

УДК 582.282.123.4:577.152.34

ОБРАЗОВАНИЕ МИКРОМИЦЕТОМ *Aspergillus ochraceus* ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ – АКТИВАТОРОВ ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ГЛУБИННОМ И ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

© 2013 г. А. А. Осмоловский*, В. Г. Крейер*, Н. А. Баранова*, А. В. Кураков*, Н. С. Егоров**

*Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

**Международный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2013 г.

Проведена оптимизация условий глубинного и твердофазного культивирования микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D – продуцента внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови человека. Показано, что в условиях твердофазного культивирования активаторная к протеину С активность микромицета в 1.5–3.5 раза выше по сравнению с глубинным культивированием из расчета на 1 мл питательной среды. Среди внеклеточных белков, секретируемых *A. ochraceus* ВКМ F-4104D при глубинном и твердофазном культивировании обнаружена активирующая протеин С протеиназа с pI 6.0–6.3.

DOI: 10.7868/S0555109913060147

Протеин С является одним из главных компонентов антикоагулянтной системы человека. В результате ограниченного протеолиза под воздействием комплекса тромбин–тромбомодулин этот белок превращается в свою активную форму – активированный протеин С, который играет важную роль в контроле тромбообразования, блокировании воспаления и ингибировании апоптоза, изменяет профиль экспрессии генов в эндотелиальных клетках [1–3]. Недостаточность содержания протеина С в плазме крови приводит к риску возникновения тромбоэмболических осложнений. Для определения концентрации этого белка в плазме были разработаны диагностические препараты, в состав которых входят протеиназы – активаторы протеина С, выделенные из яда змеи щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix* [4, 5].

Ранее была установлена способность внеклеточных протеиназ, образуемых рядом штаммов микромицета *Aspergillus ochraceus*, активировать протеин С плазмы крови человека [6], что делает их перспективными альтернативными источниками для получения активаторов протеина С.

Образование протеолитических ферментов мицелиальными грибами зависит от способа культивирования. Одним из перспективных способов культивирования микромицетов – продуцентов внеклеточных ферментов является твердофазное культивирование (ТФК) на твердых увлажненных и влагоемких субстратах (отрубях, жмыхах) или же

на инертных носителях (пенополиуретан, перлит и др.) с добавлением питательной среды [7–9]. Такой способ в отличие от глубинного культивирования имитирует естественные физиологические условия для роста грибов. По сравнению с глубинным культивированием, при ТФК мицелиальных грибов, наблюдается более высокий выход ферментов в связи с различиями в экспрессии генов, ответственных за синтез внеклеточных ферментов, а также отличия в физико-химических, кинетических и структурных свойствах секретируемых белков [10, 11].

Представители *A. ochraceus* образуют внеклеточные ферменты, активные в отношении белков системы гемостаза, а именно протеиназы с фибринолитической, коагулазной и антикоагулянтной активностями [12, 13]. Важным фактором, определяющим максимальное образование внеклеточных протеолитических ферментов мицелиальными грибами, являются источники азота в составе питательной среды [14–17]. Особый интерес представляет подбор среды с таким источником азота, на которой штамм проявляет максимальную активаторную к протеину С активность и минимальные значения других протеолитических активностей или их отсутствие.

Цель работы – оптимизация условий образования протеиназ – активаторов протеина С микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D при глубинном и твердофазном культивировании.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Использовали штамм микелиального микроскопического гриба *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, отобранный в ходе предыдущих исследований как наиболее активный продуцент внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С [6]. Для получения посевного материала микромицет выращивали в пробирках на скошенном сусло-агаре в течение 7 сут при 25°C.

