

Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии

Скрининг протеолитических ферментов алкалофильных и алкалотолерантных грибов

Выпускная квалификационная бакалаврская работа
студентки 4-го курса
Покровской Ю.С.

Руководители:
д.б.н., профессор
Кураков А.В.
д.б.н., профессор
Дунаевский Я.Е.

Цель работы: изучение спектра секретируемых в щелочных условиях протеаз алкалофильными и алкалотолерантными грибами, выявление наиболее активных продуцентов этих ферментов и определение оптимальных значений pH и температуры для их образования, а также отбор наиболее перспективных продуцентов для дальнейших исследований.

Задачи:

- 1) Определение общей протеолитической активности;
- 2) Измерение специфических протеолитических активностей по хромогенным субстратам;
- 3) Измерение pH и температурного оптимума протеаз у отобранных штаммов, а также оценка их стабильности при различных условиях (pH и температура).

Объекты исследования

12 штаммов 6 видов микромицетов, выделенных из щелочных почв, грунтов и содовых озер из коллекции кафедры микологии и альгологии (Grum-Grzhimaylo et al., 2015):

отд. Ascomycota, п/отд. Pezizomycotina

кл. Sordariomycetes, п/кл. Sordariomycetidae

сем. Plectosphaerellaceae

Sodiomyces alkalinus (3 штамма)

Sodiomyces magadii (1 штамм)

Chordomyces antarcticum (3 штамма)

Verticillium zaregamsianum (2 штамма)

Gibellulopsis nigrescens (1 штамм)

} облигатные алкалофилы

} факультативные
алкалофилы

} сильный алкалотолерант

п/кл. Hypocreomycetidae, пор. Hypocreales,

сем. Hypocreaceae

Acrostalagmus luteoalbus (2 штамма)

} факультативный
алкалофил

Методы исследования



Получение культуральной жидкости для определения активности внеклеточных протеаз

- Мицелий предварительно наращивали на чашках Петри на щелочном мальт-агаре (pH 10,5) в течение 7-10 суток



- Агаровые блоки с мицелием переносили на ферментационную жидкую среду с казеином (1%) и бикарбонатным буфером (pH 10,2)



- Колбы помещали на орбитальную качалку (200 об/мин) и проводили культивирование при 25°C в течение 7 суток



- Мицелий отделяли фильтрованием с последующим центрифугированием (20000 g в течение 6-8 мин)



- Активность протеаз измеряли в культуральной жидкости (КЖ) (Образцы КЖ хранили при -20°C)

Методы исследования

- ➔ Измерение общей протеолитической активности по азоказеину (при pH 9,5)
Оценка специфической протеолитической активности по синтетическим пара-нитроанилидным субстратам

для *эндопептидаз*: GlpAALpNA, GlpFpNA, BzRpNA, GlpFApNA

для *экзопептидаз*: LpNA, FpNA, EpNA, APpNA, GPpNA, RPpNA



Отбор наиболее активных продуцентов с широким спектром секретируемых протеаз



- ➔ Определение классов протеаз с помощью ингибиторного анализа
EDTA - ингибитор металлопротеиназ, PMSF – ингибитор сериновых протеиназ, йодацетамид – ингибитор цистеиновых протеиназ

