160 170 180
 LDALTTQTGATWGLGSI**SHK**GESSTSYVYDSSAGEGTYGYVVD**DT**GINVDHSEFGGRASLA
 1 10 20 30 40 50

190 200 210 220 230 240
 YNAVGGQHVD**SVG**IGTHVAGTIGGKTYGVSKKANLLSVKVFQGESSTSIILDGYNWAAN
 60 70 80 90 100 110

250 260 270 280 290 300
 DIVSKSRTGKAAINLSLGGGYSYAFNQAVENAFDEGVLTVVAAGNENSDAGNTSPASAPN
 121 130 140 150 160 170

310 320 330 340 350 360
 ALTVAASTNRNARASFSNYGSVVDV**FAP**QDIKSAWIGGSSATNTISGT**SM**ATPHIVGLA
 181 190 200 210 220 230

370 380 390 400
 IY**LQ**ALEGLTSPAAVTKRIKELATSGVVTDVKGSPNLLAYNGAA
 241 250 260 270 280

Рис. 20. Аминокислотная последовательность и предполагаемая доменная структура протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Участок полипептидной цепи, отщепляющийся в процессе созревания фермента, показан шрифтом серого цвета, сигнальная последовательность подчеркнута. На последовательности протеазного домена выделены предполагаемые аминокислоты каталитической триады. Нумерация сверху аминокислотной цепи выполнена от начала всей последовательности, снизу – от начала протеазного домена.

Для проверки правильности предсказанной по результатам множественного выравнивания доменной структуры протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D при помощи вычислительных ресурсов сервера ExPasy PeptideMass провели расчет сайтов трипсинолиза и масс получаемых фрагментов при масс-спектрометрическом анализе предполагаемой зрелой формы фермента. Результаты расчета представлены в таблице 8.

Таблица 8. Расчет фрагментов, получаемых при трипсинолизе зрелой формы протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, при масс-спектрометрическом исследовании (ExPasy PeptideMass)

Масса, кДа	Позиция ³	Аминокислотная последовательность
5899,8280	129-188	AAINLSLGGGYSYAFNQA VENAFDEGLTVVAAGNEN SDAGNTSPASAPNALTVAASTNR
4343,2591	212-255	SAWIGGSSATNTISGTSMATPHIVGLAIYLQALEGLTSP AAVTK
3762,6313	19-54	GESSTSYVYDSSAGEGTYGYVVDTGINVDHSEFGGR
2801,3628	98-123	VFQGESSTSIILDGYNWAANDIVSK
2760,3811	55-83	ASLAYNAVGGQHVD SVGHGTHVAGTIGGK
2101,0236	192-211	ASFSNYGSVVDVFAPGQDIK
1828,9551	1-18	ALTTQTGATWGLGSISHK
1218,6576	259-270	ELATSGVVTDVK
1147,5742	271-282	GSPNLLAYNGAA
744,4614	91-97	ANLLSVK
654,3457	84-89	TYGVSK

Полученные в результате расчета массы фрагментов совпали с данными ранее выполнявшегося экспериментального масс-спектрометрического анализа зрелого фермента из культуральной жидкости [198]. В частности, полностью совпала расчетная масса предполагаемого начального фрагмента протеазного

³ По отношению к началу протеазного домена.

домена ALTTQTGATWGLGSISHK. Это свидетельствует о правильности предсказания границ доменов протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D на основании результатов множественного выравнивания.

3.4. Получение протеазы-активатора протеина С плазмы крови в бактериальной экспрессионной системе

3.4.1. Исследование различных режимов белковой экспрессии

Для проведения белковой экспрессии была получена молекулярно-генетическая конструкция на основе вектора pET23d, несущего кДНК протеазы-активатора протеина С микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, лишенной участка сигнальной последовательности. Встраивание кДНК в вектор было проведено по сайтам рестрикции *NcoI* и *XhoI*, чтобы С-концевая часть получаемой рекомбинантной формы фермента несла шесть остатков гистидина (*6xHis-tag*) для аффинной очистки. Элиминация сигнальной последовательности выполнена для предотвращения возможного подавления белковой экспрессии в бактериальной системе. Полученной экспрессионной плазмидой были трансформированы клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3).

Для проведения первых экспериментов по изучению разных режимов экспрессии свежетрансформированные клетки выращивали в условиях глубинного культивирования в жидкой питательной среде LB до оптической плотности культуры $OD_{600} \approx 0,6$, после чего индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. После этого выполняли инкубацию культуры при 37°C в течение 3 часов (режим стандартной экспрессии) и 16°C в течение 15 часов (режим холодной экспрессии). Результаты анализа белкового состава биомассы экспрессирующих клеток до и после индукции методом SDS-PAGE по Леммли представлены на рисунке 21.

По результатам анализа хорошо заметно отсутствие целевого фермента в биомассе экспрессионных клеток до добавления индуктора белкового синтеза IPTG (рис. 21А и 21Б, дорожка 2). После индукции белкового синтеза в режиме стандартной экспрессии произошло обильное накопление продукта с молекулярной массой около 45 кДа, а в режиме холодной экспрессии – менее интенсивное образование продукта с молекулярной массой около 35 кДа (рис. 21А и 21Б, дорожка 3). Кроме этого, в режиме холодной экспрессии отчетливо заметно появление протеолитической деградации белков домашнего хозяйства клеток штамма-продуцента, проявляющейся в виде исчезновения белков высокомолекулярной массы с одновременным возникновением широкой зоны продуктов протеолиза в низкомолекулярной области («низкомолекулярный шмер»).

Полученные результаты свидетельствуют о накоплении целевого фермента в виде неактивного предшественника с пропептидным доменом массой около 45 кДа при стандартной экспрессии, в то время как в режиме холодной экспрессии происходит расщепление пропептидного домена с образованием зрелой формы фермента массой около 35 кДа. При этом синтез и накопление целевого фермента в режиме стандартной экспрессии происходит значительно интенсивнее. Расщепление белков домашнего хозяйства клеток штамма-продуцента свидетельствует о появлении протеолитической активности синтезируемого фермента. Подобные различия в режимах экспрессии можно объяснить тем, что при стандартном режиме происходит быстрый и интенсивный синтез белка, который не успевает правильно свернуться, созреть и приобрести активность, в то время как при холодном режиме скорость белкового синтеза существенно ниже, что позволяет получать правильно свернутую созревшую активную форму фермента.

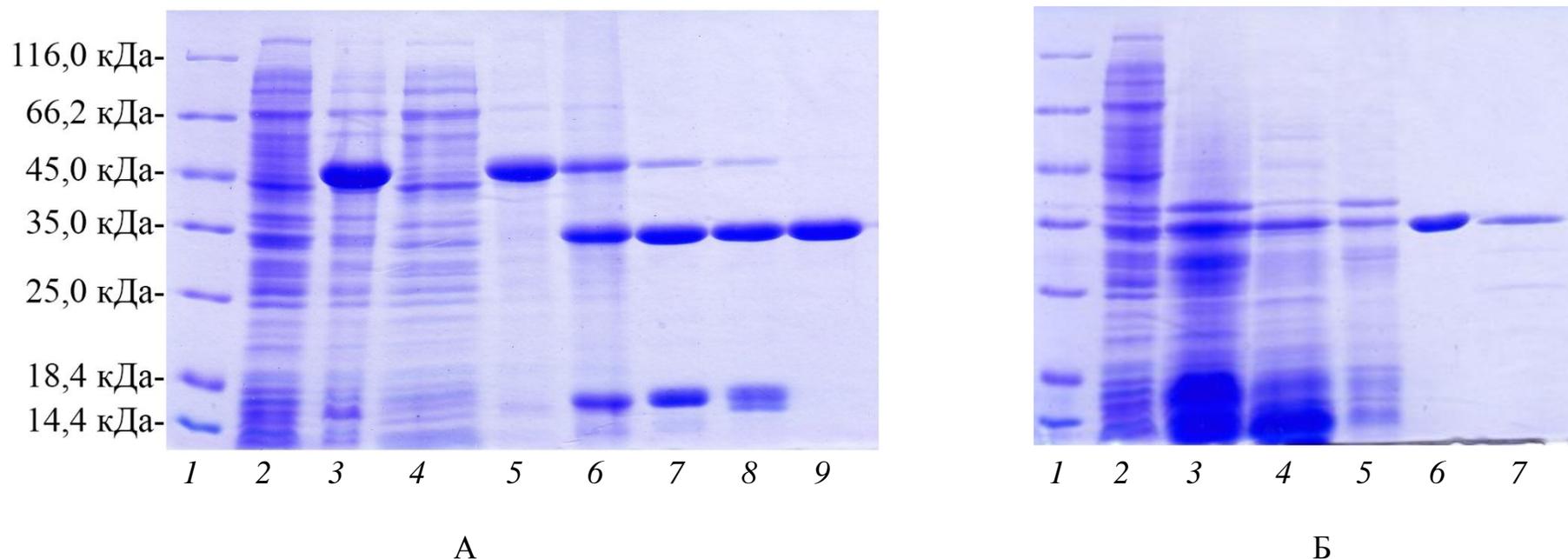


Рис. 21. Электрофоретический анализ белкового состава фракций, полученных в процессе экспрессии, фракционирования и очистки рекомбинантной протеазы-активатора протеина С плазмы крови:

А – режим стандартной экспрессии: 1 – маркеры молекулярных масс, 2 – бактериальная культура до индукции белкового синтеза, 3 – бактериальная культура после индукции, 4 – растворимая фракция биомассы, 5 – нерастворимая фракция биомассы, 6 – рекомбинантная протеаза-активатор протеина С после рефолдинга, 7 – после аффинной очистки и диализа, 8 – в процессе созревания, 9 – после созревания;

Б – режим холодной экспрессии: 1 – маркеры молекулярных масс, 2 – бактериальная культура до индукции белкового синтеза, 3 – бактериальная культура после индукции, 4 – растворимая фракция биомассы, 5 – нерастворимая фракция биомассы, 6 – рекомбинантная протеаза-активатор протеина С плазмы крови после аффинной очистки, 7 – протеаза-активатор протеина С плазмы крови, полученная из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* VKM F-4104D.

Фракционирование биомассы продуцирующих клеток после экспрессии показало, что при стандартном режиме целевой белок находится в нерастворимой форме в виде осадка тел включения и полностью отсутствует в растворимой фракции супернатанта (рис. 21А, дорожки 4 и 5). Для получения растворимой активной формы целевого фермента при стандартном режиме экспрессии необходима сольubilизация нерастворимого осадка в хаотропирующих агентах с последующим рефолдингом и хроматографической очисткой (рис. 21А, дорожки 6 и 7). После этого наблюдается полное расщепление пропептидного домена и переход целевого фермента в зрелую форму (рис. 21А, дорожки 8 и 9).

В то же время, при холодной экспрессии получаемый фермент находится преимущественно в растворимой фракции (рис. 21Б, дорожки 4 и 5). Для получения препарата высокоочищенного активного фермента в этом режиме экспрессии достаточно провести аффинную очистку растворимой фракции биомассы. Это существенно упрощает и ускоряет технологический процесс получения фермента и является преимуществом холодной экспрессии перед стандартным вариантом, требующим предварительного рефолдинга.

