

DOI: 10.7868/S3034574X26040079

Оригинальная статья

УДК 577.152.34

**ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ
КОМПЛЕКСА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
ЭНТОМОПАТОГЕННОГО МИКРОМИЦЕТА *AKANTHOMYCES* CF. *ACULEATUS***

**Д. Л. Басалаева^{1,*}, А. А. Богомолова², А. В. Коваль³,
В. Г. Крейер¹, А. А. Осмоловский¹**

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
Москва, Российская Федерация

²Утрехтский университет, Утрехт, Нидерланды

³Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский
университет «Высшая школа экономики», Москва, Российская Федерация

*E-mail: dbasalaewa@yandex.ru

Аннотация. Изучено влияние индукторов на секрецию протеолитических ферментов энтомопатогенного микромицета *Akanthomyces* cf. *aculeatus* в условиях глубинного культивирования. Получен в результате фракционирования методом изоэлектрофокусирования и охарактеризован препарат протеолитических ферментов микромицета. В комплексном препарате определена активность нейтральной сериновой протеазы, имеющая гомологию с субтилизин-подобной сериновой протеазой из семейства S8, обладающая коллагенолитической и фибринолитической активностью. Изучены свойства и проведен анализ гликозилирования пептидазы.

Ключевые слова: протеазы микромицетов, фибринолитическая активность, протеолитические ферменты, энтомопатогенные грибы

Соблюдение этических стандартов. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли равноценный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Ссылка для цитирования: Басалаева Д.Л., Богомолова А.А., Коваль А.В., Крейер В.Г., Осмоловский А.А. Получение, характеристика и изучение свойств комплекса протеолитических ферментов энтомопатогенного микромицета *Akanthomyces* cf. *aculeatus*. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 4. С. 593–607.
<https://doi.org/10.7868/S3034574X26040079>

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND STUDY OF THE PROPERTIES OF A COMPLEX OF PROTEOLYTIC ENZYMES OF ENTOMOPATHOGENIC MICROMYCETE *AKANTHOMYCES CF. ACULEATUS*

D. L. Basalaeva^{1,*}, A. A. Bogomolova², A. V. Koval³,
V. G. Kreyer¹, A. A. Osmolovskiy¹

¹*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

²*Utrecht University, Utrecht, Netherlands*

³*Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics,
Moscow, Russian Federation*

*E-mail: dbasalaewa@yandex.ru

Abstract. The effect of the composition of inducers on the secretion of proteolytic enzymes of the entomopathogenic micromycete *Akanthomyces cf. aculeatus* under conditions of submerged cultivation was studied. A preparation of proteolytic enzymes of the micromycete *Akanthomyces cf. aculeatus* was obtained, fractionated using isoelectrofocusing using the Westerberg method, and characterized. The complex preparation contains the presence of a neutral serine protease having homology with a subtilisin-like serine peptidase from the S8 family. A peptidase with collagenolytic and fibrinogenolytic activity was isolated, properties were studied, peptidase glycosylation was analyzed.

Keywords: micromycete proteases, fibrinolytic activity, proteolytic enzymes, entomopathogenic fungi

Ethics declarations. Compliance with ethical standards. This study did not involve human or animal subjects.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Author contributions. All authors made significant contributions to the conceptualization, conduct of the study, and preparation of the article.

For citation: Basalaeva D.L., Bogomolova A.A., Koval A.V., Kreyer V.G., Osmolovskiy A.A. Preparation, Characterization and Study of the Properties of a Complex of Proteolytic Enzymes of Entomopathogenic Micromycete *Akanthomyces cf. aculeatus*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(4): 593–607. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26040079>

Изучение микромицетов, ассоциированных с насекомыми, представляет большой интерес для современной микробиологии и биотехнологии, поскольку они могут быть перспективным источником биологически активных веществ, в том числе протеолитических ферментов. Энтомопатогенные и энтомофильные грибы, взаимодействующие с насекомыми, адаптированы к специализированным нишам обитания, что обуславливает уникальные свойства их ферментных систем. Протеолитические ферменты, продуцируемые такими грибами, обладают высокой специфичностью и стабильностью, что делает их привлекательными для применения в различных отраслях промышленности, медицины и сельского хозяйства.

Протеазы микромицетов могут быть перспективными средствами биоконтроля для борьбы с насекомыми-вредителями. Ферменты, катализирующие расщепление белков, играют ключевую роль в инфицировании и гибели насекомых-хозяев. Повышенное внимание к экологически безопасным методам защиты сельскохозяйственных культур обуславливает необходимость поиска новых штаммов грибов с высокой протеолитической активностью. Использование таких ферментов будет способствовать снижению применения химических пестицидов и уменьшению негативного воздействия на окружающую среду.

Кроме того, протеолитические ферменты микромицетов, связанных с насекомыми, могут найти широкое применение в биотехнологии — от производства пищевых добавок и фармацевтических препаратов до обработки биологических материалов и создания средств диагностики. Исследование ферментных систем этих грибов расширяет знания о структуре и механизмах действия протеаз, способствует разработке инновационных методов их применения и повышает эффективность биотехнологических процессов. В связи с этим изучение микромицетов как источника протеолитических ферментов остается одной из задач современной науки.

Успешное развитие грибов в организме насекомых в значительной степени зависит от физиологического состояния хозяев. Одним из представителей энтомопатогенных грибов является *Akanthomyces* cf. *aculeatus*, который выделяется уникальными свойствами своих ферментов. По последним данным литературы у этого микромицета имеется способность к гидролизу казеина, коллагена, фибрина, фибриногена и других белковых молекул [1].

Грибы рода *Akanthomyces* относятся к эколого-трофической группе энтомопатогенных грибов, являются патогенными для насекомых и могут встречаться в различных природных средах обитания. Они обладают уникальной способностью проникать в тела своих насекомых-хозяев, при-

крепляясь к хитиновому экзоскелету и белковым структурам, представляющим собой компоненты мембран и клеточных стенок насекомых, частички пищи насекомых и др. [5].

Существуют различные способы заражения энтомопатогенными микромицетами, наиболее распространенным из которых является разрушение белков на поверхности насекомого с последующим проникновением в организм. *Akanthomyces aculeatus* играет важную роль в поддержании экологического баланса, являясь естественными регуляторами популяций насекомых и других членистоногих, может использоваться в сельском хозяйстве в качестве органического инсектицида и обладает потенциалом для фармацевтического применения благодаря своей биологической активности [3, 16, 25].

Протеолитические ферменты широко используются в промышленности, медицине и сельском хозяйстве, поэтому изучение характеристик и свойств этих ферментов представляет большой научный и практический интерес.

Цель работы — изучение влияния состава питательной среды на способность штамма *Akanthomyces aculeatus* к продукции протеолитических ферментов, активных в отношении фибриллярных и глобулярных белков, а также получение, очистка и характеристика препарата протеаз исследуемого штамма.

МЕТОДИКА

Культура и условия культивирования. В работе был использован штамм энтомопатогенного микромицета *Akanthomyces* cf. *aculeatus*, полученный из коллекции кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

Изучение влияния состава питательной среды на протеолитическую активность *A. cf. aculeatus*. Для определения протеолитической активности 7-суточную культуру гриба, выращенную на агаризованной среде Чапека-Докса с добавлением 0,5 % дрожжевого экстракта, переносили в жидкую посевную среду для активации прорастания спор и накопления активной биомассы.

Состав среды Чапека–Докса с дрожжевым экстрактом (г/л): глюкоза — 30,0; дрожжевой экстракт — 5,0, NaNO_3 — 3,0, K_2HPO_4 — 1,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, KCl — 0,5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01, агар бактериологический — 20,0. Состав посевной среды (г/л): сусло пивное — 67,0, глюкоза — 20,0, пептон ферментативный — 1,0.

