

# ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА ИЗ ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЫ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *COPRINUSLAGOPIDES*

Соколова С.В., Федорюк Е. Д., Шамцян М. М.

*Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский проспект, дом 26, E-mail: [rsokolova@rambler.ru](mailto:rsokolova@rambler.ru)*

## ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

На сегодняшний день актуальной задачей медицинской биотехнологии является разработка лекарственных препаратов и медицинских изделий для лечения повреждений кожи. Разработки в этой области затрагивают широкий спектр проблем, связанных с заживлением ран, профилактикой и лечением послеоперационных, травматических и послеожоговых рубцов, шрамов и спаек. Современные методы коррекции повреждений кожи малоэффективны и эта проблема стимулирует поиск и разработку новых лекарственных препаратов.

В связи с тем, что основу рубцов составляет фибриллярный белок – коллаген, для их коррекции в настоящее время широко применяют фермент, лизирующий этот белок, коллагеназу. Уникальность этого фермента заключается в его способности гидролизовать в коллагене специфические пептидные связи, которые практически не поддаются гидролизу другими ферментами. Коллагеназы в настоящее время применяются в составе многих лекарственных препаратов косметического, медицинского и ветеринарного назначения, а также в пищевой и кожевенно-меховой промышленности. Главным потребителем коллагенолитических ферментов является фармацевтическая промышленность. Они используются в составе лекарственных препаратов, предназначенных для очищения гнойных ран и трофических язв, удаления рубцов и пр.

Используемые на данный момент коллагеназы имеют ряд существенных недостатков. Наиболее известный продуцент коллагеназы [1] – бактерия *Clostridium histolyticum* является возбудителем газовой гангрены, вследствие чего предъявляются повышенные требования безопасности на всех стадиях производства и реализации продукции. При получении коллагеназы из камчатского краба [2] используется только гепатопанкреас (орган, совмещающий функции печени и поджелудочной железы), что приводит к образованию большого количества отходов, которые в дальнейшем необходимо утилизировать. Крабовая коллагеназа безопасна для человека, но имеет ограничения для промышленного производства и значительное различие в степени чистоты и активности фермента.

Вследствие этого наиболее значимой представляется проблема поиска продуцентов коллагеназ, у которых отсутствовали бы перечисленные выше недостатки. На предмет соответствия этим требованиям в лаборатории кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета) проводился скрининг базидиомицетов, отличающихся высоким уровнем коллагенолитической активности.

Из ряда культур высших базидиомицетов для дальнейших исследований был выбран гриб *Coprinus lagopides*, который обладал наиболее высокой коллагеназной активностью. Для него проводился подбор соотношения источников азота и углерода в составе питательной среды с целью повышения выхода и активности коллагенолитического фермента, который показал, что наибольшая активность коллагеназы достигается при глубинном культивировании продуцента на полусинтетической глюкозо – пептонной питательной среде с соотношением источников углерода и азота 1,5:1, длительность культивирования при этом составляет 5 суток.

Целью данного исследования являлось изучение коллагенолитического фермента из глубинной культуры базидиального гриба *Coprinuslagopides*.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фермент выделяли из нативного раствора глубинной культуры базидиомицета *Coprinuslagopides*. Глубинное культивирование гриба проводили в три стадии:

1. Получение поверхностной культуры продуцента в пробирках на скошенной агаризованной среде.

Исходную музейную культуру гриба выращивали в пробирках на скошенном сусло-агаре (1л неохмеленного сусла (4-5°Б) с добавлением 2-2,5 % агара) при температуре 28-30°С в течение 7-10 суток – до полного зарастания поверхности косяка.

2. Получение посевного материала в колбах с бусами.

Посевной материал выращивали в конических колбах, на дно которых предварительно засыпали стеклянные или керамические бусы диаметром 7-10 мм, в стационарных условиях при температуре 28-30°С в течение 7-10 суток до полного зарастания поверхности среды плёнкой мицелия.

3. Глубинное культивирование продуцента в колбах Эрленмейера.

Ферментация проводилась в конических колбах Эрленмейера объемом 750 мл на полусинтетической глюкозо-пептонной питательной среде с соотношением источников углерода и азота 1,5:1 в течение 5 суток. Содержание среды в колбах составляло по 150 мл. Выращивание грибов в колбах проводили на роторной качалке при частоте оборотов 180 об/мин.

Культуральную жидкость, после пяти суток культивирования, предварительно отфильтровывали от мицеллиальной биомассы и взвешенных частиц через бумажный фильтр. Полученный нативный раствор очищали от низкомолекулярных примесей и концентрировали в 2,5 раза методом ультрафильтрации. Степень очистки при этом составила 2,03. Процесс вели на ультрафильтрационной установке непроточного типа ФК 01-1000 объемом 1 л с мембраной марки «МИФИЛ ПА – 20» при рабочем давлении 0,15 МПа.

Концентрат лиофильно высушивали с целью получения сухого ферментного препарата коллагеназы.

Для полученного ферментного препарата определяли рН-оптимум и температурный оптимум коллагеназной активности.

Для определения оптимального значения рН ферментативной активности, готовили 1%-е растворы препарата в буферных растворах с различным значением рН, добавляли к ним суспензию коллагена и помещали на 1 сутки в термостат при температуре 37 °С. Коллагенолитическую активность определяли нингидриновым методом. За единицу коллагенолитической активности (КЕА) принимали такое количество мкг фермента, при действии которого на коллаген за 1 час выделяются продукты гидролиза, эквивалентные 1 мкг L-лейцина в стандартных условиях опыта.

При определении температурного оптимума ферментативной активности к 1%-му раствору препарата в буфере с рН=7,6 добавляли суспензию коллагена и помещали на 1 сутки в термостат при определенном значении температуры. Коллагенолитическую активность определяли нингидриновым методом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Из глубинной культуры продуцента выделен высокоактивный препарат коллагенолитического фермента. После очистки фермента методом ультрафильтрации и лиофилизации удельная коллагеназная активность ферментного препарата составила 1283 КЕА/мг белка.

Согласно результатам исследования, рН-оптимум полученного ферментного препарата находится в интервале рН 7,5-7,6. Температурный оптимум препарата наблюдается в области 35-38 °С.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения данного исследования из глубинной культуры базидиального гриба *Coprinus lagorides*, обладающей высокой коллагенолитической активностью, был получен лиофильно высушенный ферментный препарат, удельная коллагеназная активность которого составила 1283 КЕА/мг белка.

Определены рН-оптимум и температурного оптимум ферментативной активности полученного препарата: рН-оптимум находится в области рН 7,5-7,6, а температурный оптимум лежит в интервале 35-38 °С. Оптимальные значения рН и температуры активности фермента близки к соответствующим значениям человеческой кожи, что позволяет предположить, что препарат может быть перспективным для использования в медицине и косметологии.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Коллагенолитические ферменты синтезируемые микроорганизмами. Обзор / Н. С. Демина [и др.] // Микробиология. – 1996 - Т. 65, Вып.3. - С.293-304.
- [2] Руденская, Г. Н. Брахиурины – сериновые коллагенолитические ферменты крабов / Г. Н. Руденская // Биоорганическая химия. – 2003 – Т. 29, Вып. 2. – С. 117-126.