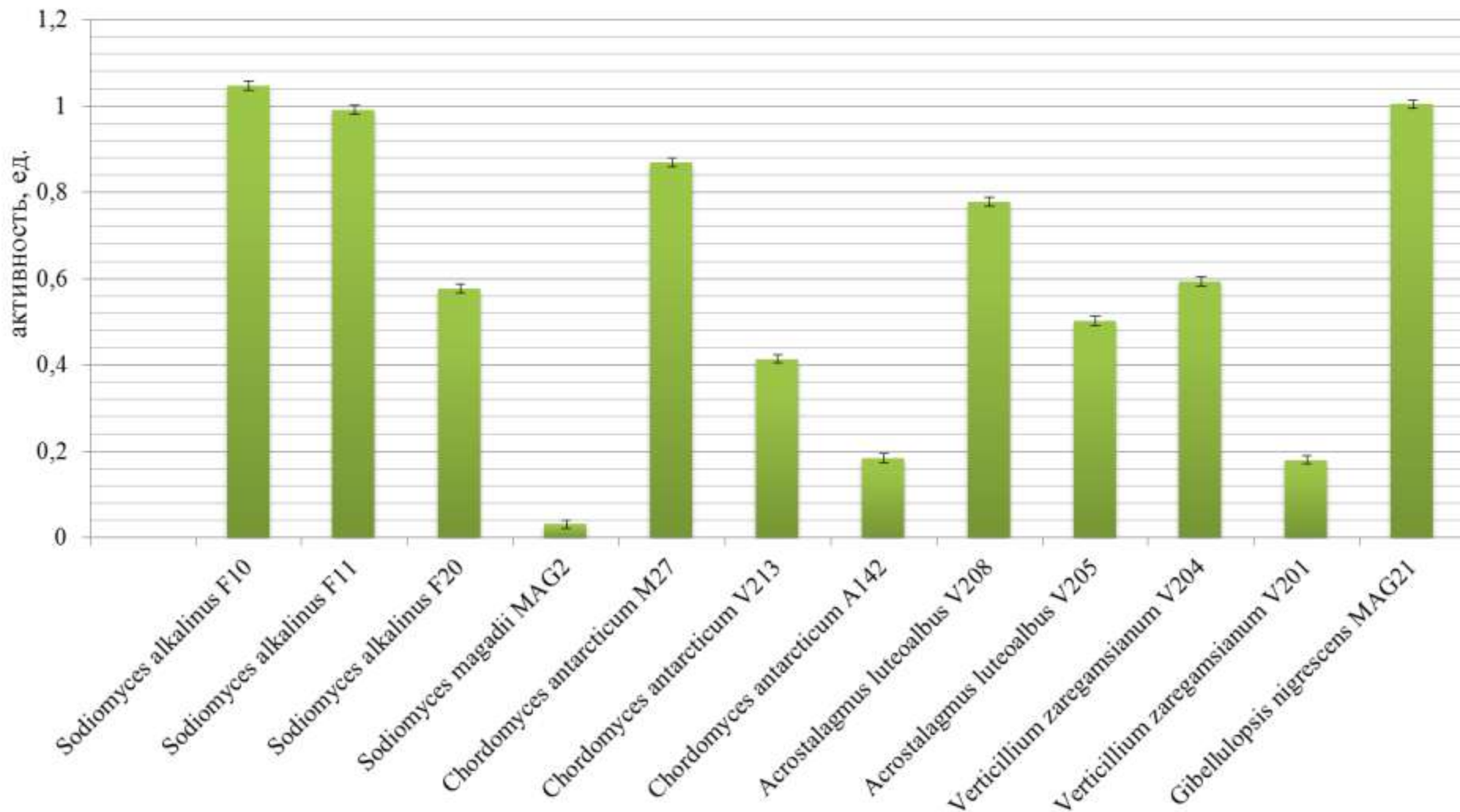
- ➔ Определение стабильности протеаз при разных pH и оптимального значения pH для проявления их активности

0,1 М натрий-ацетатный и фосфат-боратный буферы (pH 3-11)

- ➔ Определение термостабильности и температурного оптимума протеаз в культуральной жидкости