Инкубирование проводили при перемешивании в шейкер-инкубаторе ES-20/80 («BioSan», Латвия) со скоростью 200 об./мин при температуре 28 °C в течение 48 ч. Далее 3% биомассы из колбы с посевной культурой, переносили в колбы с различными ферментационными средами №№ 1 — 8 (ФС).

Состав ФС 1 (г/л): глюкоза — 30,0, глицерин — 70,0, NaNO_3 — 2,0, гидролизат рыбной муки (ГРМ) — 5,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, KH_2PO_4 — 0,5.

Состав ФС 2 (г/л): глюкоза — 35,0, крахмал — 1,2, пептон ферментативный — 5,0, ГРМ — 5,0, NaCl — 2,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, KH_2PO_4 — 0,5.

Состав ФС 3 — 8 (г/л), основа: глюкоза — 30,0, NaCl — 0,5, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, KH_2PO_4 — 0,5. В качестве источников белка (5,0 г/л) ФС 3 содержала молотую шерсть, ФС 4 — гидролизат кератина, ФС 5 — эластин, ФС 6 — перьевую муку, ФС 7 — коллаген, ФС 8 — фиброин.

Ферментационные среды различались источником азота — ключевым компонентом, влияющим на метаболизм грибов. ФС1 содержала в качестве источника азота минеральный компонент в виде нитрата натрия и органический компонент — ГРМ, ФС2 содержала только источники органического азота — пептон и ГРМ, а ФС3 — ФС8 содержали в своем составе различные органические индукторы синтеза белка, выступавшие также в роли углеродных и азотных субстратов.

Akanthomyces cf. aculeatus для получения биомассы выращивали в тех же условиях, что и посевную культуру в течение 4 сут при 30 °С. Далее отделяли культуральную жидкость (КЖ) фильтрованием и проводили определение протеолитической активности.

Определение протеолитической активности. Общую протеолитическую активность КЖ оценивали с использованием 0,2 %-ного субстрата азоказеина («Sigma-Aldrich», США), приготовленного на 0,1 М Трис- HCl -буфере, pH 8,2, коллагеназную — с использованием субстрата азоколл («EMD Millipore», США), 0,2 %-ная суспензия в 0,1 М Трис- HCl -буфере, pH 8,2. Способность к гидролизу фибриногена оценивали с использованием 1%-ной суспензии бычьего фибриногена («Sigma-Aldrich», США) в 0,1 М Трис- HCl -буфере, pH 8,2 [24].

Реакционная смесь состояла из 200 мкл КЖ и 400 мкл соответствующего субстрата и инкубировалась в условиях постоянного перемешивания на термошейкере со скоростью 600 об./мин при температуре 37 °С в течение 10, 20 и 30 мин для фибриногена, азоколл и азоказеина соответственно. Для остановки реакции в смесь добавляли 600 мкл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) для азоказеина и фибриногена, и 0,1 н. NaOH для азоколл. Далее смесь центрифугировали в течение 5 мин со скоростью 14,1 $\times g$ для осаждения непрогидролизованного субстрата. В надосадочной жидкости определяли оптическую плотность при длине волны 280 нм для реакции с фибриногеном, 340 нм — с азоказеином и 519 нм — с азоколлом. Результат азоказеинолитической (общей протеолитической) и коллагенолитической активности выражали в условных единицах на мл (усл. ед./мл). Одна условная единица соответствовала изменению оптической плотности (ОП) на 0,1 за 1 мин реакции. Единицы активности по отношению

к фибриногену выражали в мкмоль тирозина/мл $\times$ мин.

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 («BioSan», Латвия), измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре BioSpectrometer® kinetic («Eppendorf», Германия).

Определение активности с использованием хромогенных пептидных субстратов (ХПС). ХПС представляют собой субстраты, в которых к пептиду присоединен паранитроанилид (pNA), который остается бесцветным, пока не нарушена связь pNA с аминокислотами. При проведении реакции гидролиза происходит расщепление связи с pNA и высвобождение красителя, при этом раствор окрашивается в желтый цвет.

Для проведения реакции смешивали 200 мкл КЖ, 50 мкл 0,05 М Трис- HCl (pH 8,2), 100 мкл ХПС. Реакцию проводили в условиях постоянного перемешивания на термошейкере со скоростью 600 об./мин при температуре 37 °С в течение 5 мин. Для остановки реакции в смесь добавляли 200 мкл 50%-ного раствора уксусной кислоты. ОП реакционной смеси измеряли спектрофотометрически при длине волны 405 нм. Активность в отношении ХПС выражали в мкмоль pNA $\times 10^{-3}$ /мл/мин.

С использованием данной методики проводили определение субстратной специфичности протеазы *A. cf. aculeatus*. Определяемые активности и субстраты, используемые в работе, представлены в табл. 1.

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 («BioSan», Латвия), измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре BioSpectrometer® kinetic («Eppendorf», Германия).

Получение препарата внеклеточных протеаз *A. cf. aculeatus*. Для получения препарата протеаз продуцент культивировали в глубинных условиях в два этапа. На первом этапе культуру микромицета, выращенную на агаризованной среде, переносили в посевную среду и выращивали посевной мицелий (48 ч). На втором этапе часть биомассы (3% по объему) переносили в ФС и проводили выращивание 96 ч при температуре 28 °С на качалке при 220 об./мин. В качестве ФС использовали ФС 5, содержащую в качестве индуктора синтеза эластин. По окончании культивирования КЖ отделяли от мицелия центрифугированием при 15 000 г в течение 30 мин при 4 °С.

Осаждение внеклеточных протеаз *A. cf. aculeatus*. В полученную КЖ исследуемого штамма добавляли сульфат аммония до 80% от насыщения постепенно при постоянном перемешивании. Осадок белка формировался в течение 48 ч при 4 °С. Далее осадок отделяли центрифугированием при 15000 г в течение 30 мин при 4 °С. Для очистки препарата от низкомолекулярных примесей осадок растворяли

Таблица 1. Хромогенные пептидные субстраты, которые были использованы для определения субстратной специфичности

Table 1. Chromogenic peptide substrates used to determine substrate specificity

№	Аминокислотная последовательность (субстрат)	Активность фермента
1	Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	Нейтрофильная эластаза поджелудочной железы человека, крысы и свиньи [9]
2	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	Химотрипсин-подобные сериновые протеазы [15]
3	Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	Субтилизин-подобные и химотрипсин-подобные сериновые протеазы [21]
4	Suc-Ala-Ala-Val-Ala-pNA	Сериновые протеазы с эластазоподобной/химотрипсиноподобной спецификой, в первую очередь для определения эластазы (лейкоцитарной и панкреатической) и родственных эндопротеаз [https://www.chemimpex.com/products/10016]
5	Z-Gly-Gly-Leu-pNA	Протеаза с химотрипсиноподобной/нейтральной эндопептидазной специфичностью, а также в протеасомных тестах [14]
6	Suc-Gly-Gly-Phe-pNA	Химотрипсин и протеаза В <i>Streptomyces griseus</i> [12]
7	Bz-Phe-Val-Arg-pNA	Трипсин, тромбин и рептилаза [11]
8	D-Val-Leu-Lys-pNA	Плазмин из плазминогена при анализе амидолитической активности и активации плазминогена [23]
9	Tos-Glu-Pro-Arg-pNA	Протеазы, участвующие в свертывании крови [20]
10	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA	Уровень калликреина, FXIa, FXIIa в плазме крови [10]
11	pyroGlu-Gly-Arg-pNA	Активность урокиназы [18]
12	Z-Ala-Ala-Met-Lys-pNA	Сериновые протеазы [26]
13	pyroGlu-Phe-Leu-pNA	Тиоловые протеазы из растений (папаин, фицин и бромелайн) и мозга млекопитающих (катепсин В) [4]
14	Bz-Тур-pNA	Серинкарбоксипептидазы и различных протеазы [6]
15	Bz-Arg-pNA	Трипсин, актинидин и папаин [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide]
16	Ac-Phe-pNA	Химотрипсин [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetylalanyl-L-phenylalanine-4-nitroanilide]
17	Ala-Phe-Lys-pNA	Сериновые протеазы [https://patents.google.com/patent/RU2121690C1/ru]

и проводили диализ в диализных трубках CelluSep («Sigma-Aldrich», США), имеющих предел исключения 12–14 кДа против 0,0005 М Трис-НСl буфера (рН 8,2) в течение 12–16 ч при температуре 4 °С. Полученный комплексный препарат внеклеточных протеаз *Akanthomyces* cf. *aculeatus* лиофильно высушивали для последующей очистки.