Поскольку рекомбинантная форма фермента имеет *6xHis-tag* на С-конце полипептидной цепи, она прочно связывается с металлохелатными аффинными сорбентами, что позволяет выполнять эффективную одностадийную очистку. При выполнении нативной аффинной очистки растворимой фракции биомассы после холодной экспрессии на Ni-NTA-агарозе элюцию высокоочищенного целевого фермента наблюдали при концентрации имидазола в хроматографическом буфере 200 мМ (рис. 21Б, дорожка 6). Предварительное промывание хроматографической колонки более низкими концентрациями имидазола в 20 и 60 мМ позволило эффективно отделить примесные белки, неспецифично связавшиеся с сорбентом. Полученный в процессе аффинной хроматографической очистки профиль элюции представлен на рисунке 22.

Выход очищенного активного фермента при холодной экспрессии составил около 50 мг с 1 литра бактериальной культуры.

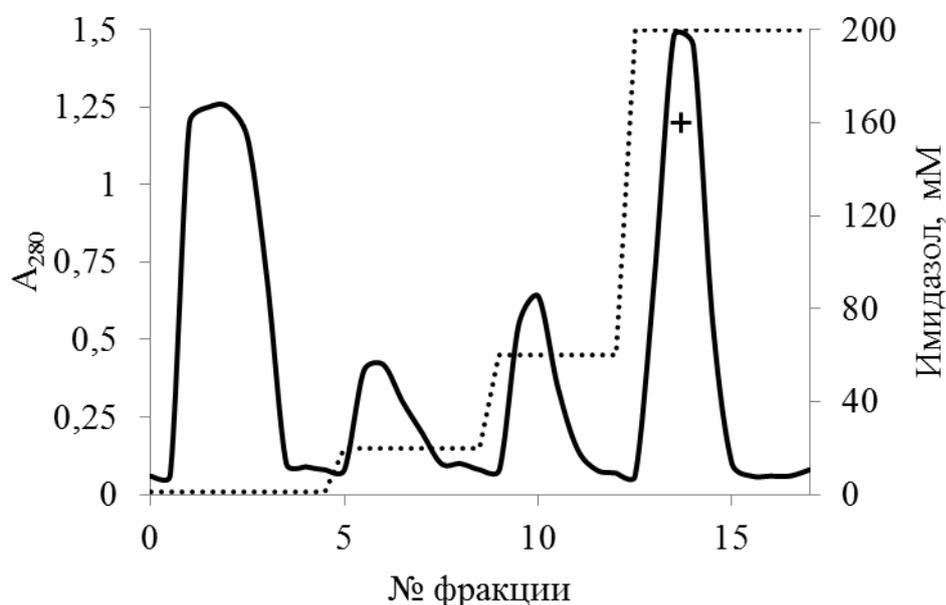


Рис. 22. Профиль элюции, полученный в ходе аффинной очистки рекомбинантной формы протеазы-активатора протеина С плазмы крови на Ni-NTA-агарозе в нативных условиях. Сплошной линией показаны величины оптической плотности элюата при 280 нм, точечной – градиент имидазола, знаком «+» отмечены фракции, содержавшие целевой фермент.

Полученная рекомбинантная форма протеазы-активатора С плазмы крови обладала идентичной электрофоретической подвижностью по сравнению с нативным ферментом, очищенным из культуральной жидкости продуцента (рис. 21Б, дорожки 6 и 7). Ферментативные свойства рекомбинантной и нативной форм фермента оказались также одинаковы: обе формы расщепляли хромогенные пептидные субстраты протеина С (pGlu-Pro-Arg-pNA) и фактора X (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) в сопряженных реакциях, плазмина (H-d-Val-Leu-Lys-pNA) и тромбина (Tos-Gly-Arg-pNA) в прямых, и не расщепляли другие исследованные субстраты (таблица 9). Данные результаты свидетельствуют о том, что получение исследуемого фермента в рекомбинантной форме не привело к изменению его ферментативных свойств.

Таблица 9. Субстратная специфичность рекомбинантной и нативной форм протеазы-активатора протеина С плазмы крови с хромогенными пептидными субстратами

Субстрат	Рекомбинантная форма	Нативная форма
Сопряженные реакции (с плазмой крови)		
pGlu-Pro-Arg-pNA	+	+
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	+	+
Прямые реакции (без плазмы крови)		
pGlu-Pro-Arg-pNA	-	-
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	-	-
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	+	+
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	+	+
H-D-Pro-Phe-Arg-pNA	-	-
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	-	-

Таким образом, получение рекомбинантной формы протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, может применяться при производстве препаративных количеств исследуемого фермента. Ферментные препараты, получаемые таким способом, обладают идентичными свойствами по сравнению с нативными и могут быть использованы для проведения дальнейших доклинических и клинических исследований. Данный способ получения исследуемого фермента может быть применен на биотехнологических производствах, которые не предназначены для культивирования микромицетов, что диверсифицирует производственные возможности и потенциально увеличивает доступность фермента для конечных потребителей.

3.4.2. Рефолдинг и созревание исследуемого фермента

Поскольку в процессе исследования экспрессии протеазы-активатора протеина С плазмы крови было установлено, что целевой фермент способен в больших количествах накапливаться в нерастворимой форме в виде тел включения, использование методов рефолдинга может повысить эффективность его получения. Отсутствие остатков цистеина и дисульфидных связей в молекуле фермента дает возможность избежать этапов восстановления и окисления в процессе рефолдинга, что снижает сложность выполнения этого процесса. В связи с этим исследование особенностей рефолдинга протеазы-активатора протеина С плазмы крови имеет большую научно-прикладную значимость.

При разработке методов рефолдинга целевого фермента учитывали описанные в литературе данные по особенностям рефолдинга субтилизиновых протеаз [199, 200]. Поскольку образование нерастворимых тел включения является результатом неправильного сворачивания молекулы, неактивная форма фермента до рефолдинга состоит из пропептидного и ферментативного доменов и на SDS-электрофореze визуализируется как одна полоса с массой около 45 кДа. В процессе рефолдинга восстанавливается правильная конформация молекулы фермента, в результате чего происходит автокаталитическое расщепление полипептидной цепи на границе пропептидного и протеазного доменов. На SDS-электрофореze этот процесс выглядит как расщепление исходной полосы массой около 45 кДа на две полосы: зрелого ферментативного домена массой около 35 кДа и пропептидного домена массой около 18 кДа. По интенсивности расщепления исходной полосы незрелого предшественника фермента в процессе рефолдинга можно оценивать эффективность проведения этого процесса. Для получения наиболее объективной картины перед приготовлением образцов для электрофореza в анализируемых фракциях проводят осаждение белка трихлоруксусной кислотой. Это останавливает процессы рефолдинга и предотвращает искажения, оказываемые на них при добавлении SDS и нагревании во время приготовления образцов для электрофореza.

На первоначальном этапе провели скрининговую оценку эффективности различных соединений как аддитивов для рефолдинга протеазы-активатора протеина С плазмы крови. В качестве кандидатных рефолдирующих агентов для исследования использовали доступные для масштабного применения в промышленности вещества, такие как сульфат аммония, аргинин, глицерин, сахароза, твин и тритон X-100. Для проведения оценки использовали наиболее простой в исполнении способ рефолдинга, а именно разбавление солюбилизата тел включения исследуемого белка в 8 М мочеvine в исходной концентрации 0,1 мг/мл в 20 раз в рефолдирующем буфере с различными аддитивами при комнатной температуре. В качестве рефолдирующего буфера выбрали 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ СаСl₂, поскольку он имеет оптимальное значение рН для проявления активности исследуемого фермента, а содержащиеся в нем ионы кальция способствуют стабилизации его молекулы. Полученные в ходе исследования результаты анализа эффективности различных соединений для проведения рефолдинга представлены на рисунке 23.

Как хорошо заметно из полученных результатов, солюбилизат тел включения в 8 М мочеvine до рефолдинга представляет собой единую нерасщепленную полипептидную цепь пропептидного и энзиматического доменов с массой около 45 кДа (рис. 23, дорожка 2). При рефолдинге в буфере без аддитивов происходит расщепление полипептидной цепи предшественника на фрагменты, соответствующие отдельно пропептидному (15 кДа) и энзиматическому (35 кДа) доменам, однако доля нерасщепленного предшественника остается достаточно высокой (рис. 23, дорожка 3). Наиболее активное расщепление исходного предшественника произошло при использовании сульфата аммония, глицерина и сахарозы в качестве аддитивов для рефолдинга (рис. 23, дорожки 4, 6 и 7). В то же время, аргинин и детергенты оказали отрицательное влияние на выход правильно свернутого фермента в процессе рефолдинга (рис. 23, дорожки 5, 8-10).

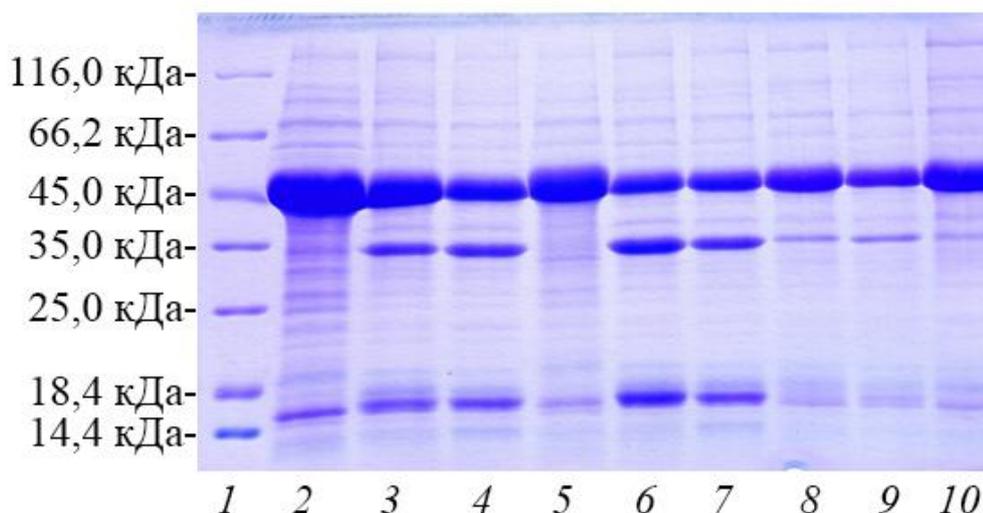


Рис. 23. Эффективность различных соединений (в качестве аддитивов) для проведения рефолдинга рекомбинантной протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом

A. ochraceus ВКМ F-4104D, при комнатной температуре:

1 – маркеры молекулярных масс, 2 – солюбилизиат тел включения в 8 М мочевины до рефолдинга, 3 – после рефолдинга в рефолдирующем буфере без аддитивов (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ СаСl₂), 4 – в рефолдирующем буфере с 0,5 М сульфатом аммония, 5 – с 0,5 М аргинином, 6 – с 10%-м глицерином, 7 – с 10%-й сахарозой, 8 – с 0,1%-м Твин-20, 9 – с 0,1%-м Твин-80, 10 – с 0,1%-м Тритон Х-100.