0,1 М бикарбонатный буфер (pH 9,5) при 30-80°C

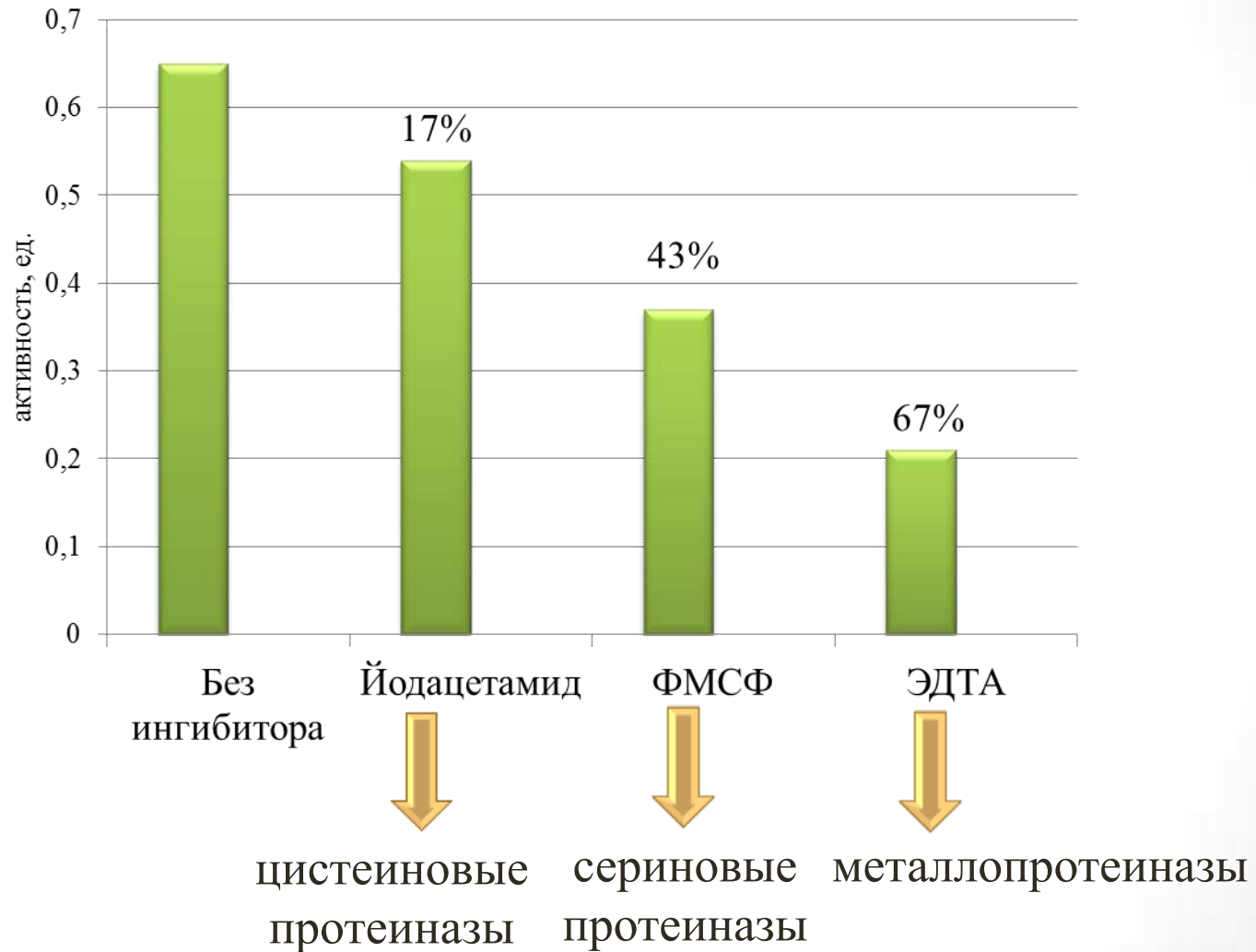
Общая протеолитическая активность



Штамм	Активность (ед.)/Субстраты			
	Трипсиновая	Химотрипсиновая	Субтилизиноподобная	Цистеиновая
	BzRpNA	GlpFpNA	GlpAALpNA	GlpFApNA
<i>Sodiomyces alkalinus</i> F10	0	0	0,14	0,28
<i>Sodiomyces alkalinus</i> F11	0	0	0,23	0,20
<i>Sodiomyces alkalinus</i> F20	0	0	0,09	0,10
<i>Chordomyces antarcticum</i> M27	0	0,03	0,29	0,17
<i>Chordomyces antarcticum</i> V213	0,02	0,03	0,06	0,15
<i>Chordomyces antarcticum</i> A142	0,03	0,06	0,06	0,09
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> V205	0,04	0	0	0,23
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> V208	0	0	0,11	0,25
<i>Verticillium zaregamsianum</i> V201	0	0	0	0,22
<i>Verticillium zaregamsianum</i> V204	0	0	0,24	0,30
<i>Sodiomyces magadii</i> MAG2	0,03	0	0,03	0,07
<i>Gibellulopsis nigrescens</i> MAG21	0,06	0	0,34	0,26