Разделение внеклеточных протеаз *A. cf. aculeatus*. Для разделения белков, осажденных сульфатом аммония из КЖ, проводили препаративное изоэлектрофокусирование (ИЭФ) по методу Вестерберга в колонке объемом 110 мл («Pharmacia», Швеция) при напряжении 800 В в течение 36 ч при 4 °С в градиенте рН амфолинов 3,0–8,0 и градиенте сахарозы

0–40 % [22]. После проведения ИЭФ собирали на холоде фракции объемом 1,5–2 мл, в которых измеряли рН, содержание белка и активность протеаз в отношении азоказеина, азоколлы и фибриногена. Белок в пробах определяли спектрофотометрически при 280 нм в кювете с длиной пути в 1 см.

Электрофоретические исследования. Для оценки гомогенности выделенных ферментов проводили электрофорез в денатурирующих условиях по методу Лэммли в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na) [9]. Для электрофоретических исследований использовали фракции № 7, 11, 13, 19, 20, 27, 30 и 37. Для подготовки проб раствор белка

смешивали с буфером, содержащим дитиотреитол (ДТТ) в соотношении 3:1. Для денатурации пробы прогревали 3 мин при 100 °С.

Для желатиновой зимографии выбранных фракций с высокой протеолитической активностью готовили полиакриламидный гель, содержащий 0,4% желатина, в присутствии ДДС. Пробы готовили в соотношении 3 части разведенного белка к 1 части буфера без добавления ДТТ и без прогревания. Электрофорез и зимографию проводили в камере для электрофореза Mini-Protean Tetra («Bio-Rad», США).

Ингибиторный анализ. В качестве ингибиторов для металлопротеаз испытывали этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, 1,1 мг/мл) и о-фенантролин (0,5 мг/мл), для цистеиновых протеаз — п-хлор-меркурийбензоат (ПХМБ, 0,5 мг/мл), для сериновых протеаз — фенилметилсульфонилфторид (PMSF, 0,3 мг/мл), а также ингибиторы химо tripsиноподобных протеаз — тозилфенилаланилхлорметилкетон (ТРСК, 0,4 мг/мл) и трипсиноподобных протеаз — тозиллизилаланилхлорметилкетон (ТЛСК, 0,4 мг/мл), а также соевый ингибитор трипсина (1,1 мг/мл). При изучении действия ингибиторов молярное соотношение фермент-ингибитор составляло 1:10 и 1:100. Остаточную протеолитическую активность фермента определяли при 37 °С после его инкубации с ингибитором в течение 60 мин при 25 °С, как описано выше, и выражали в процентах от контроля (без ингибитора).

Определение углеводного компонента протеаз *A. cf. aculeatus*. Присутствие углеводного компонента выделенной протеазы определяли с помощью окраски белков полиакриламидном гелем реактивом Шиффа. В качестве контроля использовали раствор сыворотки крови кролика, содержащей как не гликозилированные, так и гликозилированные белки.

Определение влияния ионов металлов и ПАВ на активность комплексного препарата протеаз *A. cf. aculeatus*. Оценку влияния ионов металлов и ПАВ на активность комплексного препарата осуществляли с использованием ионов Mg^{2+} , Li^{+} , Cd^{2+} , Ag^{+} , Ba^{2+} , Cs^{2+} , Mn^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} в концентрации 0,005 М и таких ПАВ, как SDS, Твин-20, Твин-80, Тритон X-100, стиральный порошок «Synergetic»[™] и «Tide»[™] в концентрации 0,1%. Препарат смешивали с раствором ионов или ПАВ, инкубировали 1 ч при комнатной температуре, а затем к смеси добавляли субстрат азоказеин. Реакцию проводили как описано выше. В качестве контроля смешивали препарат с тем же количеством дистиллированной воды.

Определение кинетических параметров протеазы *A. cf. aculeatus*. Определение скорости реакции и константы Михаэлиса проводили, используя ХПС N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA в концентрациях 0,5, 0,25, 0,125, 0,1, 0,05%. Реакцию проводили в

термостатируемой кювете с постоянным измерением оптической плотности на спектрофотометре BioSpectrometer® kinetic («Eppendorf», Германия).

Идентификация протеазы. Для характеристики ферментов из электрофоретических гелей вырезали белковую полосу и расщепляли трипсином в соответствии со стандартным протоколом [17]. Полученную смесь пептидов анализировали с помощью масс-спектрометрии MS MALDI-TOF (метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетным разделением ионов). Данные MS анализировали с помощью онлайн-сервиса MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>). Идентификацию аминокислотных последовательностей проводили с использованием масс-спектрометра UltrafleXtreme («Bruker Daltonik», Германия). Последовательность сигнального пептида предсказывали с помощью онлайн сервиса (<https://dtu.biolib.com/SignalP-6>), а С-конца пропептида, от которого происходит отщепление зрелого белка, предсказывали с помощью онлайн сервиса (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/ProP-1.0/>). При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние состава питательной среды на уровень протеолитической активности *A. cf. aculeatus*. Глубинное культивирование на различных ферментационных средах показало, что выбор источника азота является определяющим для синтеза ферментов у микромицетов. Так, ФС1 и ФС2 оказались подходящими для продукции специфических фибринолитических ферментов, тогда как на средах ФС3 - ФС8 наблюдали выход других ферментов, обладающих помимо фибринолитической, также и азоказеинолитической (общей протеолитической), коллагеназной, плазминоподобной или урокиназной активностей (табл. 2).

Наибольший уровень общей протеолитической активности у исследуемого штамма был отмечен при культивировании в ФС3 и ФС8. Плазминоподобная и урокиназная активность исследуемого штамма была значительно выше при культивировании на средах ФС6 и ФС8, которые могут быть использованы для получения тромболитических препаратов. Коллагеназная активность при культивировании в глубинных условиях оказалась значительно ниже, наибольший ее уровень наблюдали на среде ФС7.

Значительный уровень продукции протеолитических ферментов при глубинном культивировании гриба, способных к гидролизу фибриногена и

Таблица 2. Активность внеклеточных протеаз в КЖ *A. cf. aculeatus* с различными субстратами после глубинного культивирования в ФС с индукторами синтеза фермента

Table 2. Extracellular proteinase activity in *A. cf. aculeatus* cultural fluids against various substrates following submerged fermentation in a fermentation media containing enzyme synthesis inducers

№ ФС (источник азота)	Субстрат				
	Азоказеин, усл.ед./мл	Азоколл, усл. ед./мл	Фибриноген бычий, мкмоль тир/ мл/мин	ХПС S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys- pNA×2HCl), мкмоль pNA× 10 ⁻³ /мл/мин	ХПС S-2444 (pyroGlu-Gly-Arg- pNA×HCl), мкмоль pNA× 10 ⁻³ /мл/мин
1 (ГРМ)	22,3	2,3	145,25	0,17	5,34
2 (ГРМ+ NaNO ₃)	8,5	1,5	139,35	0,93	0,23
3 (молотая шерсть)	177,2	9,6	293,44	2,67	3,54
4 (гидролизат кератина)	158,3	24,0	303,54	14,10	15,14
5 (эластин)	161,5	21,6	206,71	0,00	5,28
6 (перьевая мука)	106,3	15,0	127,14	18,39	17,34
7 (коллаген)	138,8	27,9	164,61	2,09	2,38
8 (фиброин)	176,8	20,3	294,28	15,84	22,68

азоказеина, был отмечен в средах с гидролизатом кератина, коллагеном и эластином.