На следующем этапе оптимизации рефолдинга оценивали его эффективность при различных концентрациях аддитивов, отобранных на первом этапе, чтобы установить наиболее оптимальные условия его проведения. Для этого выполняли процесс в присутствии 5-50% глицерина и сахарозы, а также 0,25-1,5 М сульфата аммония при комнатной температуре. Результаты анализа полученных фракций представлены на рисунке 24. Видно, что наилучшие результаты были получены при проведении рефолдинга в присутствии глицерина и сахарозы в концентрациях более 30% (рис. 24, дорожки 5-7 и 11-13), в остальных опытах выход правильно свернутого фермента был ниже (рис. 24, дорожки 2-4, 8-10 и 15-20). Таким образом, дальнейшие эксперименты по исследованию и оптимизации рефолдинга решили проводить в присутствии 1 М (34,2%-й) сахарозы в качестве аддитива.

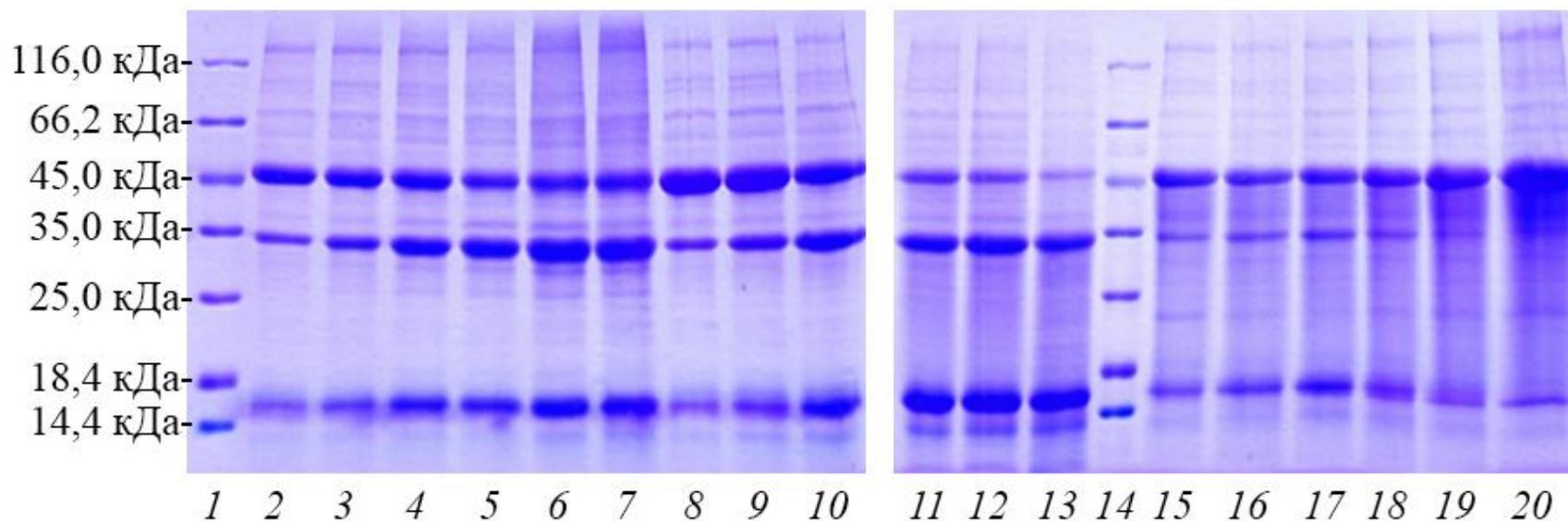


Рис. 24. Эффективность рефолдинга рекомбинантной протеазы-активатора протеина С при использовании различных концентраций глицерина, сахарозы и сульфата аммония в качестве аддитивов при комнатной температуре: 1 и 14 – маркеры молекулярных масс, 2 – после рефолдинга в присутствии 5%-го глицерина, 3 – 10%-го глицерина, 4 – 20%-го глицерина, 5 – 30%-го глицерина, 6 – 40%-го глицерина, 7 – 50%-го глицерина, 8 – 5%-й сахарозы, 9 – 10%-й сахарозы, 10 – 20%-й сахарозы, 11 – 30%-й сахарозы, 12 – 40%-й сахарозы, 13 – 50%-й сахарозы, 15 – 0,25 М сульфата аммония, 16 – 0,5 М сульфата аммония, 17 – 0,75 М сульфата аммония, 18 – 1 М сульфата аммония, 19 – 1,25 М сульфата аммония, 20 – 1,5 М сульфата аммония.

Было исследовано влияние степени разведения исходного солубилизата тел включения при рефолдинге на его эффективность, результаты показаны на рисунке 25. Видно, что формирование правильно свернутого фермента происходит при разбавлении в 10 раз и более (рис. 25, дорожки 5-7). При меньших разбавлениях фермент остается преимущественно в денатурированной форме (рис. 25, дорожки 2-4), что свидетельствует о необходимости снижения концентрации мочевины ниже 0,8 М для проведения успешного рефолдинга. Исходя из полученных результатов, на дальнейших этапах оптимизации рефолдинга использовали разбавление в 10 раз.

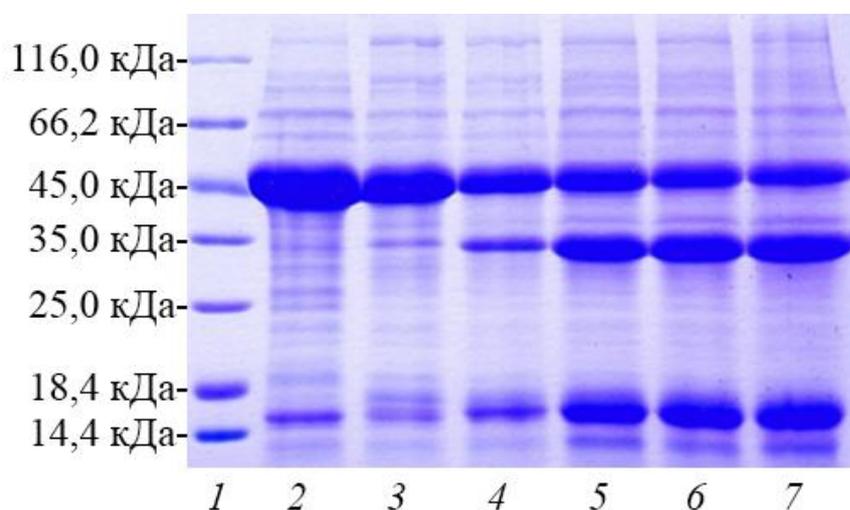


Рис. 25. Эффективность рефолдинга протеазы-активатора протеина С плазмы крови при различных разбавлениях исходного солубилизата тел включения (комнатная температура, аддитив – 34,2% сахара):
 1 – маркеры молекулярных масс, 2 – разбавление в 2 раза (концентрация мочевины 4 М), 3 – в 4 раза (концентрация мочевины 2 М), 4 – в 6 раз (концентрация мочевины 1,3 М), 5 – в 10 раз (концентрация мочевины 0,8 М), 6 – в 15 раз (концентрация мочевины 0,5 М), 7 – в 20 раз (концентрация мочевины 0,4 М).

Далее исследовали влияние температуры на эффективность протекания рефолдинга, для чего провели процесс при температурах +37°C (рис. 26А) и +4°C (рис. 26Б). Видно, что при температуре +4°C происходит более интенсивное расщепление полипептидной цепи фермента между протеазным и пропептидным доменами, которое свидетельствует о повышении выхода правильно

свернувшегося фермента во время проведения рефолдинга при сниженной температуре. В то же время, из результатов данного эксперимента следует, что первоначальное расщепление полипептидной цепи между протеазным и пропептидным доменами происходит сразу после разбавления (рис. 26А, 26Б, дорожки 2 и 3), и в ходе дальнейшей инкубации деградации пропептидного домена не наблюдается (рис. 26А, 26Б, дорожки 4-6). Это свидетельствует о том, что созревание фермента после рефолдинга в буфере с сахарозой не происходит, из чего следует необходимость дополнительной стадии очистки исследуемой протеазы после проведения рефолдинга.

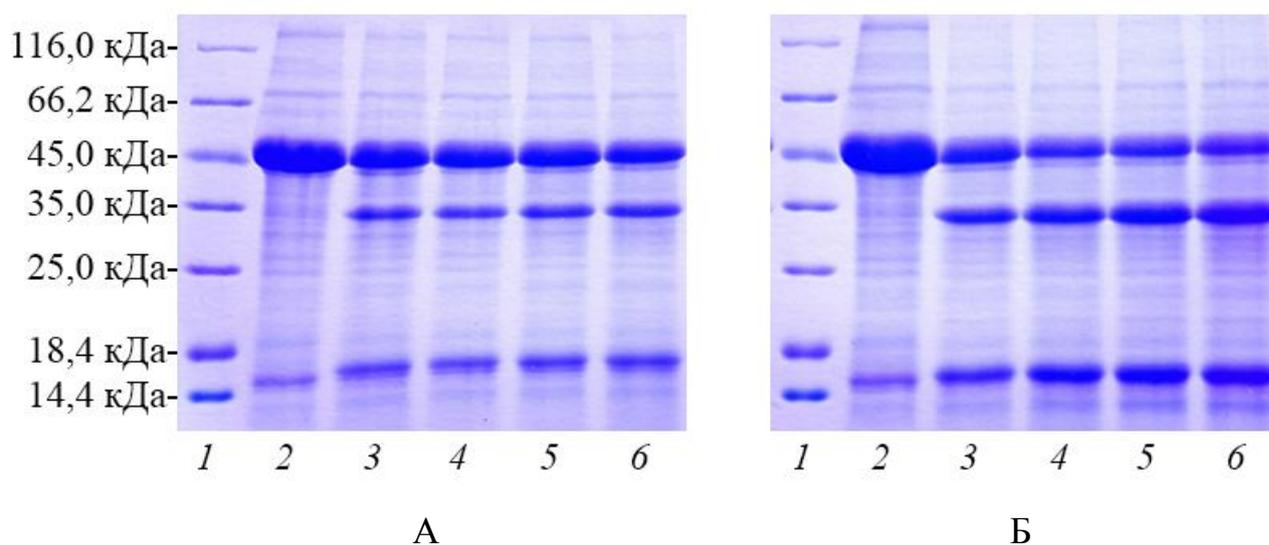


Рис. 26. Рефолдинг протеазы-активатора протеина С плазмы крови при температурах $+37^{\circ}\text{C}$ (А) и $+4^{\circ}\text{C}$ (Б):
 1 – маркеры молекулярных масс, 2 – до рефолдинга, 3 – через 10 минут после разбавления в рефолдирующем буфере, 4 – через 30 минут, 5 – через 1 час, 6 – через 2 часа.

Для выполнения очистки целевого фермента после рефолдинга использовали аффинную хроматографию на Ni-NTA-агарозе, после которой провели диализ элюата против 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ СаСl₂ для удаления имидазола и NaCl, которые в высоких концентрациях могут оказывать влияние на созревание фермента. После диализа в течение нескольких суток

инкубировали фермент при температурах $+37^{\circ}\text{C}$ и $+4^{\circ}\text{C}$ для исследования особенностей его созревания. Результаты эксперимента показаны на рисунке 27.