Глубинное культивирование *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. С поверхности культуры, выращенной на скошенном сусло-агаре, делали смыв спор и вносили в качалочную колбу емкостью 750 мл со 100 мл питательной среды, содержащей в качестве источников углерода и азота сусло, глюкозу и пептон [18]. Культивирование проводили на орбитальной качалке (200 об/мин) в течение 2 сут при 28°C. Часть полученной биомассы переносили в ферментационные среды, отличающиеся источниками азота, в качестве которых были использованы соевая мука, гидролизат рыбной муки, пептон и нитрат натрия.

Исходной служила среда № 1, содержащая (%): глюкозу – 3.5, крахмал – 1.0, соевую муку – 0.2, гидролизат рыбной муки – 0.5, пептон – 0.5, NaCl – 0.2, K_2HPO_4 – 0.05, MgSO_4 – 0.05 [5].

В среде № 2 единственным источником азота был NaNO_3 (0.5%), в средах № 3 и № 4 – пептон или гидролизат рыбной муки, соответственно.

В среде № 5 из состава исходной среды № 1 была исключена соевая мука, а среда № 6 содержала все компоненты среды № 1 и NaNO_3 (0.5%).

Исходное значение pH этих сред устанавливали на уровне 5.5.

Оптимальный срок культивирования штамма *A. ochraceus* ВКМ F-4104D на вышеуказанных средах составлял 2 сут [6].

Оптимальные значения pH и температуры для образования протеиназ – активаторов протеина С определяли в диапазоне pH 3–9 (с интервалом через единицу) и при температурах культивирования 24, 28, 32 и 34°C на среде, на которой штамм проявлял наибольшую активаторную к протеину С активность.

Твердофазное культивирование *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. В конические колбы объемом 250 мл вносили пшеничные отруби или один из инертных носителей – пенополиуретан (в виде кубиков размером 5.0 × 5.0 × 5.0 мм), перлит, силикагель и вермикулит, стерилизовали и добавляли стерильную ферментационную среду, состав которой был аналогичен оптимальному составу для глубинного культивирования штамма. Оптимальное соотношение между количеством пшеничных отрубей или носителей и добавляемой ферментационной среды, как и продолжительность культивирования, определяли в предварительных эксперимен-

тах в зависимости от влагоемкости субстрата или носителя. В опыте с пшеничными отрубями количество субстрата и объем вносимой ферментационной среды составили – 5 г и 15 мл, с пенополиуретаном – 2.5 г и 20 мл, с перлитом – 5 г и 15 мл, с силикагелем – 10 г и 15 мл и вермикулитом – 5 г и 25 мл соответственно. Засев осуществляли 1 мл споровой суспензии, полученной путем смыва спор выращенной на сусло-агаре культуры. Культивирование *A. ochraceus* ВКМ F-4104D проводили в стационарных условиях при 28°C. Для элюции протеолитических ферментов использовали 0.05 М трис-HCl-буфер, pH 8.2. В колбы с пшеничными отрубями и с пенополиуретаном добавляли по 50 мл буфера, с перлитом и с силикагелем – по 20 мл, с вермикулитом – по 35 мл, после чего помещали на орбитальную качалку (200 об/мин) на 60 мин.

Биомассу определяли весовым методом, высушивая ее при 86°C до постоянной массы и рассчитывали в мг на мл ферментационной среды. В случае ТФК биомассу рассчитывали как разницу между весом высушенной биомассы с носителем и самого носителя.

Получение препаратов внеклеточных протеиназ. Препараты протеиназ культуральной жидкости (КЖ) *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, выращенного глубинным или твердофазным способами, получали путем осаждения внеклеточных белков сульфатом аммония при 80%-ном насыщении. Осадок отделяли центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин при 4°C, растворяли в минимальном объеме 0.01 М аммоний-ацетатного буфера, pH 7.5, и диализовали в диализных мешках против этого же буфера при 4°C в течение 12 ч. Диализованный раствор белков центрифугировали в тех же условиях для удаления нерастворимой части осадка, замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Полученные препараты хранили при –20°C.