Получение препарата внеклеточных протеаз *A. cf. aculeatus*. После культивирования штамма *A. cf. aculeatus* на ФС8 с эластином в качестве индуктора синтеза ферментов, препарат получали высадкой сульфатом аммония до 80% насыщения из КЖ, белковый осадок отделяли центрифугированием, осадок ресуспендировали в минимальном объеме 0,05 М Трис-НСl (рН 8,2) и диализовали в буферном растворе для удаления низкомолекулярных примесей и остатков сульфата аммония, затем лиофильно высушивали. После лиофилизации препарат хранили при -20°C.

Разделение внеклеточных протеаз *A. cf. aculeatus*. На следующем этапе работы было проведено фракционирование полученного препарата с помощью изоэлектрофокусирования. В каждой полученной после изофокусирования фракции определяли содержание белка, измеряли рН раствора, а также активности ферментов. Результаты представлены на рис. 1. Было обнаружено несколько пиков протеолитической активности, наиболее выраженные из них в области 11–13, 19–20, 27, 30, 37 фракций. Фракцию № 40 не использовали в дальнейших экспериментах из-за высокого значения рН, которое

могло привести к щелочному гидролизу амфолинов, присутствующих в образце после разделения.

Электрофорез в ПААГ. В результате проведенного электрофоретического анализа по Лэммли удалось установить количество белковых фракций, входящих в состав препарата в различных фракциях. На рис. 2 а видно, что во фракциях № 13 и 20 присутствовали две полосы, соответствующие белкам с молекулярной массой ~ 35 кДа и ~ 10 кДа, а во фракциях № 19 и 27 наблюдали только белковой полосы с молекулярной массой ~ 35 кДа. Для проверки предположения о ферментной природе данных белковых молекул проводили зимографию с нативными белками.

Зимография. Результаты зимографического исследования (рис. 2 б) показали, что содержащийся в препарате белок с молекулярной массой ~ 35 кДа обладал протеолитической активностью. Наиболее вероятно, что именно этот фермент обуславливал активность исследуемых фракций. Активность белкового компонента с молекулярной массой ~ 10 кДа на зимограмме не была выявлена, что может быть связано также с процессом автопротеолиза или отсутствием способности к гидролизу желатина.

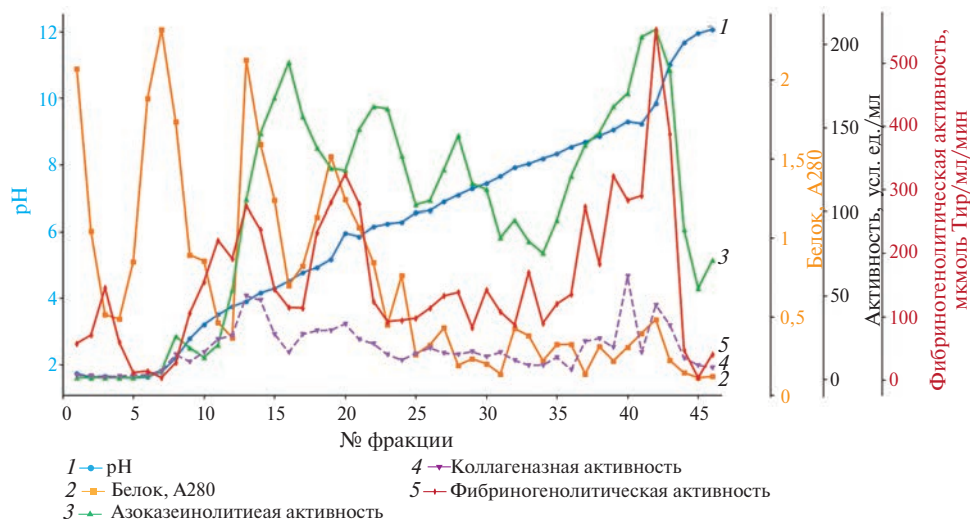


Рис. 1. Разделение белков препарата КЖ *A. cf. aculeatus* методом ИЭФ: 1 — pH; 2 — белок, A280; 3 — азоказеинолитическая активность усл.ед./мл; 4 — коллагеназная активность, усл.ед./мл; 5 — фибринолитическая активность, мкмоль Тир/мл/мин

Fig. 1. Separation of proteins from the *A. cf. aculeatus* cultural fluid preparation by Isoelectrofocusing: 1 — pH; 2 — protein, A280; 3 — azocaseinolytic activity, arb. units/mL; 4 — collagenase activity, arb. units/mL; 5 — fibrinolytic activity, $\mu\text{mol Tyr/mL/min}$

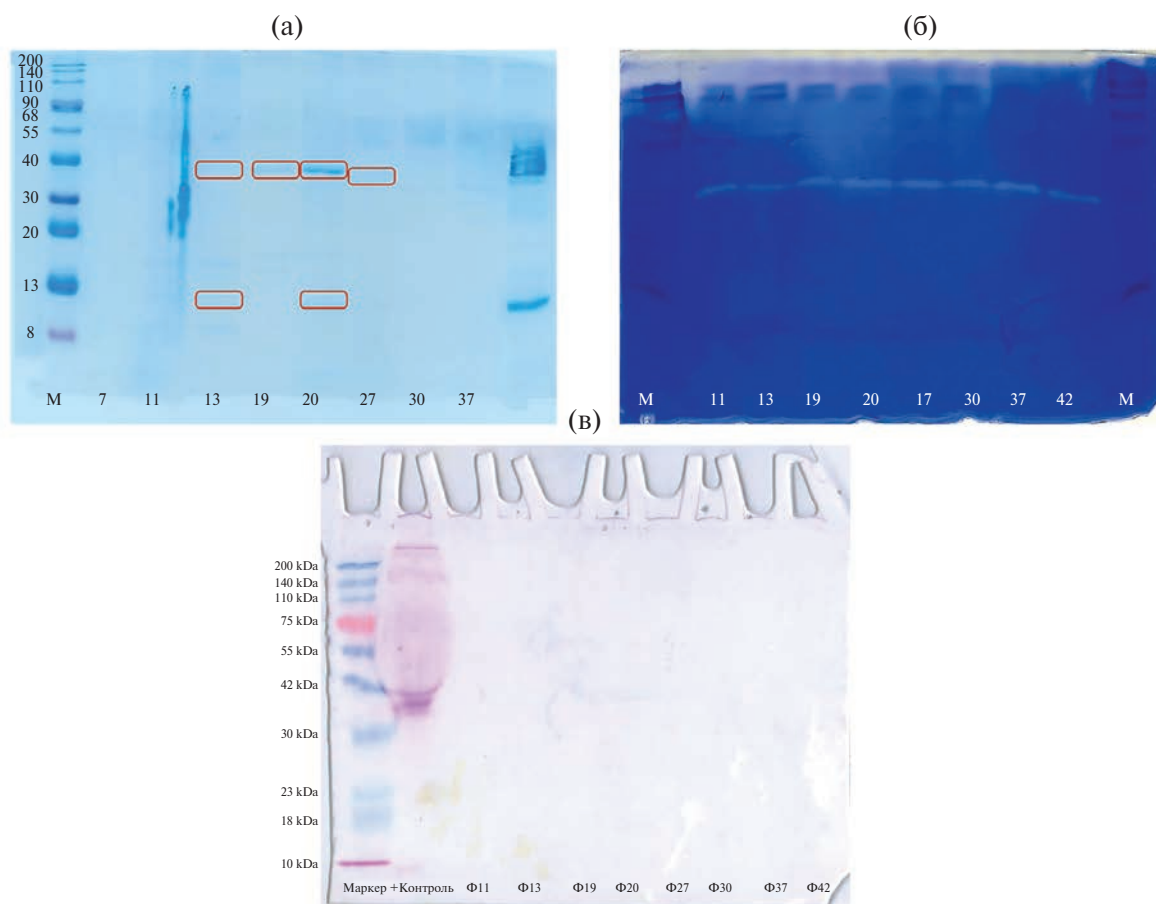


Рис. 2. Электрофореграмма (а), зимограмма с желатином (б) и окрашивание реактивом Шиффа на гликозилирование (в) фракций № 7, 11, 13, 19, 20, 27, 30 и 37 после изоэлектрофокусирования

Fig. 2. Electrophoretogram (a), gelatin zymogram (b), and Schiff reagent staining for glycosylation (c) of fractions Nos. 7, 11, 13, 19, 20, 27, 30, and 37 after isoelectric focusing

Также на электрофореграмме видны несколько высокомолекулярных белковых полос, которые на зимограмме не проявили активности.