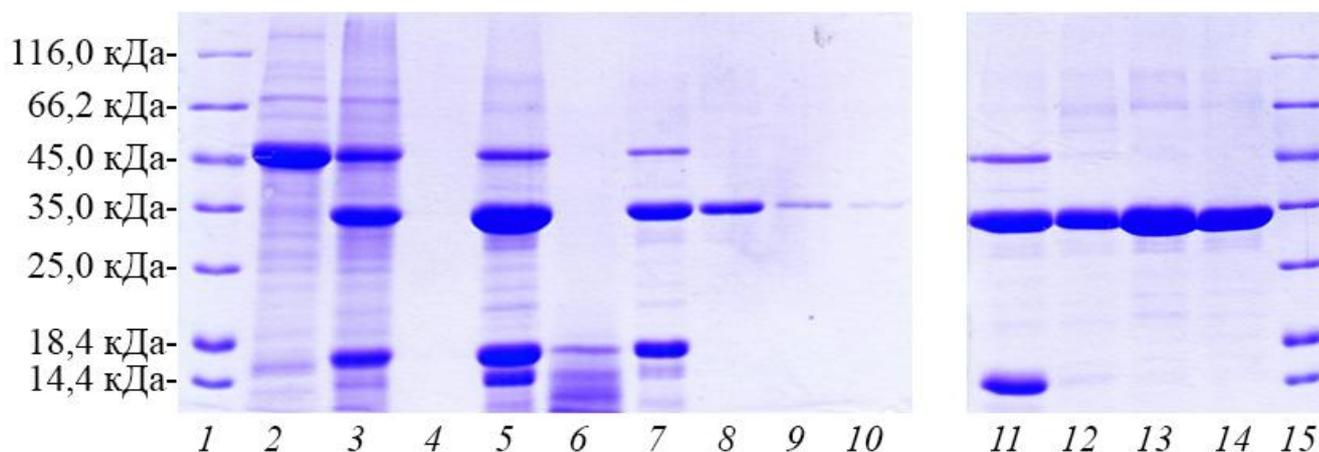


Рис. 27. Хроматографическая очистка Ni-NTA-агарозе и созревание рекомбинантной протеазы-активатора протеина С плазмы крови после рефолдинга:

1 и 15 – маркеры молекулярных масс, 2 – до рефолдинга, 3 – после рефолдинга, 4 – фракция материала, не связавшегося с Ni-NTA-агарозой, 5 – фермент после хроматографической очистки, 6 – осадок после диализа, 7 – фермент после диализа, 8 – фермент после созревания (инкубации) в течение 1-х суток при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, 9 – 2-х суток при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, 10 – 3-х суток при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, 11 – 1-х суток при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, 12 – 2-х суток при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, 13 – 3-х суток при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, 14 – 4-х суток при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

Видно, что при нанесении исследуемого фермента после рефолдинга на Ni-NTA-агарозу происходит его полная сорбция на хроматографическом носителе, о чем свидетельствует его отсутствие во фракции материала, не связавшегося с сорбентом (рис. 27, дорожки 2-4). Во фракции фермента после хроматографической очистки произошло уменьшение количества нерасщепленного предшественника массой 45 кДа, а также началась деградация пропептидного домена, что является свидетельством начавшегося процесса созревания фермента (рис. 27, дорожка 5). Учитывая, что отвечающий за связывание с Ni-NTA-агарозой 6xHis-tag находится на С-конце полипептидной цепи, то есть в конце протеазного домена, и отсутствует на пропептидном домене,

присутствие последнего во фракции после хроматографической очистки говорит о том, что после расщепления полипептидной цепи предшественника между протеазным и пропептидным доменами они некоторое время остаются прочно связанными друг с другом.

В процессе диализа очищенного фермента произошло выпадение в осадок фрагментов пропептидного домена, а также продолжилось созревание исследуемой протеазы (рис. 27, дорожки 6 и 7). По результатам проведенного эксперимента, во время первых суток инкубации при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ произошло окончательное созревание фермента с исчезновением нерасщепленного предшественника и полной деградацией пропептидного домена (рис. 27, дорожка 8). Дальнейшее инкубирование созревшего фермента привело к его постепенной деградации (рис. 27, дорожки 9 и 10). Созревание фермента при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ происходило сходным образом, однако более медленно: с полным расщеплением пропептидного домена на вторые сутки инкубации и менее выраженной деградацией зрелого фермента при дальнейшем инкубировании (рис. 27, дорожки 11-14).

Поскольку было установлено, что при инкубации созревшего фермента происходит его деградация, понимание точной временной кинетики созревания необходимо для правильного планирования технологических процессов получения фермента. В связи с этим провели почасовое исследование временной кинетики созревания очищенной рекомбинантной протеазы-активатора протеина С плазмы крови после рефолдинга при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ (рис. 28). Видно, что полное созревание фермента произошло между вторым и четвертым часами инкубации (рис. 28, дорожки 2-8).

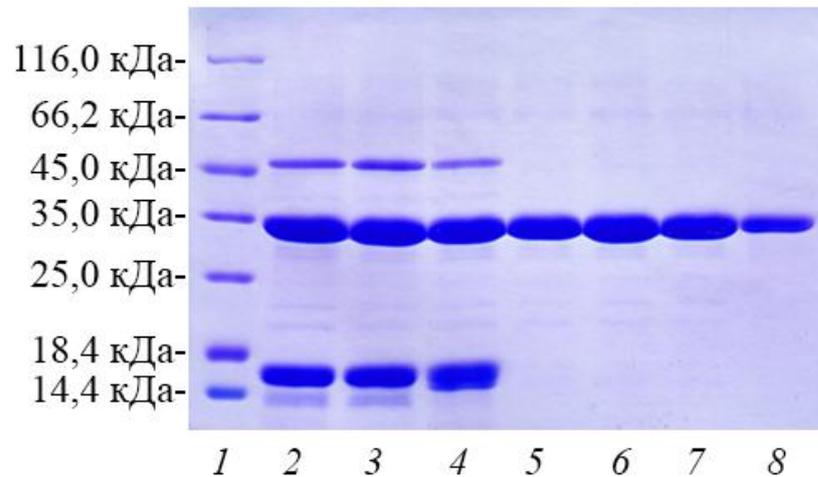


Рис. 28. Почасовое созревание очищенной рекомбинантной протеазы-активатора протеина С плазмы крови после рефолдинга во время инкубации при температуре +37°C:

1 – маркеры молекулярных масс, 2 – очищенный фермент после диализа перед инкубацией, 3 – после инкубации в течение 1-го часа, 4 – 2-х часов, 5 – 4-х часов, 6 – 6-ти часов, 7 – 8-ми часов, 8 – 24-х часов.

Выход активного фермента при использовании оптимизированных в настоящей работе методов рефолдинга составил 250 мг с 1 литра бактериальной культуры. Это делает привлекательным использование рефолдинга для получения препаративных количеств исследуемой протеазы в биотехнологической промышленности.

3.5. Возможные технологические схемы производства протеазы-активатора протеина С плазмы крови

Любое биотехнологическое производство является комплексом помещений, содержащих специализированное оборудование, для работы которого необходима слаженная работа коллектива высококвалифицированных специалистов разных профилей. С этим связана необходимость привлечения большого объема инвестиционных средств для открытия, отладки и запуска биотехнологических производств, что является существенным лимитирующим фактором для развития биотехнологической промышленности. Это обуславливает экономическую целесообразность получения биофармацевтических субстанций для первичных этапов клинических исследований с использованием ресурсов уже имеющихся биотехнологических производств. Поскольку существующие производства имеют разный состав оборудования и специалистов, возможность наработки исследуемой субстанции на различных производствах за счет гибкости и адаптируемости методики ее получения снижает временные и финансовые затраты на внедрение такой субстанции в промышленное использование.

Результаты выполненных в ходе настоящей работы исследований позволяют предложить три возможные технологические схемы производства протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, которые представлены на рисунке 29. Данные схемы позволяют получать исследуемую протеазу как на производствах, специализированных на работе с продуцирующими штаммами мицелиальных грибов, так и с бактериальными системами экспрессии белков. Это существенно расширяет спектр возможностей для препаративного получения фермента.

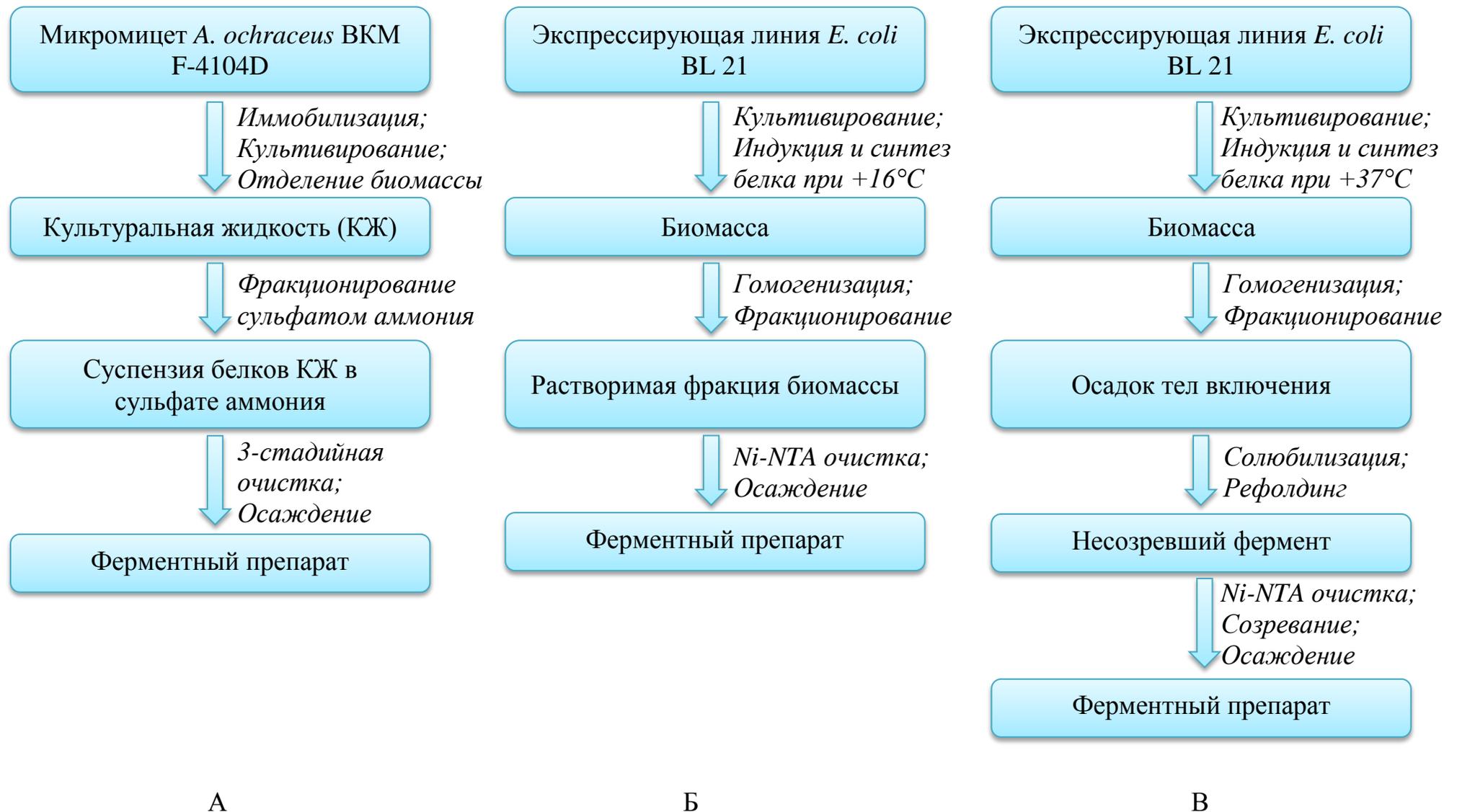


Рис. 29. Возможные технологические схемы производства протеазы-активатора протеина С плазмы крови: с использованием иммобилизованного микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D (А), получение рекомбинантного фермента в бактериальной системе экспрессии в растворимой форме (Б) и через тела включения (В).