Изоэлектрофокусирование препаратов протеиназ. Для разделения протеолитических ферментов в полученных препаратах и изучения их качественного и количественного состава проводили изоэлектрофокусирование по методу Вестерберга при 4°C в градиенте pH амфолинов 3.5–10 и градиенте плотности сахарозы 0–40% в колонке объемом 110 мл фирмы “LKB” (Швеция) при напряжении 800 В в течение 36 ч [29]. В колонку вносили по 20–25 мг белка каждого препарата. По окончании изоэлектрофокусирования содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1.5 мл, в которых определяли поглощение белка при 280 нм, pH и протеолитическую активность.

Определение протеолитической активности. Активность протеиназ *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в КЖ при глубинном культивировании и элюате после твердофазного культивирования определяли

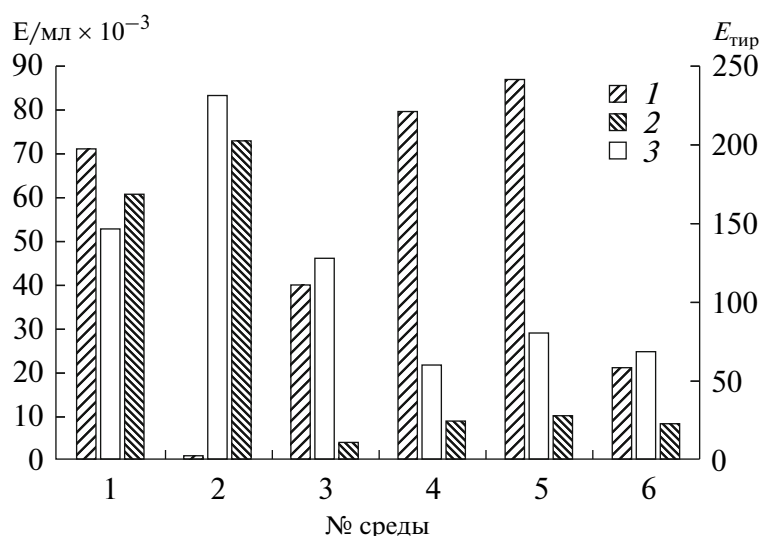


Рис. 1. Влияние источников азота на образование внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* VKM F-4104D. 1 – активаторная к протеину С активность, 2 – тромбиноподобная активность, 3 – общая протеолитическая активность.

после предварительного отделения биомассы фильтрованием.

Общую протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона [19] и выражали в мкмоль тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости ($E_{тир}$).

Активаторную к протеину С активность определяли по расщеплению хромогенного пептидного субстрата пироглутамил-L-пролил-L-аргинил-L-нитроанилида (pGlu-Pro-Arg-pNA), тромбиноподобную активность – по расщеплению тозил-L-глицил-L-пролил-L-аргинил-L-нитроанилида (Tos-Gly-Pro-Arg-NA) как описано нами ранее [6]. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Япония). За единицу активности (E) принимали количество мкмоль отщепившегося *n*-нитроанилина в 1 мл культуральной жидкости за 1 мин. В случае твердофазного культивирования активность протеиназ рассчитывали по формуле $E_{ТФК} = (A_{405}(V_c + V_6)K)/V_c$, где A_{405} – поглощение при 405 нм, V_c – объем среды, V_6 – объем добавленного для элюции буфера и K – коэффициент, рассчитанный по калибровочной кривой.

Определение белка. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд и спектрофотометрически, измеряя поглощение при 280 нм.