Определение углеводного компонента протеаз. Окрашивание полиакриламидного геля по методике для выявления углеводного компонента у разделенных белков показало гликозилированный белок, который приобрел ярко-малиновый цвет. Белки, не содержащие углеводный компонент, остались неокрашенными. На рис. 2 в видно, что среди нанесенных на гель проб нет ни одной, которая содержала бы гликозилированный окрашенный белок, кроме положительного контроля с плазмой кролика во второй лунке. Таким обра-

зом, можно сделать вывод, что протеолитические ферменты фракций № 11, 13, 19, 20, 27, 30 и 37 не гликозилированы.

Ингибиторный анализ. Ингибиторный анализ проводился для комплексного препарата, полученного после осаждения сульфатом аммония. Определение общей протеолитической активности проводили с субстратом азоказеином. В качестве контроля использовали реакцию препарата с азоказеином, без прединкубации с ингибиторами. Реакция ингибировалась в результате добавления ЭДТА и PMSF, что могло свидетельствовать о том, что в состав комплексного препарата входят, видимо, сериновая и металлопротеазы (рис. 3).

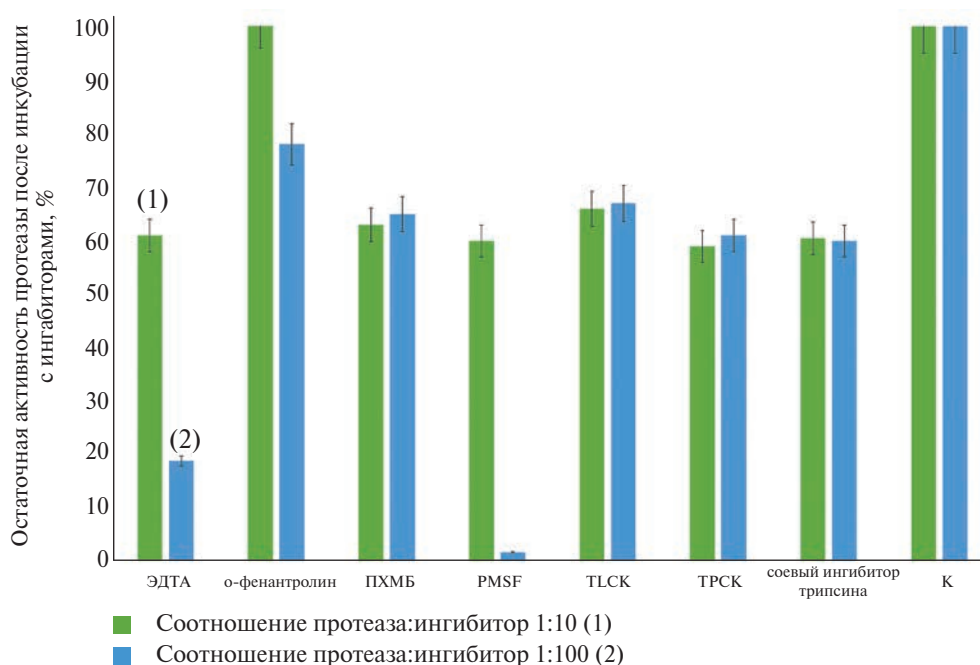


Рис. 3. Остаточная активность препарата *A. cf. aculeatus* после инкубации с растворами ингибиторов: соотношение протеаза – ингибитор 1:10 (1), 1:100 (2)

Fig. 3. Residual activity of the *A. cf. aculeatus* preparation after incubation with inhibitor solutions: protease-inhibitor ratio 1:10 (1), 1:100 (2)

Определение субстратной специфичности протеазы *A. cf. aculeatus* в отношении ХПС. По результатам оценки субстратной специфичности можно сделать вывод о том, что комплексный препарат проявляет специфичность в отношении субстратов для определения активности субтилизин-подобных и химотрипсин-подобных сериновых протеаз.

Также в меньшей степени наблюдается активность в отношении субстратов нейтрофильной эластазы, трипсина, тромбина, рептилазы и протеазы, участвующей в процессе свертывания крови (рис. 4).

Оценка влияния ионов металлов и ПАВ на активность препарата *A. cf. aculeatus*. Присутствие

ионов Ag^+ , Cu^{2+} и Zn^{2+} , а также ПАВ из стирального порошка «Synergetic»TM и додецилсульфата натрия (ДСН) в среде негативно сказывалось на возможности фермента катализировать реакцию гидролиза белковых молекул (рис. 5). Наличие ионов металлов и ПАВ в среде может снижать активность протеаз препарата *A. cf. aculeatus* за счет комбинации прямого ингибирования активного центра, структурной денатурации фермента и опосредованного окислительного повреждения. Следствием является снижение эффективности препарата в условиях, где присутствуют эти соединения, например, при очистке сточных вод, содержащих

промышленные отходы, или при использовании в сочетании с моющими средствами.

Определение кинетических параметров протеазы *A. cf. aculeatus* с молекулярной массой ~35 кДа. Экспериментально измеренные кинетические характеристики свидетельствуют о высокой активности препарата ферментов относительно использо-

емого субстрата N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA. Максимальная скорость реакции ($V_{\max}$) составила 22,83 мМ/мл×мин, что отражает максимальную производительность фермента при полном насыщении активным субстратом. Рассчитанная константа Михаэлиса (K_m) оказалась равной 1,5 мМ.

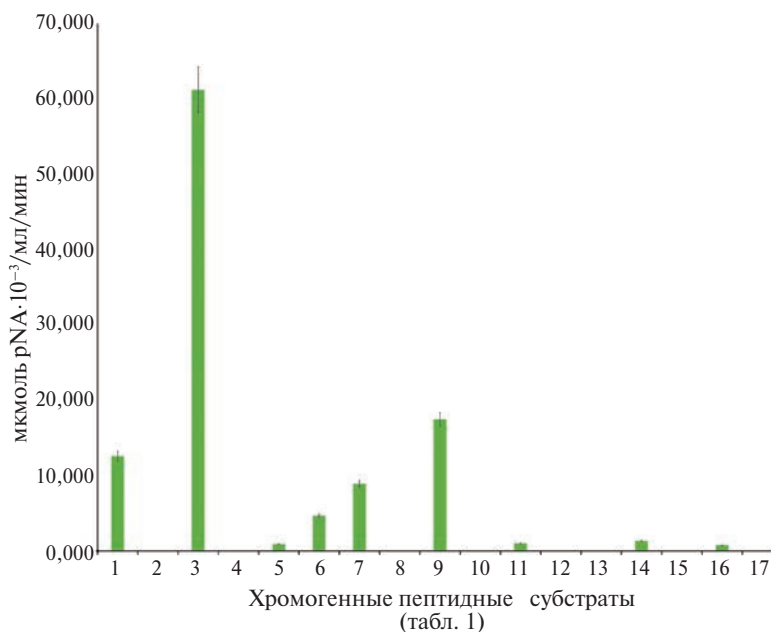


Рис. 4. Активность препарата протеаз *A. cf. aculeatus* в отношении различных ХПС (1–17 см. табл. 1)