Схема получения исследуемой протеазы на производствах, специализированных на культивировании мицелиальных грибов (рис. 29А), включает в себя иммобилизацию спор продуцента *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в гранулы альгината кальция с последующим культивированием полученных гранул в ферментационной среде. Культуральную жидкость, получаемую после отделения биомассы продуцента, фракционируют сульфатом аммония для осаждения целевого фермента. После осаждения проводят трехстадийную хроматографическую очистку фермента с подобранными в настоящей работе условиями, получаемый ферментный препарат стабилизируют осаждением или (и) лиофилизацией. Преимуществами данного метода является возможность многократного использования иммобилизованного продуцента в производственном процессе.

Для получения рекомбинантной формы фермента культивируют экспрессирующую линию клеток *E. coli* BL 21, затем проводят индукцию и синтез фермента. Полученную биомассу гомогенизируют и фракционируют, после чего сразу приступают к очистке на Ni-NTA-агарозе в случае индукции синтеза растворимой формы (рис. 29Б) либо проводят дополнительные стадии солубилизации и рефолдинга перед очисткой, а также созревания после очистки – при индукции образования нерастворимых тел включения (рис. 29В). Как и в первой схеме, очищенный активный ферментный препарат стабилизируют осаждением и (или) лиофилизацией. Преимуществом схем производства рекомбинантной формы исследуемого фермента является больший выход с литра бактериальной культуры, недостатком – невозможность работы с *E. coli* на некоторых биотехнологических производствах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы были разработаны и исследованы методы, позволяющие получать препаративные количества протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D, что необходимо для проведения дальнейших испытаний фермента и последующего его внедрения в практику. Следует заметить, что выявленные закономерности позволят в будущем значительно ускорить исследование и получение других протеолитических ферментов, образуемых микромицетами.

Исследовано влияние иммобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D на образование протеазы-активатора протеина С плазмы крови при глубинном культивировании. Выполнено сравнение наиболее известных полимеров в качестве иммобилизирующих носителей, по результатам которого для дальнейшей работы был выбран альгинат кальция. Подобраны оптимальные условия культивирования иммобилизованного микромицета, установлена повышенная интенсивность образования целевого фермента, увеличенная стабильность продуцента и возможность его многократного использования при культивировании.

Разработан метод очистки протеазы-активатора протеина С плазмы крови из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Метод представляет собой комбинацию фракционирования сульфатом аммония и гидрофобной, ионообменной и гель-проникающей хроматографии. В результате был получен высокоочищенный препарат активатора протеина С, удельная активность которого в процессе очистки возросла более чем в 350 раз.

Установлена последовательность гена и кДНК протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, показана принадлежность фермента к группе протеиназы-К-подобных

субтилизиновых протеаз. На основании биоинформатического анализа полученных данных предсказана доменная структура фермента.

Получена плаزمида для бактериальной экспрессии протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Подобраны условия экспрессии, выделения и очистки, в результате чего получен препарат активной рекомбинантной протеазы, идентичной по свойствам выделенному из культуральной жидкости ферменту.

Изучены особенности рефолдинга протеазы-активатора протеина С плазмы крови из фракции нерастворимых тел включения. Исследовано влияние наиболее популярных аддитивов, степени разбавления и температуры на эффективность рефолдинга и созревания, подобраны оптимальные условия проведения процессов для выхода активного фермента.

На основании анализа полученных результатов предложены три возможные технологические схемы получения протеазы-активатора протеина С плазмы крови, которые могут быть адаптированы к различным биотехнологическим производствам.

ВЫВОДЫ

1. Иммуобилизация микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D увеличивает интенсивность образования протеазы-активатора протеина С плазмы крови, повышает стабильность продуцента и делает возможным его многократное использование в процессе культивирования;
2. Разработан метод очистки протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, с использованием комбинации фракционирования сульфатом аммония и гидрофобной, ионообменной и гель-проникающей хроматографии;
3. Установлена и проанализирована последовательность гена протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D;
4. В результате бактериальной экспрессии в штамме *E. coli* BL21 и последующей хроматографической очистки на Ni-NTA-агарозе была получена функционально активная форма протеазы-активатора протеина С плазмы крови, идентичная образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D;
5. Исследованы особенности фолдинга и созревания рекомбинантной протеазы-активатора протеина С плазмы крови после экспрессии фермента в нерастворимой форме;
6. Предложены три возможные технологические схемы для получения исследуемой протеазы-активатора протеина С плазмы крови на различных биотехнологических производствах.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

EBI – European Bioinformatics Institute

EC – Enzyme Comission

EGF – эпидермальный фактор роста

EMBOSS – European Molecular Biology Open Software Suite

EPSCR – эндотелиальный рецептор к протеину C

IPTG – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид

MMLV – Moloney Murine Leukemia Virus

NCBI – National Center for Biotechnology Information

PC – протеин C

PMSF – фенилметилсульфонил фторид

RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends

SDS – додецилсульфат натрия

ТАЕ буфер – Трис-ацетат-ЭДТА буферный раствор

TF – тканевой фактор (тромбопластин)

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов

ВМК – высокомолекулярный кининоген

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДЭАЭ – диэтиламиноэтил

кДНК (cDNA) – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота

КФ – Комиссия по ферментам

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФСФ – фибринстабилизирующий фактор

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота (этилендиаминтетраацетат)

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ландау Н.С., Кураков А.В., Гуликова О.М., Батомункуева Б.П., Струкова С.М., Егоров Н.С. Экстрацеллюлярные протеиназы микромицетов с фибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Микробиология. 1998. 67, 2, 215-220.
2. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Микромицеты *Aspergillus ochraceus* – продуценты внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. 48, 5, 537-542.
3. Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Воздействие внеклеточных протеаз микромицетов рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза // Биоорганическая химия. 2014. 40, 6, 688-694.
4. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. Свойства внеклеточной протеиназы – активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. 51, 1, 86-92.
5. Осмоловский А.А., Орехова А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Возможность применения внеклеточной протеазы микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D для определения содержания протеина С в плазме крови человека // Биомедицинская химия. 2018. 64, 1, 115-118.
6. Gempeler-Messina P.M., Volz K., Buhler B., Muller C. Protein C activators from snake venoms and their diagnostic use // Haemostasis. 2001. 31, 3-6, 266-272.
7. Mohammed S., Favaloro E.J. Laboratory testing for activated protein C resistance (APCR) // Hemostasis and Thrombosis. 2017. 1646, 10, 137-143.
8. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. Образование микромицетом *Aspergillus ochraceus* внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови при глубинном и твердофазном

- культивировании // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. 49, 6, 580-586.
9. Батомункуева Б.П., Егоров Н.С. Выделение, очистка и разделение комплексного препарата внеклеточных протеиназ *Aspergillus ochraceus* 513 с фибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Микробиология. 2001. 70, 5, 602-606.
 10. Handbook of proteolytic enzymes / ed.: N.D. Rawlings, G. Salvesen. London: Elsevier, 2013. LIV, 3932 p.
 11. Banerjee G., Ray A.K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries // Biotechnol Genet Eng Rev. 2017. 33, 2, 119-143.
 12. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // Microbiol Mol Biol Rev. 1998. 62, 3, 597-635.
 13. Keil B. Specificity of proteolysis. Berlin: Springer-Verlag, 1992. VI, 336 p.
 14. Hamin Neto Y.A., da Rosa Garzon N.G., Peduzzi R., Cabral H. Specificity of peptidases secreted by filamentous fungi // Bioengineered. 2018. 9, 1, 30-37.
 15. Schechter I., Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain // Biochem Biophys Res Commun. 1967. 27, 2, 157-162.
 16. Abramowitz N., Schechter I., Berger A. On the size of the active site in proteases. II. Carboxypeptidase-A // Biochem Biophys Res Commun. 1967. 29, 6, 862-867.
 17. Song J., Tan H., Boyd S.E. et al. Bioinformatic approaches for predicting substrates of proteases // J Bioinform Comput Biol. 2011. 9, 1, 149-178.
 18. De Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases // Braz J Microbiol. 2015. 46, 2, 337-346.
 19. Yike I. Fungal proteases and their pathophysiological effects // Mycopathologia. 2011. 171, 5, 299-323.
 20. Rawlings N.D., Barrett A.J. Evolutionary families of peptidases // Biochem J. 1993. 290, 1, 205-218.

21. Rawlings N.D., Barrett A.J. MEROPS: the peptidase database // *Nucleic Acids Res.* 1999. 27, 1, 325-331.
22. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A., Finn R.D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database // *Nucleic Acids Res.* 2018. 46, 1, 624-632.
23. Pethe M.A., Rubenstein A.B., Khare S.D. Large-scale structure-based prediction and identification of novel protease substrates using computational protein design // *J Mol Biol.* 2017. 429, 2, 220-236.
24. Li F., Wang Y., Li C. et al. Twenty years of bioinformatics research for protease-specific substrate and cleavage site prediction: a comprehensive revisit and benchmarking of existing methods // *Brief Bioinform.* 2019. 20, 6, 2150-2166.
25. Monod M., Capoccia S., Léchenne B., Zaugg C., Holdom M., Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi // *Int J Med Microbiol.* 2002. 292, 5, 405-419.
26. Kasana R.C., Salwan R., Yadav S.K. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement // *Crit Rev Microbiol.* 2011. 37, 3, 262-276.
27. Razzaq A., Shamsi S., Ali A. et al. Microbial Proteases Applications // *Front Bioeng Biotechnol.* 2019. 7, 110, 1-20.
28. Da Silva R.R. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications // *Appl Biochem Biotechnol.* 2017. 183, 1, 1-19.
29. Theron L.W., Divol B. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014. 98, 21, 8853-8868.
30. Purushothaman K., Bhat S.K., Singh S.A., Marathe G.K., Appu R.G. Aspartic protease from *Aspergillus niger*: molecular characterization and interaction with pepstatin A // *Int J Biol Macromol.* 2019. 139, 199-212.
31. Cassone A., Vecchiarelli A., Hube B. Aspartyl proteinases of eukaryotic microbial pathogens: from eating to heating // *PLoS Pathog.* 2016. 12, 12, 1-8.
32. Pfeffer S.R., Rothman J.E. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi // *Annu Rev Biochem.* 1987. 56, 829-852.