Электрофорез белков в ПААГ проводили по методу Дэвиса в трис-глициновом буфере, рН 8.3 [21] с концентрацией акриламида в верхнем концентрирующем геле 6.0% и в разделяющем нижнем – 7.5%. Для прокраски гелей использовали 0.08%-ный раствор кумасси бриллиантового синего G-250 в 3.5%-ной хлорной кислоте [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения влияния источников азота на образование протеиназ штаммом *A. ochraceus* VKM F-4104D при глубинном культивировании представлены на рис. 1. Активаторная к протеину С активность обнаружена на всех средах, содержащих белковые субстраты. Общую протеолитическую активность штамм проявлял как на средах с белковыми, так и неорганическим источником азота, причем максимальных значений она достигала на среде с нитратом натрия (среда № 2). Активаторная к протеину С активность у штамма на этой среде, напротив, практически отсутствовала. Добавление к среде с нитратом натрия белковых субстратов индуцировало образование протеиназ – активаторов протеина С (среда № 6). Максимальное ее значение было отмечено на среде № 5 с пептоном и гидролизатом рыбной муки и составило $86.6 \text{ E/мл} \times 10^{-3}$, что на 5.5 и 51.5% больше, чем на средах, содержащих эти компоненты по отдельности (№№ 3 и 4 соответственно) и на 18% больше, чем на исходной среде № 1 с тремя источниками белкового азота.

При культивировании *A. ochraceus* VKM F-4104D на изученных средах не наблюдали корреляции активаторной к протеину С, общей протеолитической и тромбиноподобной активности (рис. 1). Наибольших значений тромбиноподобная активность достигала на среде с минеральным источником азота (среда № 2), при этом активаторная к протеину С активность была минимальной. При глубинном культивировании *A. ochraceus* на среде № 1 время накопления максимальной тромбиноподобной, активаторной к протеину С и общей протеолитической активности не совпадали [6].

Таблица 1. Образование протеиназ – активаторов протеина *S. A. ochraceus* ВКМ F-4104D при ТФК

Субстрат/носитель	Количество питательной среды, мл/ г субстрата (носителя)	Продолжительность культивирования для проявления максимальной активности, сут	Активаторная к протеину С активность, Е/мл $\times 10^{-3}$	Продуктивность мицелия, Е/мг биомассы $\times 10^{-3}$
Пшеничные отруби	3	5	116.3	—*
Пенополиуретан	8	5	131.8	6.1
Перлит	3	7	90.6	6.5
Силикагель	1.5	4	200.0	15.8
Вермикулит	5	7	300.0	22.7

* Не определяли.

Влияние начального значения рН среды и температуры на образование протеиназ – активаторов протеина *S. A. ochraceus* ВКМ F-4104D было изучено на оптимальной для секреции этих ферментов среде (среда № 5). Наибольшая активаторная к протеину С активность у изучаемого микромицета наблюдалась при рН 6.0–7.0. При подкислении среды до рН 4.0 активаторная к протеину С активность снижалась в 3.5–4 раза, а при подщелачивании до рН 9.0 – в 1.5–2 раза. При рН 3.0 культура не проявляла активаторной к протеину С активности. Влияние температуры в интервале 24–32°C на секрецию изучаемого фермента было незначительным, а при температуре выше 32°C происходило снижение образования протеиназ – активаторов протеина С.

Таким образом, оптимальными условиями для образования активаторов протеина С микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D при глубинном культивировании (200 об/мин) была среда № 5 с пептоном и рыбным гидролизатом в качестве источников азота, исходное значение рН среды 6.5 и температура 28°C.

Условия, обеспечивающие максимальную секрецию микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D протеиназ с активаторной к протеину С активностью при глубинном культивировании, были использованы при твердофазном культивировании продуцента. Продолжительность культивирова-

ния и соотношение количества ферментационной среды и пшеничных отрубей или инертных носителей были установлены в предварительных опытах и приведены в табл. 1.