Fig. 4. Activity of the *A. cf. aculeatus* protease preparation against various chromogenic peptide substrates (1–17 see Table 1)

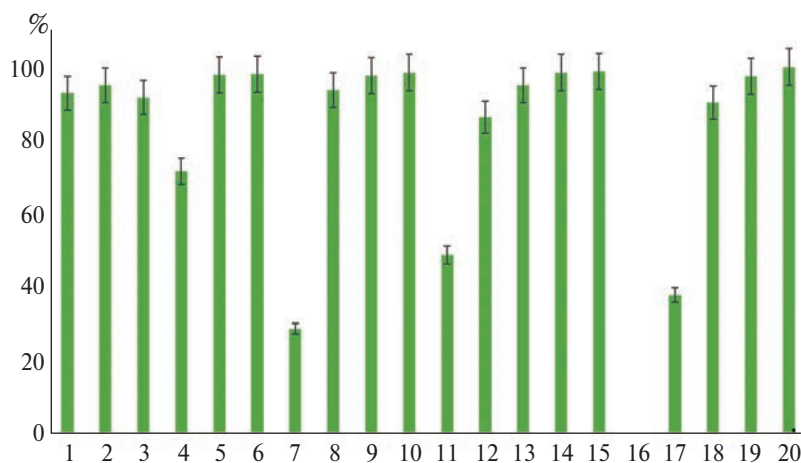


Рис. 5. Активности препарата *A. cf. aculeatus* после инкубации в присутствии ионов металлов и ПАВ: 1 — Mg^{2+} ; 2 — Li^+ ; 3 — Cd^{2+} ; 4 — Ag^+ ; 5 — Ba^{2+} ; 6 — Cs^{2+} ; 7 — Cu^{2+} ; 8 — Mn^{2+} ; 9 — Na^+ ; 10 — K^+ ; 11 — Zn^{2+} ; 12 — Co^{2+} ; 13 — Ca^{2+} ; 14 — Твин 20; 15 — Твин 80; 16 — додецилсульфат натрия; 17 — стиральный порошок «Synergetic™»; 18 — стиральный порошок «Tide™»; 19 — Тритон X-100; 20 — контроль

Fig. 5. Activities of the *A. cf. aculeatus* preparation after incubation in the presence of metal ions and surfactants: 1 — Mg^{2+} ; 2 — Li^+ ; 3 — Cd^{2+} ; 4 — Ag^+ ; 5 — Ba^{2+} ; 6 — Cs^{2+} ; 7 — Cu^{2+} ; 8 — Mn^{2+} ; 9 — Na^+ ; 10 — K^+ ; 11 — Zn^{2+} ; 12 — Co^{2+} ; 13 — Ca^{2+} ; 14 — Tween 20; 15 — Tween 80; 16 — sodium dodecyl sulfate; 17 — Synergetic™ washing powder; 18 — Tide™ washing powder; 19 — Triton X-100; 20 — control

Идентификация протеазы. В результате проведения масс-спектрометрического анализа было установлено, что компонент комплексного препарата протеаз с молекулярной массой ~35 кДа является протеолитическим ферментом. По данным поиска соответствия по базам данных белковых последовательностей данный компонент показал наибольшую гомологию с субтилизин-подобной сериновой протеазой семейства S8 из гриба *Knufia peltigerae* (Uniprot A0AA38XHS2).

Покрытие аминокислотной последовательности составило 49%, что является достаточным для достоверной идентификации белка на уровне семейства. Анализ распределения пептидов показал, что в область покрытия попали две из трех аминокислот, составляющих каталитическую

триаду, характерную для сериновых протеаз, что является дополнительным подтверждением функциональной принадлежности исследуемого белка. Аминокислотная последовательность из протеазы *K. peltigerae* представлена на рис. 6. На рисунке отмечен сигнальный пептид и пропептид, предсказанные с помощью сервисов SignalP-6.0 и ProP-1.0.

Масс-спектрометрический анализ позволил идентифицировать один из компонентов комплексного препарата как протеазу, гомологичную субтилизин-подобной сериновой протеазе семейства S8 из *Knufia peltigerae*, с покрытием аминокислотных последовательностей 49%. Что касается белкового компонента с молекулярной массой ~10 кДа, то требуется ее дальнейшее исследование.

MSQVLTQPRVRRVWVVLGASVLSLLLATPALAGDVQLSGLQSAPTHQRFIVKYRDGSAP
VANTTALASSLKTAAGIASSQGRALGLQVRKLVGSTVVRTDRALDQAESELLMRKL
AADPNVEYVEVDQIMRATLTPNDTRFSEQWGFSTNASINVRPAWDKATGTGVVVAVID
TGITNHADLNANILPGYDFISDAAMARDGGGRDSNPNDGWDYGDNECQAGYPGSNSS
WEGTHVAGTVAAVTNNSTGVAGTAFNAKVVVPVRLGKCGGYTSDIADIVWASGGTVS
GVPANANPAEVINMSLGGGSCSTTYQNAINGAVGRGTTVVVAAGNSNTNVSSAVPANC
PNVIAVAATTSAGARASFSNYGTGIDISAPGQSILSTLNSGTTTPGSASYASYNGTSMAP
HVAGVVALMQSVAPSPSPAQVESIIKSTARPLPGACSGGCGAGIIDADA AVAAAINGGGN
PNPGGNELQNNVPVTGLGAASGASLSYTVNVPAGRSQRLRVAISGGSGDADLYLRQGSAP
TDTVYTCRPLYSGNNCTCTVNSPAAGTWYVRVKAYSTFGVSLNAQY

IASSQGR – пропептид предиктор (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/ProP-1.0/>)

MSQVLTQPRVRRVWVVLGASVLSLLLATPALA – сигнальный пептид
(<https://dtu.biolib.com/SignalP-6>)

D177, H237, S409 – каталитическая триада

Рис. 6. Результаты идентификации протеаз *A. cf. aculeatus*: аминокислотная последовательность протеазы с молекулярной массой ~35 кДа (зона покрытия 49%). Красным цветом выделены зоны покрытия (диапазон масс/зарядов (m/z), который прибор способен зарегистрировать с приемлемой чувствительностью и разрешением), соответствующие по массам пептидов, полученным в процессе трипсинолиза изучаемых протеаз. Зеленым цветом выделен сигнальный пептид. Фиолетовым фоном выделен C-конец пропептида, после которого происходит отщепление зрелого белка. Желтым цветом выделена каталитическая триада активного центра

Fig. 6. Results of *A. cf. aculeatus* protease identification: amino acid sequence of a protease with a molecular mass of ~35 kDa (49% coverage). Coverage zones (the mass/charge range (m/z) that the instrument can detect with acceptable sensitivity and resolution) corresponding to the peptide masses obtained during trypsinolysis of the studied proteases are highlighted in red. The signal peptide is highlighted in green. The C-terminus of the propeptide, after which cleavage of the mature protein occurs, is highlighted in purple. The catalytic triad of the active site is highlighted in yellow

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам исследования влияния индукторов синтеза протеаз на активность внеклеточных ферментов, продуцируемых штаммом *A. cf. aculeatus* в КЖ при глубинном культивировании, было выяснено, что разные источники азота стимулируют продукцию различных протеолитических ферментов. Так, добавление в среду гидролизата рыбной муки и нитрата натрия (ФС1

и ФС2) повышало продукцию фибринолитических ферментов, тогда как такие индукторы синтеза, как молотая шерсть, гидролизат кератина, эластин, перьевая мука, коллаген и фиброин (ФС3-ФС8) в разной степени оказывали влияние на уровень активностей, включая общую протеолитическую, коллагеназную, плазминоподобную и урокиназную. Максимальные уровни общей протеолитической активности наблюдались на средах ФС3 и ФС8, а плазминоподобная и урокиназная активность — на

ФС6 и ФС8, что открывает перспективы применения штамма для получения тромболитических препаратов. Зависимость от индукторов (если фермент индуцируемый) в составе среды характерна для индуцируемых ферментов, она отмечена также и у энтомопатогенов *Beauveria bassiana* и *Metarhizium anisopliae* при варьировании источников углерода [2].

