

**Масштабирование культивирования микромицета *Aspergillus ochraceus*,
продуцента активатора протеина С плазмы крови человека**

Научный руководитель – Осмоловский Александр Андреевич

Комаревцев Сергей Константинович

Аспирант

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра микробиологии, Москва, Россия

E-mail: skomarevtsev@yandex.ru

Микромицет *Aspergillus ochraceus* является перспективным продуцентом протеиназы - активатора протеина С плазмы крови человека, которая может использоваться в лабораторных анализах крови вместо широко применяемых протеаз, получаемых в настоящее время из яда змей-щитомордников, стоимость которых довольно высока. Штамм *A. ochraceus*, предназначенный для получения активатора протеина С, был 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. 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.

Активатор протеина С плазмы крови человека, выделяемый штаммом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в среду 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 °С. Протеаза имеет узкую субстратную специфичность, сходную с активатором из яда *Agkistrodon contortrix contortrix*, не расщепляет субстраты трипсиноподобных, химотрипсиноподобных и субтилизиноподобных протеаз. Это позволяет рассматривать активатор протеина С из *A. ochraceus* ВКМ F-4104D как потенциально более доступный для использования в диагностических целях аналог активатора из яда *A. contortrix contortrix*.

Ранее были подобраны оптимальные условия культивирования штамма микромицета для наибольшего выхода активатора протеина С. Установлено, что наиболее эффективная секреция активатора протеина С происходит при температуре 28 °С, рН около 6,5 при наличии в среде культивирования органических источников азота - пептона и гидролизата рыбной муки. Следует отметить, что приведенный подбор оптимальных условий для культивирования проводился в небольших объёмах, поэтому логическим продолжением этого является периодическое глубинное культивирование штамма *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в ферментёре, что крайне важно для будущего масштабирования технологии получения активатора протеина С.

При культивировании в ферментационном комплексе микромицет растёт светлыми коричнево-зелёными пеллетами размером 3 - 4 мм. Уже после 1 суток выращивания в ферментационном комплексе активаторная активность превышает значения, получаемые после 3 суток культивирования в качалочных колбах. При увеличении объёма питательной среды в ферментационном комплексе активаторная активность после культивирования

не уменьшается, что свидетельствует о хорошей способности штамма микромицета к масштабированию и позволяет ставить дальнейшие эксперименты по ферментации в больших объёмах питательной среды.

Более продолжительное, чем 1 сутки, культивирование микромицета в ферментационном комплексе не привело к увеличению активаторной активности в культуральной жидкости. При этом наблюдали очень интенсивный рост микромицета, приводивший к значительному увеличению вязкости ферментационной среды, что затрудняло работу с ферментационным комплексом, а также отделение биомассы от культуральной жидкости. Из этого следует, что для получения активатора протеина С оптимальное время культивирования микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в ферментационном комплексе составило 1 сутки.

Источники и литература

- 1) 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. №. 1. С. 86-92.
- 2) Осмоловский А. А. Антикоагулянтная протеиназа (активатор протеина С) микромицета *Aspergillus ochraceus*: получение и свойства // Дисс. канд. наук. Москва, 2013.
- 3) Осмоловский А.А., Кураков А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Штамм *Aspergillus ochraceus* – продуцент протеиназы – активатора протеина С плазмы крови. 2011. Патент РФ 2460772.
- 4) Осмоловский А.А., Кураков А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Способ получения протеиназы – активатора протеина С плазмы крови. 2011. Патент РФ 2468081.
- 5) Осмоловский А.А., Кураков А. В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Способ твердофазного культивирования *Aspergillus ochraceus* для получения протеиназы – активатора протеина С плазмы крови. 2013. Патент РФ 2535872.