Образование протеиназ с активаторной к протеину С активностью культурой *A. ochraceus* ВКМ F-4104D происходило при его росте как на натуральном субстрате – пшеничных отрубях, так и на инертных носителях (табл. 1). Максимальные значения активности протеиназ – активаторов протеина С у изучаемого штамма наблюдали на вермикулите (300.0 Е/мл $\times 10^{-3}$ на 7 сут культивирования) и силикагеле (200.0 Е/мл $\times 10^{-3}$ на 4 сут). При выращивании *A. ochraceus* ВКМ F-4104D с использованием пенополиуретана активность фермента была несколько ниже (131.8 Е/мл $\times 10^{-3}$), а минимальная активность активаторов протеина С была при ТФК *A. ochraceus* ВКМ F-4104D на перлите и пшеничных отрубях – 90.6 Е/мл $\times 10^{-3}$ на 7 сут и 116.3 Е/мл $\times 10^{-3}$ на 5 сут соответственно. Однако, даже в этих случаях образование протеиназ – активаторов протеина С штаммом гриба было выше, чем при глубинном культивировании. Активаторная к протеину С активность при ТФК на силикагеле была в 2.3, а на вермикулите в 3.5 раза выше по сравнению с глубинным культивированием продуцента (табл. 1).

Продуктивность мицелия *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, рассчитанная на мг биомассы, также была значитель-

Таблица 2. Активаторная к протеину С и общая протеолитическая активность внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* ВКМ F-4104D при глубинном и твердофазном культивировании на вермикулите

Показатель	Глубинное культивирование		ТФК	
	культуральная жидкость	препарат протеиназ	культуральная жидкость	препарат протеиназ
Общий белок, мг/мл	17.9	15.4	37.3	24.5
Удельная активаторная к протеину С активность, Е/мг белка $\times 10^{-3}$	4.6	5.3	7.8	8.5
Удельная общая протеолитическая активность, $E_{\text{тип}}/\text{мг}$ белка	11.7	18.9	15.0	21.3

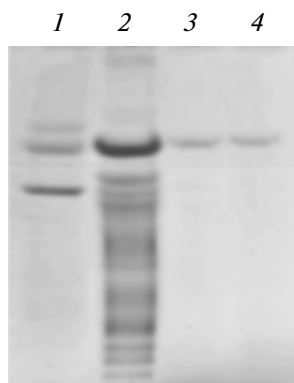


Рис. 2. Электрофорез внеклеточных белков микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. 1 – препарат белков, полученных при глубинном культивировании микромицета; 2 – препарат белков, полученных при твердофазном культивировании микромицета; 3 – протеиназа – активатор протеина С после ИЭФ препарата после глубинного культивирования; 4 – протеиназа – активатор протеина С после ИЭФ препарата после ТФК.

но выше в условиях ТФК. Так, при глубинном культивировании микромицета продуктивность составила $4.7 \text{ Е/мг} \times 10^{-3}$, а при ТФК оказалась в 1.3–4.8 раза выше, в зависимости от носителя (табл. 1).

В препарате протеиназ *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, полученном при ТФК на вермикулите, содержание белка было в 2 раза, а удельная общая протеолитическая и активаторная к протеину С активность оказались в 1.1 и 1.6 раза больше, соответственно, по сравнению с препаратом протеиназ, полученном при глубинном культивировании (табл. 2). Кроме того, как видно из рис. 2, при ТФК *A. ochraceus* ВКМ F-4104D секретирует большее

количество внеклеточных белков по сравнению с глубинным культивированием.

Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных белков, полученного при глубинном культивировании *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, выявило два пика с протеолитической активностью. Фракции белков пика 1 с рI 4.7–4.9 обладали общей протеолитической активностью. Белки пика 2 с рI 6.0–6.2 наряду с общей протеолитической активностью проявляли активаторную к протеину С и тромбиноподобную активность (рис. 3). В препарате внеклеточных протеиназ при ТФК было также два активных пика с рI 5.3–5.5 и 6.1–6.3. Протеиназы обоих пиков проявляли как общую протеолитическую, так и тромбиноподобную активности, а активаторную к протеину С активность наблюдали только во втором пике (рис. 4). Электрофоретический анализ фракций, проявивших активаторную к протеину С активность после изоэлектрофокусирования препаратов, полученных после глубинного и твердофазного культивирования, выявил в каждой из них по одной белковой зоне, обладавшей активаторной к протеину С активностью (рис. 2).