Из препарата внеклеточных протеаз штамма *A. cf. aculeatus*, выращенного на среде с эластином (ФС5), был получен белковый комплекс, фракционированный методом изоэлектрофокусирования. Анализ позволил выделить несколько фракций с протеолитической активностью. Электрофоретический анализ выявил присутствие основных белков с молекулярной массой ~35 и ~10 кДа. На основании зимографии установлено, что основная протеолитическая активность обусловлена ферментом с массой ~35 кДа. Ингибиторный анализ показал, что активность комплексного препарата после инкубации с растворами ингибиторов значительно снижалась после воздействия ЭДТА и PMSF — ингибиторов металлопротеаз и сериновых протеаз. Кроме того, окрашивание гелей подтвердило отсутствие гликозилирования, что важно для понимания их стабильности и свойств. Подобные ферменты массой 30–40 кДа, обеспечивающие деградацию белков хозяина, характерны для *Knufia peltigerae* и *Clonostachys rosea* [8, 13].

По результатам оценки субстратной специфичности фракций, содержащих белковый компонент с молекулярной массой ~35 кДа можно сделать вывод о том, что протеаза специфична в отношении субстрата для определения активности субтили-

зин-подобных и химотрипсин-подобных сериновых протеаз. Также в меньшей степени наблюдается активность в отношении субстратов нейтрофильной эластазы, трипсина, тромбина и рептилазы и протеазы, участвующей в процессе свертывания крови.

На активность ферментов отрицательно влияло присутствие ионов Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{+} и анионных ПАВ, что важно учитывать при его дальнейшем применении.

Кинетический анализ показал высокую ферментативную эффективность: максимальная скорость гидролиза составила 22,83 мМ/(мл×мин), а константа Михаэлиса — 1,5 мМ. Схожие кинетические параметры (K_m 1–2 мМ) демонстрируют субтилизин-подобные протеазы *Streptomyces griseus* и *Aspergillus alliaceus* с фибринолитической активностью [27].

Масс-спектрометрическое исследование позволило идентифицировать основной компонент препарата (белковая фракция с молекулярной массой ~35 кДа, показывающая активность на зимографии) — субтилизин-подобную сериновую протеазу семейства S8, демонстрирующую высокую гомологию с протеазой *Knufia peltigerae*.

Полученные результаты характеризуют комплексный препарат внеклеточных протеолитических ферментов энтомопатогенного микромицета *Akanthomyces cf. aculeatus* как способный к катализу реакции гидролиза различных белковых субстратов, что может стать основой для его дальнейшего исследования и использования в промышленности и биотехнологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евлахова А.А. Энтомопатогенные грибы. Систематика, биология, практическое значение. Л.: Наука, 1974. 260 с.
2. Осмоловский А.А., Клягин С.Д., Вашкевич Т.В., Кураков А.В., Крейер В.Г. Фибрино- и фибриногенолитическое действие внеклеточных протеиназ микромицетов *Aspergillus alliaceus* 7dN1 и *A. terreus* 2 // Микология и фитопатология. 2023. Т. 57. № 4. С. 298–300. <https://doi.org/10.31857/S0026364823040086>
3. Basalaeva D.L., Bogomolova A.A., Osmolovskiy A.A. Fibrinolytic proteases of entomopathogenic micro-mycetes: production and characteristics // *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2025. V. 15. № 1. e11899. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.11899>
4. Fernandes E.G., Valério H.M., Feltrin T., Van Der Sand S.T. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates // *Braz. J. Microbiol.* 2012. V. 43. № 2. P. 827–833. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200049>
5. Ferreira J.M., de Freitas Soares F.E. Entomopathogenic Fungi Hydrolytic Enzymes: A New Approach to Biocontrol? // *J. Nat. Pestic. Res.* 2023. V. 3. 100020. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100020>
6. Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide — a chromogenic substrate for thiol proteinase assay // *Anal. Biochem.* 1984. V. 143. № 2. P. 293–297. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90665-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90665-1)
7. Galiakberova A.A., Bednenko D.M., Kreyer V.G., Osmolovskiy A.A., Egorov N.S. Formation and Properties of the Extracellular Proteinase of *Aspergillus flavus* O-1 Micromycete Active against Fibrillar Proteins // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. P. 586–593.

8. Goettel M.S., Eilenberg J., Glare T. Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations // *Comprehensive Molecular Insect Science*. 2005. V. 6. P. 361–406.
9. Kominami E., Hoffschulte H., Leuschel L., Maier K., Holzer H. The substrate specificity of proteinase B from Baker's yeast // *Biochim. Biophys. Acta*. 1981. V. 661. № 1. P. 136–141. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(81\)90092-9](https://doi.org/10.1016/0005-2744(81)90092-9)
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
11. Lavrenova V.N., Kreyer V.G., Savkovic Z. et al. Properties of Extracellular Protease — Regulator of Hemostasis Produced by Micromycete *Aspergillus tabacinus* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2024. V. 60. P. 118–123.
12. Lv B., Zhao X., Guo Y., Li S., Sun M. Serine protease CrKP43 interacts with MAPK and regulates fungal development and mycoparasitism in *Clonostachys chloroleuca* // *Microbiol. Spectr.* 2023. V. 11. № 6. e0244823. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02448-23>
13. Martodam R.R., Baugh R.J., Twumasi D.Y., Liener I.E. A rapid procedure for the large scale purification of elastase and cathepsin G from human sputum // *Biochim. Biophys. Acta*. 1982. V. 709. № 2. P. 224–230.
14. Matačić S., Brkljača M., Kučić N. Actions of two serine proteases from *Trimeresurus jerdonii* venom on chromogenic substrates and fibrinogen // *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 2002. V. 132. № 2. P. 621–629. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(02\)00069-6](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(02)00069-6)
15. Mattler L.E., Bang N.U. Serine protease specificity for peptide chromogenic substrates // *Thromb. Haemost.* 1977. V. 38. № 4. P. 776–792.
16. McPhalen C.A., Vincentelli R., Dauter Z. et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum* // *Microbiology*. 1994. V. 140. № 7. P. 1687–1691. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-7-1687>
17. Muszewska A., Taylor J.W., Szczesny P., Grynberg M. Independent subtilases expansions in fungi associated with animals // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. № 12. P. 3395–3404. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr176>
18. Orlowski M., Wilk S. A peptide peptidohydrolase from bovine pituitary // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976. V. 70. № 1. P. 264–270.
19. Powers J.C., Kam C.M., Nishida K. et al. Isocoumarin inhibitors of prolyl oligopeptidase // *Bioorg. Med. Chem.* 2005. V. 13. № 17. P. 5043–5050. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.05.022>
20. Semenova T.A., Dunaevsky Y.E., Beljakova G.A., Belozersky M.A. Extracellular peptidases of insect-associated fungi and their possible use in biological control programs and as pathogenicity markers // *Fungal Biol.* 2020. V. 124. № 1. P. 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.11.005>
21. Smith B.J. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. 296 p.
22. Steinbuch M., Rigo B. Alpha-2-macroglobulin: structural and functional aspects // *Clin. Chem. Lab. Med.* 1998. V. 36. № 6. P. 407–411. <https://doi.org/10.1515/CCLM.1998.123>
23. Steinhoff M., Buddenkotte J., Shpacovitch V. et al. Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response // *Endocr. Rev.* 2005. V. 26. № 1. P. 1–43. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0025>
24. Stief T.W., Fareed J. A new and simple isolation procedure for human protein C inhibitor. Evidence for a second inhibitor for activated protein C present in human plasma // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 1988. V. 369. № 2. P. 965. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1988.369.2.965>
25. Tanaka T., Miyauchi S., Matsumura S. et al. Characterization and substrate specificity of prolyl oligopeptidase from *Aspergillus niger* // *FEBS Open Bio*. 2021. V. 11. № 5. P. 1406–1419. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13457>
26. Vesterberg O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels // *Biochim. Biophys. Acta*. 1972. V. 257. № 1. P. 11–19. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(72\)90248-6](https://doi.org/10.1016/0005-2795(72)90248-6)
27. Wiman B., Nilsson T., Cederholm B. Thrombolysis // *Thromb. Res.* 1980. V. 17. № 2. P. 213–222. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(80\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0005-2744(80)90019-4)