33. Beggah S., Léchenne B., Reichard U., Foundling S., Monod M. Intra- and intermolecular events direct the propeptide-mediated maturation of the *Candida albicans* secreted aspartic proteinase Sap1p // *Microbiology*. 2000. 146, 11, 2765-2773.
34. Mandujano-González V., Villa-Tanaca L., Anducho-Reyes M.A., Mercado-Flores Y. Secreted fungal aspartic proteases: a review // *Rev Iberoam Micol*. 2016. 33, 2, 76-82.
35. Kumar D., Bhalla T.C. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005. 68, 6, 726-736.
36. Bekhit A.A., Hopkins D.L., Geesink G., Bekhit A.A., Franks P. Exogenous proteases for meat tenderization // *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014. 54, 8, 1012-1031.
37. Eder J., Fersht A.R. Pro-sequence-assisted protein folding // *Mol Microbiol*. 1995. 16, 4, 609-614.
38. Markaryan A., Lee J.D., Sirakova T.D., Kolattukudy P.E. Specific inhibition of mature fungal serine proteinases and metalloproteinases by their propeptides // *J Bacteriol*. 1996. 178, 8, 2211-2215.
39. Ichishima E. Unique catalytic and molecular properties of hydrolases from *Aspergillus* used in Japanese bioindustries // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000. 64, 4, 675-688.
40. Ichishima E. Development of enzyme technology for *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, and *A. luchuensis*, the national microorganisms of Japan // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016. 80, 9, 1681-1692.
41. Fernández D., Russi S., Vendrell J., Monod M., Pallarès I. A functional and structural study of the major metalloprotease secreted by the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2013. 69, 10, 1946-1957.
42. Wanderley M.C., Neto J.M., Filho J.L., Lima C.A., Teixeira J.A., Porto A.L. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review // *Braz J Microbiol*. 2017. 48, 1, 13-24.

43. Gotou T., Shinoda T., Mizuno S., Yamamoto N. Purification and identification of proteolytic enzymes from *Aspergillus oryzae* capable of producing the antihypertensive peptide Ile-Pro-Pro // J Biosci Bioeng. 2009. 107, 6, 615-619.
44. Markaryan A., Lee J.D., Sirakova T.D., Kolattukudy P.E. Specific inhibition of mature fungal serine proteinases and metalloproteinases by their propeptides // J Bacteriol. 1996. 178, 8, 2211-2215.
45. Bryan P.N. Prodomains and protein folding catalysis // Chem Rev. 2002. 102, 12, 4805-4816.
46. Kobayashi T., Inouye M. Functional analysis of the intramolecular chaperone. Mutational hot spots in the subtilisin pro-peptide and a second-site suppressor mutation within the subtilisin molecule // J Mol Biol. 1992. 226, 4, 931-933.
47. Kojima S., Minagawa T., Miura K. The propeptide of subtilisin BPN' as a temporary inhibitor and effect of an amino acid replacement on its inhibitory activity // FEBS Lett. 1997. 411, 1, 128-132.
48. Polgár L. The catalytic triad of serine peptidases. Cell Mol Life Sci // 2005. 62, 19, 2161-2172.
49. Jain S.C., Shinde U., Li Y., Inouye M., Berman H.M. The crystal structure of an autoprocessed Ser221Cys-subtilisin E-propeptide complex at 2.0 Å resolution // J Mol Biol. 1998. 284, 1, 137-144.
50. Siezen R.J., Leunissen J.A. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases // Protein Sci. 1997. 6, 3, 501-523.
51. Perona J.J., Craik C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases // Protein Sci. 1995. 4, 3, 337-360.
52. Bryant M.K., Schardl C.L., Hesse U., Scott B. Evolution of a subtilisin-like protease gene family in the grass endophytic fungus *Epichloë festucae* // BMC Evol Biol. 2009. 9, 168, 1-13.
53. Saeki K., Ozaki K., Kobayashi T., Ito S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures // J Biosci Bioeng. 2007. 103, 6, 501-508.

54. Da Silva O.S., de Oliveira R.L., de Silva J.C., Converti A., Porto T.S. Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: a comparative approach between crude extract and purified enzyme // Int J Biol Macromol. 2018. 109, 1039-1044.
55. Biaggio R.T., Silva R.R., Rosa N.G., Leite R.S., Arantes E.C., Cabral T.P., Juliano M.A., Juliano L., Cabral H. Purification and biochemical characterization of an extracellular serine peptidase from *Aspergillus terreus* // Prep Biochem Biotechnol. 2016. 46, 3, 298-304.
56. Da Silva O.S., de Almeida E.M., de Melo A.H., Porto T.S. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamarii* URM4634 // Int J Biol Macromol. 2018. 117, 1081-1088.
57. Ke Y., Yuan X., Li J., Zhou W., Huang X., Wang T. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of a recombinant *Aspergillus sojae* alkaline protease in *Pichia pastoris* // Protein Expr Purif. 2018. 148, 24-29.
58. Brandelli A., Daroit D.J., Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications // Appl Microbiol Biotechnol. 2010. 85, 6, 1735-1750.
59. Morya V.K., Yadav S., Kim E.K., Yadav D. In silico characterization of alkaline proteases from different species of *Aspergillus* // Appl Biochem Biotechnol. 2012. 166, 1, 243-257.
60. Morya V.K., Yadav V.K., Yadav S., Yadav D. Active site characterization of proteases sequences from different species of *Aspergillus* // Cell Biochem Biophys. 2016. 74, 3, 327-335.
61. Park H.S., Jun S.C., Han K.H., Hong S.B., Yu J.H. Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi // Adv Appl Microbiol. 2017. 100, 3, 161-202.
62. Martins-Santana L., Nora L.C., Sanches-Medeiros A., Lovate G.L., Cassiano M.H., Silva-Rocha R. Systems and synthetic biology approaches to engineer

- fungi for fine chemical production // *Front Bioeng Biotechnol.* 2018. 6, 117, 1-18.
63. Cairns T.C., Zheng X., Zheng P., Sun J., Meyer V. Moulding the mould: understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories // *Biotechnol Biofuels.* 2019. 12, 77, 1-18.
64. Nevalainen H., Kautto L., Te'o J. Methods for isolation and cultivation of filamentous fungi // *Methods Mol Biol.* 2014. 1096, 1, 3-16.
65. Dutta D., Das M.D. Effect of C/N ratio and microelements on nutrient dynamics and cell morphology in submerged fermentation of *Aspergillus giganteus* MTCC 8408 using Taguchi DOE // *3 Biotech.* 2017. 7, 34, 1-8.
66. Gibbs P.A., Seviour R.J., Schmid F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions // *Crit Rev Biotechnol.* 2000. 20, 1, 17-48.
67. Fazenda M.L., Seviour R., McNeil B., Harvey L.M. Submerged culture fermentation of "higher fungi": the macrofungi // *Adv Appl Microbiol.* 2008. 63, 2, 33-103.
68. Parekh S., Vinci V.A., Strobel R.J. Improvement of microbial strains and fermentation processes // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000. 54, 3, 287-301.
69. Осмоловский А.А., Баранова Н.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Егоров Н.С. Твердофазное и поверхностно-мембранное жидкостное культивирование микромицетов, особенности их развития и образования ферментов (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2014. 50, 3, 245-255.
70. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G, Baranova N.A., Egorov N.S. Vermiculite as a new carrier for extracellular protease production by *Aspergillus* spp. under solid-state fermentation // *Biotechnol Rep (Amst).* 2021. 29, 576, 1-5.
71. Hölker U., Höfer M., Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004. 64, 2, 175-186.

72. Arora S., Rani R., Ghosh S. Bioreactors in solid state fermentation technology: design, applications and engineering aspects // *J Biotechnol.* 2018. 269, 16-34.
73. Mitchell D.A., Pitol L.O., Biz A., Finkler A.T., de Lima Luz L.F., Krieger N. Design and operation of a pilot-scale packed-bed bioreactor for the production of enzymes by solid-state fermentation // *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2019. 169, 27-50.
74. Sallam L.A., El-Refai A.M., Hamdi A.H., El-Minofi H.A., Abd-Elsalam I.S. Studies on the application of immobilization technique for the production of cyclosporin A by a local strain of *Aspergillus terreus* // *J Gen Appl Microbiol.* 2005. 51, 3, 143-149.
75. Garay-Flores R., Segura-Ceniceros E., De León-Gómez R., Balvantín-García C., Martínez-Hernández J., Betancourt-Galindo R., Rosa Paredes Ramírez A., Noé Aguilar C., Ilyina A. Production of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger* free and immobilized in alginate-polyvinyl alcohol beads // *J Gen Appl Microbiol.* 2014. 60, 6, 262-269.
76. Wu J., Yu H.Q. Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions // *Bioresour Technol.* 2007. 98, 2, 253-259.
77. Mostafa Y.S., Alamri S.A. Optimization of date syrup for enhancement of the production of citric acid using immobilized cells of *Aspergillus niger* // *Saudi J Biol Sci.* 2012. 19, 2, 241-246.
78. Sapna, Singh B. Free and immobilized *Aspergillus oryzae* SBS50 producing protease-resistant and thermostable phytase // *3 Biotech.* 2017. 7, 3, 213.
79. Yewale T., Panchwagh S., Rajagopalan S., Dhamole P.B., Jain R. Enhanced xylitol production using immobilized *Candida tropicalis* with non-detoxified corn cob hemicellulosic hydrolysate // *3 Biotech.* 2016. 6, 1, 75.
80. Immobilization of enzymes and cells / ed.: J.M. Guisan. New York: Humana Press, 2013. XI, 377 p.