Интересно отметить, что по проявлению высокой тромбиноподобной активности с хромогенным пептидным субстратом Tos-Gly-Pro-Arg-pNA и значению рI в области рН 6.0–6.3 протеиназа – активатор протеина С микромицета *A. ochraceus* сходна с активатором протеина С из яда змеи *A. contortrix* [23].

Таким образом, установлено, что активаторная к протеину С активность внеклеточной протеиназы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D индуцируется белковыми субстратами в среде для культивирования. В препаратах внеклеточных белков *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, полученных как

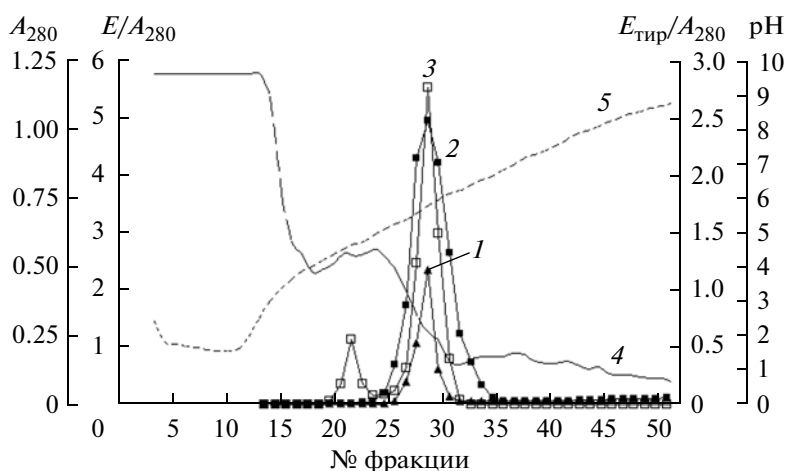


Рис. 3. Изоэлектрофокусирование комплексного препарата протеиназ *A. ochraceus* ВКМ F-4104D после глубинного культивирования. 1 – активаторная к протеину С активность, 2 – тромбиноподобная активность, 3 – общая протеолитическая активность, 4 – белок, 5 – рН.

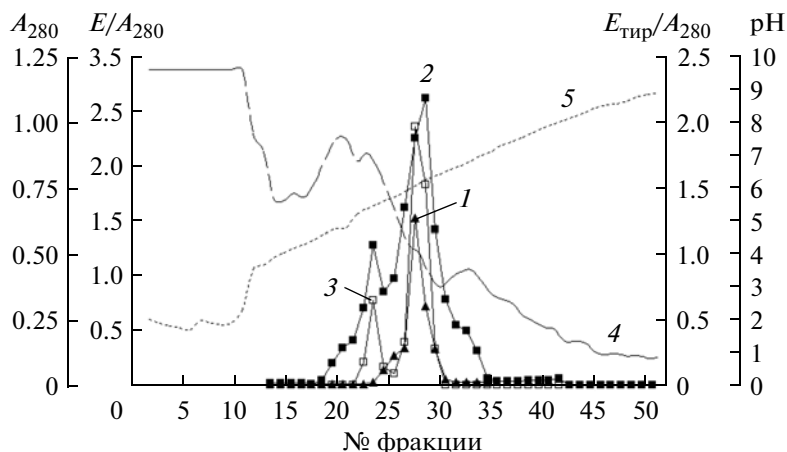


Рис. 4. Изоэлектрофокусирование комплексного препарата протеиназ *A. ochraceus* ВКМ F-4104D после ТФК на вермикулите. 1 – активаторная к протеину С активность, 2 – тромбиноподобная активность, 3 – общая протеолитическая активность, 4 – белок, 5 – pH.