REFERENCES

1. Evlakhova A.A. Entomopathogenic fungi. Taxonomy, biology, practical significance. Leningrad: Nauka, 1974. 260 p. (In Russ.).
2. Osmolovskiy A.A., Klyagin S.D., Vashkevich T.V., Kurakov A.V., Kreyer V.G. Fibrin- and fibrinogenolytic action of extracellular proteinases of micromycetes *Aspergillus alliaceus* 7dN1 and *A. terreus* 2 // *Mikologia i fitopatologia*. 2023. vol. 57. no. 4. P. 298–300. <https://doi.org/10.31857/S0026364823040086> (In Russ.).

3. Basalaeva D.L., Bogomolova A.A., Osmolovskiy A.A. Fibrinolytic proteases of entomopathogenic micromycetes: production and characteristics // *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2025. vol. 15. No. 1. e11899. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.11899>
4. Fernandes E.G., Valério H.M., Feltrin T., Van Der Sand S.T. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates // *Braz. J. Microbiol.* 2012. vol. 43. No. 2. P. 827–833. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200049>
5. Ferreira J.M., de Freitas Soares F.E. Entomopathogenic Fungi Hydrolytic Enzymes: A New Approach to Biocontrol? // *J. Nat. Pestic. Res.* 2023. vol. 3. 100020. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100020>
6. Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide — a chromogenic substrate for thiol proteinase assay // *Anal. Biochem.* 1984. vol. 143. No. 2. P. 293–297. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90665-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90665-1)
7. Galiakberova A.A., Bednenko D.M., Kreyer V.G., Osmolovskiy A.A., Egorov N.S. Formation and Properties of the Extracellular Proteinase of *Aspergillus flavus* O-1 Micromycete Active against Fibrillar Proteins // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. Vol. 57. P. 586–593.
8. Goettel M.S., Eilenberg J., Glare T. Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations // *Comprehensive Molecular Insect Science.* 2005. vol. 6. P. 361–406.
9. Kominami E., Hoffschulte H., Leuschel L., Maier K., Holzer H. The substrate specificity of proteinase B from Baker's yeast // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. vol. 661. No. 1. P. 136–141. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(81\)90092-9](https://doi.org/10.1016/0005-2744(81)90092-9)
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. vol. 227. No. 5259. P. 680–685.
11. Lavrenova V.N., Kreyer V.G., Savkovic Z. et al. Properties of Extracellular Protease — Regulator of Hemostasis Produced by Micromycete *Aspergillus tabacinus* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2024. vol. 60. P. 118–123.
12. Lv B., Zhao X., Guo Y., Li S., Sun M. Serine protease CrKP43 interacts with MAPK and regulates fungal development and mycoparasitism in *Clonostachys chloroleuca* // *Microbiol. Spectr.* 2023. vol. 11. No. 6. e0244823. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02448-23>
13. Martodam R.R., Baugh R.J., Twumasi D.Y., Liener I.E. A rapid procedure for the large scale purification of elastase and cathepsin G from human sputum // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. vol. 709. No. 2. P. 224–230.
14. Matačić S., Brkljača M., Kučić N. Actions of two serine proteases from *Trimeresurus jerdonii* venom on chromogenic substrates and fibrinogen // *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 2002. vol. 132. No. 2. P. 621–629. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00069-6](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00069-6)
15. Mattler L.E., Bang N.U. Serine protease specificity for peptide chromogenic substrates // *Thromb. Haemost.* 1977. vol. 38. No. 4. P. 776–792.
16. McPhalen C.A., Vincentelli R., Dauter Z. et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum* // *Microbiology.* 1994. vol. 140. No. 7. P. 1687–1691. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-7-1687>
17. Muszewska A., Taylor J.W., Szczesny P., Grynberg M. Independent subtilases expansions in fungi associated with animals // *Mol. Biol. Evol.* 2011. vol. 28. No. 12. P. 3395–3404. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr176>
18. Orlowski M., Wilk S. A peptide peptidohydrolase from bovine pituitary // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976. Vol. 70. No. 1. P. 264–270.
19. Powers J.C., Kam C.M., Nishida K. et al. Isocoumarin inhibitors of prolyl oligopeptidase // *Bioorg. Med. Chem.* 2005. Vol. 13. No. 17. P. 5043–5050. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.05.022>
20. Semenova T.A., Dunaevsky Y.E., Beljakova G.A., Belozersky M.A. Extracellular peptidases of insect-associated fungi and their possible use in biological control programs and as pathogenicity markers // *Fungal Biol.* 2020. Vol. 124. No. 1. P. 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.11.005>
21. Smith B.J. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. 296 p.
22. Steinbuch M., Rigo B. Alpha-2-macroglobulin: structural and functional aspects // *Clin. Chem. Lab. Med.* 1998. vol. 36. No. 6. P. 407–411. <https://doi.org/10.1515/CCLM.1998.123>
23. Steinhoff M., Buddenkotte J., Shpacovitch V. et al. Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response // *Endocr. Rev.* 2005. Vol. 26. No. 1. P. 1–43. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0025>
24. Stief T.W., Fareed J. A new and simple isolation procedure for human protein C inhibitor. Evidence for a second inhibitor for activated protein C present in human plasma // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 1988. vol. 369. No. 2. P. 965. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1988.369.2.965>

25. Tanaka T., Miyauchi S., Matsumura S. et al. Characterization and substrate specificity of prolyl oligopeptidase from *Aspergillus niger* // *FEBS Open Bio*. 2021. vol. 11. No. 5. P. 1406–1419. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13457>
26. Vesterberg O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels // *Biochim. Biophys. Acta*. 1972. Vol. 257. No. 1. P. 11–19. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(72\)90248-6](https://doi.org/10.1016/0005-2795(72)90248-6)
27. Wiman B., Nilsson T., Cederholm B. Thrombolysis // *Thromb. Res*. 1980. vol. 17. No. 2. P. 213–222. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(80\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0005-2744(80)90019-4)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Басалаева Дарья Леонидовна — аспирант, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

E-mail: dbasalaewa@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7228-6552>

Богомолова Анна Алексеевна — студент, Утрехтский университет, Утрехт, Нидерланды

e-mail: a1a2bogomolova@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0005-2942-6472>

Коваль Анастасия Викторовна — студент, Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Российская Федерация

E-mail: serenym.nastya@mail.ru

Крейер Валериана Георгиевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Осмоловский Александр Андреевич — кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

E-mail: aosmol@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6672-0551>

AUTHOR INFORMATION

Basalaeva, Daria L. — postgraduate student, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

E-mail: dbasalaewa@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7228-6552>

Bogomolova, Anna A. — student, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

E-mail: a1a2bogomolova@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0005-2942-6472>

Koval, Anastasia V. — student, HSE University, Moscow, Russian Federation

E-mail: serenym.nastya@mail.ru

Kreyer, Valeriana G. — Cand. Sci. in Biology, Senior Researcher, Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Osmolovskiy, Alexandr A. — Cand. Sci. in Biology, Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

E-mail: aosmol@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6672-0551>

Поступила в редакцию 07.11.2025 г.

После доработки 11.03.2026 г.

Принята к публикации 05.04.2026 г.

Received November 07, 2025

Revised March 11, 2026

Accepted April 05, 2026