81. Chatterjee S. Production and estimation of alkaline protease by immobilized *Bacillus licheniformis* isolated from poultry farm soil of 24 Parganas and its reusability // J Adv Pharm Technol Res. 2015. 6, 1, 2-6.
82. Berekaa M.M., El Aassar S.A., El-Sayed S.M., El Borai A.M. Production of poly- γ -glutamate (PGA) biopolymer by batch and semicontinuous cultures of immobilized *Bacillus licheniformis* strain-R // Braz J Microbiol. 2009. 40, 4, 715-724.
83. Ravichandra P., Gopal M., Annapurna J. Biological sulfide oxidation using autotrophic *Thiobacillus sp.*: evaluation of different immobilization methods and bioreactors // J Appl Microbiol. 2009. 106, 4, 1280-1291.
84. Zhang Y., Li X., Zhang C., Yu X., Huang F., Huang S., Li L., Liu S. Production of D-alanine from DL-alanine using immobilized cells of *Bacillus subtilis* HLZ-68 // World J Microbiol Biotechnol. 2017. 33, 176, 1-7.
85. Krasňan V., Stloukal R., Rosenberg M., Rebroš M. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats // Appl Microbiol Biotechnol. 2016. 100, 6, 2535-2553.
86. Niknezhad S.V., Asadollahi M.A., Zamani A., Biria D. Production of xanthan gum by free and immobilized cells of *Xanthomonas campestris* and *Xanthomonas pelargonii* // Int J Biol Macromol. 2016. 82, 751-756.
87. Da Cunha M.A., Converti A., Santos J.C., Ferreira S.T., da Silva S.S. PVA-hydrogel entrapped *Candida guilliermondii* for xylitol production from sugarcane hemicellulose hydrolysate // Appl Biochem Biotechnol. 2009. 157, 3, 527-537.
88. Charles P., Devanathan V., Anbu P., Ponnuswamy M.N., Kalaichelvan P.T., Hur B.K. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10 // J Basic Microbiol. 2008. 48, 5, 347-352.
89. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985. 358 с.
90. Omrane Benmrad M., Moujehed E., Ben Elhoul M., Mechri S., Bejar S., Zouari R., Baffoun A., Jaouadi B. Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from *Penicillium chrysogenum* strain

- X5 used as excellent bio-additive for textile processing // *Int J Biol Macromol.* 2018. 119, 1002-1016.
91. Hui Z., Doi H., Kanouchi H., Matsuura Y., Mohri S., Nonomura Y., Oka T. Alkaline serine protease produced by *Streptomyces sp.* degrades PrP(Sc) // *Biochem Biophys Res Commun.* 2004. 321, 1, 45-50.
92. Benito M.J., Rodríguez M., Núñez F., Asensio M.A., Bermúdez M.E., Córdoba J.J. Purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 active against meat proteins // *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68, 7, 3532-3536.
93. Ueda M., Kubo T., Miyatake K., Nakamura T. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium sp.* BLB // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007. 74, 2, 331-338.
94. Anitha T.S., Palanivelu P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus* // *Protein Expr Purif.* 2013. 88, 2, 214-220.
95. Nascimento T.P., Sales A.E., Porto T.S., Costa R.M., Breydo L., Uversky V.N., Porto A.L., Converti A. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 // *Bioprocess Biosyst Eng.* 2017. 40, 8, 1209-1219.
96. Liu X., Kopparapu N.K., Li Y., Deng Y., Zheng X. Biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris* // *Int J Biol Macromol.* 2017. 94, 793-801.
97. Ogrydziak D.M. Yeast extracellular proteases // *Crit Rev Biotechnol.* 1993. 13, 1, 1-55.
98. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
99. Souza P.M., Werneck G., Aliakbarian B., Siqueira F., Ferreira Filho E.X., Perego P., Converti A., Magalhães P.O., Junior A.P. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus* // *Food Chem Toxicol.* 2017. 109, 2, 1103-1110.

100. Hamada S., Kubota K., Sagisaka M. Purification and characterization of a novel extracellular neutral metalloprotease from *Cerrena albocinnamomea* // J Gen Appl Microbiol. 2017. 63, 1, 51-57.
101. Пат. СССР 644796. Способ очистки протеолитических ферментов / Степанов В.М., Руденская Г.Н. № 2370306/23-04, заявл. 09.06.1976, опубл. 30.01.1979, Бюл. № 4.
102. Иголкина Л.А., Руденская Ю.А., Руденская Г.Н. Аффинные сорбенты на основе хитозана для выделения протеолитических ферментов // Вестник Московского университета. 2000. 41, 6, 398-401.
103. Vieira D.F., Watanabe L., Sant'ana C.D., Marcussi S., Sampaio S.V., Soares A.M., Arni R.K. Purification and characterization of jararassin-I, a thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom // Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2004. 36, 12, 798-802.
104. Menaldo D.L., Bernardes C.P., Santos-Filho N.A., Moura Lde A., Fuly A.L., Arantes E.C., Sampaio S.V. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom // Biochimie. 2012. 94, 12, 2545-2558.
105. Takenaka S., Umeda M., Senba H., Koyama D., Tanaka K., Yoshida K.I., Doi M. Heterologous expression and characterisation of the *Aspergillus* aspartic protease involved in the hydrolysis and decolorisation of red-pigmented proteins // J Sci Food Agric. 2017. 97, 1, 95-101.
106. Pereira W.E., da Silva R.R., de Amo G.S., Ruller R., Kishi L.T., Boscolo M., Gomes E., da Silva R. A collagenolytic aspartic protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* // Appl Biochem Biotechnol. 2020. 191, 3, 1258-1270.
107. Basu A., Li X., Leong S.S. Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes // Appl Microbiol Biotechnol. 2011. 92, 2, 241-251.
108. Juturu V., Wu J.C. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications // Chembiochem. 2018. 19, 1, 7-21.

109. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges // *Front Microbiol.* 2014. 5, 172, 1-17.
110. Mergulhão F.J., Summers D.K., Monteiro G.A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli* // *Biotechnol Adv.* 2005. 23, 3, 177-202.
111. Burgess R.R. Refolding solubilized inclusion body proteins // *Methods Enzymol.* 2009. 463, 17, 259-282.
112. Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies // *Biomolecules.* 2014. 4, 1, 235-251.
113. Yang H., Zhai C., Yu X., Li Z., Tang W., Liu Y., Ma X., Zhong X., Li G., Wu D., Ma L. High-level expression of Proteinase K from *Tritirachium album Limber* in *Pichia pastoris* using multi-copy expression strains // *Protein Expr Purif.* 2016. 122, 38-44.
114. Celik E., Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells // *Biotechnol Adv.* 2012. 30, 5, 1108-1118.
115. Li P., Anumanthan A., Gao X.G., Ilangovan K., Suzara V.V., Düzgüneş N., Renugopalakrishnan V. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris* // *Appl Biochem Biotechnol.* 2007. 142, 2, 105-124.
116. Ma X., Liu Y., Li Q., Liu L., Yi L., Ma L., Zhai C. Expression, purification and identification of a thermolysin-like protease, neutral protease I, from *Aspergillus oryzae* with the *Pichia pastoris* expression system // *Protein Expr Purif.* 2016. 128, 52-59.
117. Freudl R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems // *Microb Cell Fact.* 2018. 17, 52, 1-10.
118. Wu Y.L., Pan L.P., Yu S.L., Li H.H. Cloning, microbial expression and structure-activity relationship of polyphenol oxidases from *Camellia sinensis* // *J Biotechnol.* 2010. 145, 1, 66-72.
119. Li J., Chi Z., Wang X. Cloning of the SAP6 gene of *Metschnikowia reukaufii* and its heterologous expression and characterization in *Escherichia coli* // *Microbiol Res.* 2010. 165, 3, 173-182.

120. Liu H., Zhang R., Li L., Zhou L., Xu Y. The high expression of *Aspergillus pseudoglaucus* protease in *Escherichia coli* for hydrolysis of soy protein and milk protein // Prep Biochem Biotechnol. 2018. 48, 8, 725-733.
121. Crowe J., Döbeli H., Gentz R., Hochuli E., Stüber D., Henco K. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification // Methods Mol Biol. 1994. 31, 35, 371-387.
122. Yamaguchi S., Yamamoto E., Mannen T., Nagamune T., Nagamune T. Protein refolding using chemical refolding additives // Biotechnol J. 2013. 8, 1, 17-31.
123. Ke Y., Yuan X., Li J., Zhou W., Huang X., Wang T. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of a recombinant *Aspergillus sojae* alkaline protease in *Pichia pastoris* // Protein Expr Purif. 2018. 148, 24-29.
124. Shu M., Shen W., Yang S., Wang X., Wang F., Wang Y., Ma L. High-level expression and characterization of a novel serine protease in *Pichia pastoris* by multi-copy integration // Enzyme Microb Technol. 2016. 92, 56-66.
125. Walsh P.N. Platelet coagulation-protein interactions // Semin Thromb Hemost. 2004. 30, 4, 461-471.
126. Green D. Coagulation cascade // Hemodial Int. 2006. 10, 2, 2-4.
127. Colvin B.T. Physiology of haemostasis // Vox Sang. 2004. 87, 1, 43-46.
128. Adams R.L., Bird R.J. Review article: coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants // Nephrology (Carlton). 2009. 14, 5, 462-470.
129. Versteeg H.H., Heemskerk J.W., Levi M., Reitsma P.H. New fundamentals in hemostasis // Physiol Rev. 2013. 93, 1, 327-358.
130. Mackie I.J., Bull H.A. Normal haemostasis and its regulation // Blood Rev. 1989. 3, 4, 237-250.
131. Smith S.A., Travers R.J., Morrissey J.H. How it all starts: initiation of the clotting cascade // Crit Rev Biochem Mol Biol. 2015. 50, 4, 326-336.
132. Chan A.K., Paredes N. The coagulation system in humans // Methods Mol Biol. 2013. 992, 1, 3-12.

133. Покровский В.М., Коротько Г.Ф. Физиология человека. М.: Медицина, 2003. 656 с.
134. Mackman N., Tilley R.E., Key N.S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007. 27, 8, 1687-1693.
135. Geddings J.E., Mackman N. New players in haemostasis and thrombosis // *Thromb Haemost.* 2014. 111, 4, 570-574.
136. Gailani D., Smith S.B. Structural and functional features of factor XI // *J Thromb Haemost.* 2009. 7, 1, 75-78.
137. Troy G.C. An overview of hemostasis // *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1988. 18, 1, 5-20.
138. O'Donnell J.S., O'Sullivan J.M., Preston R.J. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis // *Br J Haematol.* 2019. 186, 1, 24-36.
139. Griffin J.H., Zlokovic B.V., Mosnier L.O. Activated protein C, protease activated receptor 1, and neuroprotection // *Blood.* 2018. 132, 2, 159-169.
140. Stenflo J., Fernlund P. Amino acid sequence of the heavy chain of bovine protein C // *J Biol Chem.* 1982. 257, 20, 12180-12190.
141. Струкова С.М. Основы физиологии гемостаза. М.: МГУ, 2013. 186 с.
142. Chen K., Stafford A.R., Wu C., Yeh C.H., Kim P.Y., Fredenburgh J.C., Weitz J.I. Exosite 2-directed ligands attenuate protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex // *Biochemistry.* 2017. 56, 24, 3119-3128.
143. Bouwens E.A., Stavenuiter F., Mosnier L.O. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway // *J Thromb Haemost.* 2013. 11, 1, 242-253.
144. Griffin J.H., Fernández J.A., Gale A.J., Mosnier L.O. Activated protein C // *J Thromb Haemost.* 2007. 5, 1, 73-80.
145. Griffin J.H., Evatt B., Zimmerman T.S., Kleiss A.J., Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease // *J Clin Invest.* 1981. 68, 5, 1370-1373.