при глубинном культивировании, так и при ТФК обнаружена протеиназа с активаторной к протеину С активностью с рI 6.0–6.3. Подобраны оптимальные условия культивирования микромицета для образования этого фермента: источник азота, температура, pH, для ТФК–носитель. Сравнение исследованных способов культивирования для получения внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С при выращивании *A. ochraceus* ВКМ F-4104D показало большую эффективность ТФК.

Авторы глубоко благодарны Ж.Д. Беспаловой (лаборатория синтеза пептидов отдела биотехнологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса (Москва)) за любезно предоставленные хромогенные субстраты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Струкова С.М. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1314–1331.
2. Dahlbäck B., Villoutreix B.O. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005. V. 25. № 7. P. 1311–1320.
3. Mosnier L.O., Zlokovich B.V., Griffin J.H. // Blood. 2007. V. 109. № 3. P. 3161–3172.
4. Gempeler-Messina P.M., Müller C. // Toxin Rev. 2006. V. 25. № 4. P. 335–349.
5. Stoker K., Fisher H., Meier J., Brogli M., Svedsen L. // Toxicon. 1987. V. 25. № 3. P. 239–252.
6. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 537–542.
7. Barrios-González J. // Process Biochem. 2012. V. 47. № 2. P. 175–185.
8. Pandey A., Selvakumar P., Socol C.R., Nigam P. // Current Science. 1999. V. 77. № 1. P. 149–162.
9. Hölker U., Höfer M., Lenz J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 64. P. 175–186.
10. Acuña-Argüelles M.E., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G., Favela-Torres E. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. V. 43. № 5. P. 808–814.
11. Renovato J., Rodríguez-Durán L.V., Rodríguez R., Aguilar C.N. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 165. № 1. P. 382–395.
12. Ключевская В.В., Егоров Н.С. // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 396–403.
13. Ландау Н.С., Кураков А.В., Гуликова О.М., Батомункуева Б.П., Струкова С.М., Егоров Н.С. // Микробиология. 1998. Т. 67. № 2. С. 215–220.
14. Jarai G., Buxton F. // Current Genetics. 1994. V. 26. P. 238–244.
15. Дунаевский Я.Е., Белякова Г.А., Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 3. С. 327–330.
16. Блilieва Р.К., Сафуани Ж.Е., Искакбаева Ж.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 2. С. 213–216.
17. Кудрявцева Н.Н., Гвоздева Е.Л., Софьин А.В., Валуйева Т.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 3. С. 355–362.
18. Батомункуева Б.П., Егоров Н.С. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 602–606.
19. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Буяк Л.И., Крейер В.Г. // Микробиология. 1991. Т. 60. № 4. С. 637–643.
20. Vesterberg O. // Biochem. Biophys. Acta. 1972. V. 257. № 1. P. 11–19.
21. Davis B.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1946. V. 121. № 2. P. 404–427.
22. Holbrook I.B., Leaver A.G. // Anal. Biochem. 1976. V. 75. № 2. P. 634–636.
23. Orthner C.L., Brattacharia P., Strickland D.K. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 7. P. 2558–2564.

Production of Extracellular Proteinases (Protein C Activators in Blood Plasma) by the Micromycete *Aspergillus ochraceus* during Submerged and Solid-State Cultivation

A. A. Osmolovskii^a, V. G. Kreier^a, N. A. Baranova^a, A. V. Kurakov^a, and N. S. Egorov^b

^a Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^b International Biotechnological Center, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

e-mail: aosmol@mail.ru

Received

Abstract—The conditions for the submerged and solid-state cultivation of the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D, producing extracellular proteinases that activate protein C in human blood plasma, were optimized. It is shown that the protein C-activating activity of the micromycete in a solid-state culture was 1.5–3.5 times higher than in a submerged culture (as calculated per milliliter of culture medium). Among the extracellular proteins secreted by *A. ochraceus* VKM F-4104D during submerged and solid-state cultivation, a protein C-activating proteinase with a pI of 6.0–6.3 was identified.