146. Marlar R.A., Adcock D.M. Clinical evaluation of protein C: a comparative review of antigenic and functional assays // *Hum Pathol.* 1989. 20, 11, 1040-1047.
147. Martinoli J.L., Stocker K. Fast functional protein C assay using Protac, a novel protein C activator // *Thromb Res.* 1986. 43, 3, 253-264.
148. Francis R.B., Seyfert U. Rapid amidolytic assay of protein C in whole plasma using an activator from the venom of *Agkistrodon contortrix* // *Am J Clin Pathol.* 1987. 87, 5, 619-625.
149. Sakata T., Hatsuyama H., Kitamura T., Uchida K., Katayama Y., Matsuyama T. Study of chromogenic substrate on protein C activity assay in patients treated with warfarin // *Rinsho Byori.* 1990. 38, 8, 937-941.
150. Kogan A.E., Makarov A.N., Bobruskin I.D., Strukova S.M. Comparative study of protein C activators from the *Agkistrodon* snake venoms // *Thromb Res.* 1991. 62, 6, 775-780.
151. Kogan A.E., Bashkov G.V., Bobruskin I.D., Romanova E.P., Makarov V.A., Strukova S.M. Protein C activator from the venom of *Agkistrodon blomhoffi ussuriensis* retards thrombus formation in the arterio-venous shunt in rats // *Thromb Res.* 1993. 70, 5, 385-393.
152. Orthner C.L., Bhattacharya P., Strickland D.K. Characterization of a protein C activator from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix* // *Biochemistry.* 1988. 27, 7, 2558-2564.
153. Gempeler-Messina P.M., Müller C. Diagnostic use of the protein C activator from *Agkistrodon contortrix* // *Toxin Reviews.* 2006. 25, 335-349.
154. Stocker K., Fischer H., Meier J., Brogli M., Svendsen L. Characterization of the protein C activator Protac from the venom of the southern copperhead (*Agkistrodon contortrix*) snake // *Toxicon.* 1987. 25, 3, 239-252.
155. Kisiel W., Kondo S., Smith K.J., McMullen B.A., Smith L.F. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom // *J Biol Chem.* 1987. 262, 26, 12607-12613.

156. Meier J., Adler C., Stocker K. Isoelectric focusing of Protac, the protein C activator from copperhead (*Agkistrodon contortrix*) venom: a note on experimental problems // *Toxicon*. 1988. 26, 2, 218-221.
157. McMullen B.A., Fujikawa K., Kisiel W. Primary structure of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom // *Biochemistry*. 1989. 28, 2, 674-679.
158. Murakami M.T., Arni R.K. Thrombomodulin-independent activation of protein C and specificity of hemostatically active snake venom serine proteinases: crystal structures of native and inhibited *Agkistrodon contortrix contortrix* protein C activator // *J Biol Chem*. 2005. 280, 47, 39309-39315.
159. Билай В.И., Коваль З.Э. Аспергиллы. Киев: Наукова думка, 1988. 204 с.
160. Osmolovskiy A.A., Schmidt L., Orekhova A.V., Komarevtsev S.K., Kreyer V.G., Shabunin S.V., Egorov N.S. Action of extracellular proteases of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* micromycetes on plasma hemostasis proteins // *Life*. 2021. 11, 782, 1-10.
161. Пат. РФ 2460772. Штамм *Aspergillus ochraceus* – продуцент протеиназы-активатора протеина С плазмы крови / Осмоловский А.А., Кураков А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. № 2011108671/10, заявл. 09.03.2011, опубл. 10.09.2012, Бюл. № 25.
162. Пат. РФ 2468081. Способ получения протеиназы-активатора протеина С плазмы крови / Осмоловский А.А., Кураков А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. № 2011108672/10, заявл. 09.03.2011, опубл. 27.11.2012, Бюл. № 33.
163. Пат. РФ 2535872. Способ твердофазного культивирования *Aspergillus ochraceus* для получения протеиназы-активатора протеина С плазмы крови / Осмоловский А.А., Кураков А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. № 2013113997/10, заявл. 29.03.2013, опубл. 20.12.2014, Бюл. № 35.
164. Rodrigues P., Soares C., Kozakiewich Z., Paterson R.R., Lima N., Venancio A. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins /

- Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Ed. A. Méndez-Villas, 2007. S1, 527-534.
165. Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA // *Nucleic Acids Res.* 1995. 23, 6, 1087-1088.
166. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Diatchenko L., Chenchik A. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR // *Nucleic Acids Res.* 1999. 27, 6, 1558-1560.
167. Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Богданова Е.А., Лукьянов С.А. Селективная супрессия полимеразной цепной реакции // *Биоорганическая химия.* 1999. 25, 3, 163-170.
168. Kaur J., Kumar A., Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements // *Int J Biol Macromol.* 2017. 106, 803-822.
169. Anson M.L. Crystalline carboxypolypeptidase // *Science.* 1935. 81, 2106, 467-468.
170. Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K. Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis* // *J. Biochem.* 1958. 45, 185-194.
171. The protein protocols handbook / ed.: J.M. Walker. New York: Humana Press, 2009. XXXV, 1985 p.
172. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. XXV, 2209 p.
173. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. 227, 5259, 680-685.
174. Yanagisawa Y., Chatake T., Chiba-Kamoshida K., Naito S., Ohsugi T., Sumi H., Yasuda I, Morimoto Y. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction experiment of nattokinase from *Bacillus subtilis natto* // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2010. 66, 12, 1670-1673.

175. Jia Y., Liu H., Bao W., Weng M., Chen W., Cai Y., Zheng Z., Zou G. Functional analysis of propeptide as an intramolecular chaperone for in vivo folding of subtilisin nattokinase // *FEBS Lett.* 2010. 584, 23, 4789-4796.
176. Jia Y., Cao X., Deng Y., Bao W., Tang C., Ding H., Zheng Z., Zou G. Four residues of propeptide are essential for precursor folding of nattokinase // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014. 46, 11, 957-964.
177. Tanaka S., Takeuchi Y., Matsumura H., Koga Y., Takano K., Kanaya S. Crystal structure of Tk-subtilisin folded without propeptide: requirement of propeptide for acceleration of folding // *FEBS Lett.* 2008. 582, 28, 3875-3878.
178. Uehara R., Ueda Y., You D.J., Koga Y., Kanaya S. Accelerated maturation of Tk-subtilisin by a Leu→Pro mutation at the C-terminus of the propeptide, which reduces the binding of the propeptide to Tk-subtilisin // *FEBS J.* 2013. 280, 4, 994-1006.
179. Yuzaki K., Sanda Y., You D.J., Uehara R., Koga Y., Kanaya S. Increase in activation rate of Pro-Tk-subtilisin by a single nonpolar-to-polar amino acid substitution at the hydrophobic core of the propeptide domain // *Protein Sci.* 2013. 22, 12, 1711-1721.
180. Jatou-Ogay K., Suter M., Cramer R., Falchetto R., Fatih A., Monod M. Nucleotide sequence of a genomic and a cDNA clone encoding an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* // *FEMS Microbiol Lett.* 1992. 71, 2, 163-168.
181. Kolattukudy P.E., Lee J.D., Rogers L.M., Zimmerman P., Ceselski S., Fox B., Stein B., Copelan E.A. Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis // *Infect Immun.* 1993. 61, 6, 2357-2368.
182. Rambach G., Dum D., Mohsenipour I., Hagleitner M., Würzner R., Lass-Flörl C., Speth C. Secretion of a fungal protease represents a complement evasion mechanism in cerebral aspergillosis // *Mol Immunol.* 2010. 47, 7-8, 1438-1449.
183. Upadhyay S.K., Gautam P., Pandit H., Singh Y., Basir S.F., Madan T. Identification of fibrinogen-binding proteins of *Aspergillus fumigatus* using proteomic approach // *Mycopathologia.* 2012. 173, 2-3, 73-82.

184. Bergmann A., Hartmann T., Cairns T., Bignell E.M., Krappmann S. A regulator of *Aspergillus fumigatus* extracellular proteolytic activity is dispensable for virulence // *Infect Immun.* 2009. 77, 9, 4041-4050.
185. Chow L.P., Liu S.L., Yu C.J., Liao H.K., Tsai J.J., Tang T.K. Identification and expression of an allergen Asp f 13 from *Aspergillus fumigatus* and epitope mapping using human IgE antibodies and rabbit polyclonal antibodies // *Biochem J.* 2000. 346, 2, 423-431.
186. Behnsen J., Lessing F., Schindler S., Wartenberg D., Jacobsen I.D., Thoen M., Zipfel P.F., Brakhage A.A. Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5 // *Infect Immun.* 2010. 78, 8, 3585-3594.
187. Sharon H., Hagag S., Oshero N. Transcription factor PrtT controls expression of multiple secreted proteases in the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus* // *Infect Immun.* 2009. 77, 9, 4051-4060.
188. Tatsumi H., Ogawa Y., Murakami S., Ishida Y., Murakami K., Masaki A., Kawabe H., Arimura H., Nakano E., Motai H. A full length cDNA clone for the alkaline protease from *Aspergillus oryzae*: structural analysis and expression in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol Gen Genet.* 1989. 219, 1-2, 33-38.
189. Murakami K., Ishida Y., Masaki A., Tatsumi H., Murakami S., Nakano E., Motai H., Kawabe H., Arimura H. Isolation and characterization of the alkaline protease gene of *Aspergillus oryzae* // *Agric Biol Chem.* 1991. 55, 11, 2807-2811.
190. Cheevadhanarak S., Renno D.V., Saunders G., Holt G. Cloning and selective overexpression of an alkaline protease-encoding gene from *Aspergillus oryzae* // *Gene.* 1991. 108, 1, 151-155.
191. Guo J.P., Ma Y. High-level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris* // *Protein Expr Purif.* 2008. 58, 2, 301-308.

192. Ramesh M.V., Sirakova T., Kolattukudy P.E. Isolation, characterization, and cloning of cDNA and the gene for an elastinolytic serine proteinase from *Aspergillus flavus* // Infect Immun. 1994. 62, 1, 79-85.
193. Ebeling W., Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth H.D., Lang H. Proteinase K from *Tritirachium album Limber* // Eur J Biochem. 1974. 47, 1, 91-97.
194. Hilz H., Wiegers U., Adamietz P. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins // Eur J Biochem. 1975. 56, 1, 103-108.
195. Pähler A., Banerjee A., Dattagupta J.K., Fujiwara T., Lindner K., Pal G.P., Suck D., Weber G., Saenger W. Three-dimensional structure of fungal proteinase K reveals similarity to bacterial subtilisin // EMBO J. 1984. 3, 6, 1311-1314.
196. Gunkel F.A., Gassen H.G. Proteinase K from *Tritirachium album Limber*. Characterization of the chromosomal gene and expression of the cDNA in *Escherichia coli* // Eur J Biochem. 1989. 179, 1, 185-194.
197. Betzel C., Singh T.P., Visanji M., Peters K., Fittkau S., Saenger W., Wilson K.S. Structure of the complex of proteinase K with a substrate analogue hexapeptide inhibitor at 2.2-Å resolution // J Biol Chem. 1993. 268, 21, 15854-15858.
198. Осмоловский А.А. Антикоагулянтная протеиназа (активатор протеина С) микромицета *Aspergillus ochraceus*: получение и свойства: дис. ... канд. биол. наук. М., 2013. 141 с.
199. Sone M., Falzon L., Inouye M. The role of tryptophan residues in the autoprocessing of prosubtilisin E // Biochim Biophys Acta. 2005. 1749, 1, 15-22.
200. Ni H., Guo P.C., Jiang W.L., Fan X.M., Luo X.Y., Li H.H. Expression of nattokinase in *Escherichia coli* and renaturation of its inclusion body // J Biotechnol. 2016. 231, 65-71.