Штамм	Активность (ед.)/Субстраты					
	Аминопептидазная			Дипептидил-пептидазная		
	LFpNA	LEpNA	LpNA	APpNA	GPpNA	RPpNA
<i>Sodiomyces alkalinus</i> F10	0,20	0,03	0,61	0,51	0,83	0,23
<i>Sodiomyces alkalinus</i> F11	0,07	0	0,59	0,42	0,71	0,05
<i>Sodiomyces alkalinus</i> F20	0,04	0	0,52	0,54	0,84	0,28
<i>Chordomyces antarcticum</i> M27	0	0,06	0,44	0,53	0,79	0,25
<i>Chordomyces antarcticum</i> V213	0,06	0,08	0,63	0,49	0,82	0,19
<i>Chordomyces antarcticum</i> A142	0,04	0,14	0,63	0,42	0,79	0,09
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> V205	0,02	0	0,51	0,42	0,73	0,15
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> V208	0,03	0	0,57	0,48	0,77	0,19
<i>Verticillium zaregamsianum</i> V201	0,28	0	0,59	0,54	0,79	0,18
<i>Verticillium zaregamsianum</i> V204	0,45	0	0,68	0,55	0,81	0,21
<i>Sodiomyces magadii</i> MAG2	0,07	0	0,19	0,35	0,94	0,07
<i>Gibellulopsis nigrescens</i> MAG21	0,05	0,02	0,58	0,57	1,06	1,06

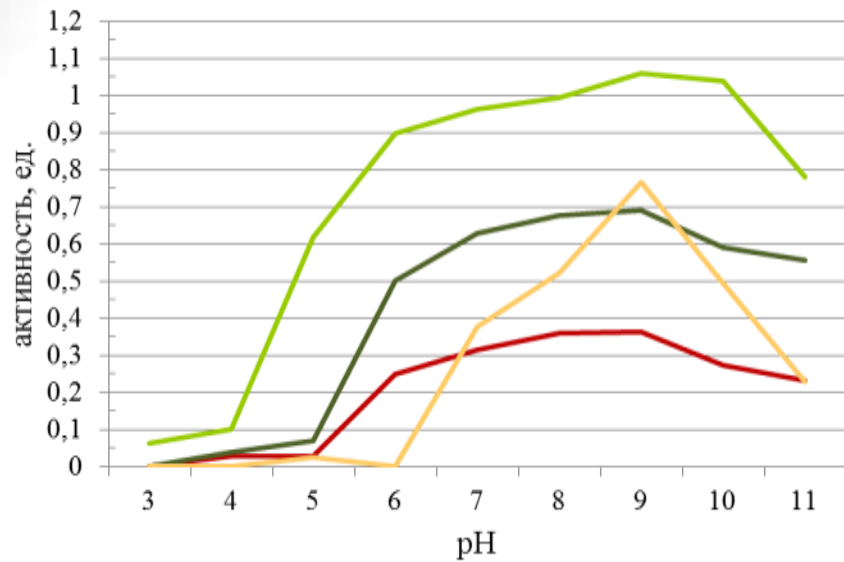
Влияние специфических ингибиторов протеиназ на общую протеолитическую активность *C. antarcticum* V213



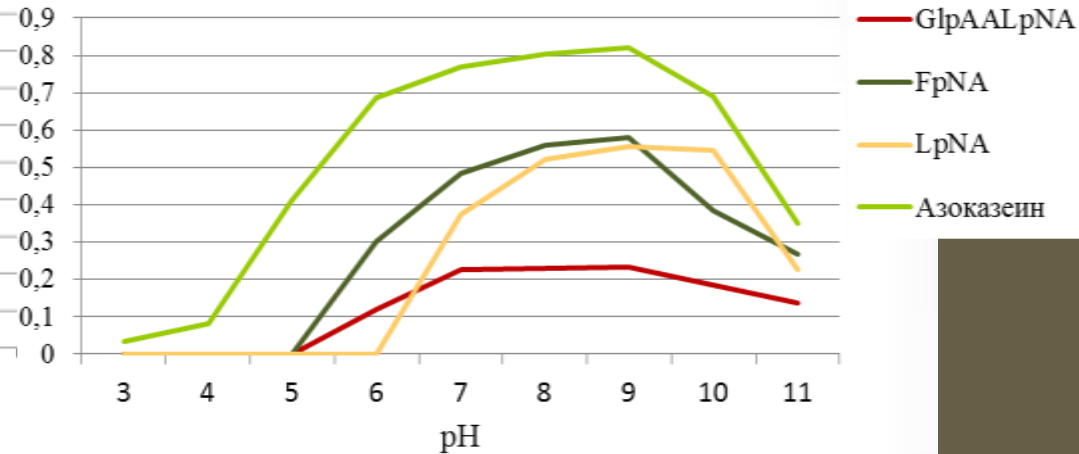
рН оптимум

Стабильность при различных рН

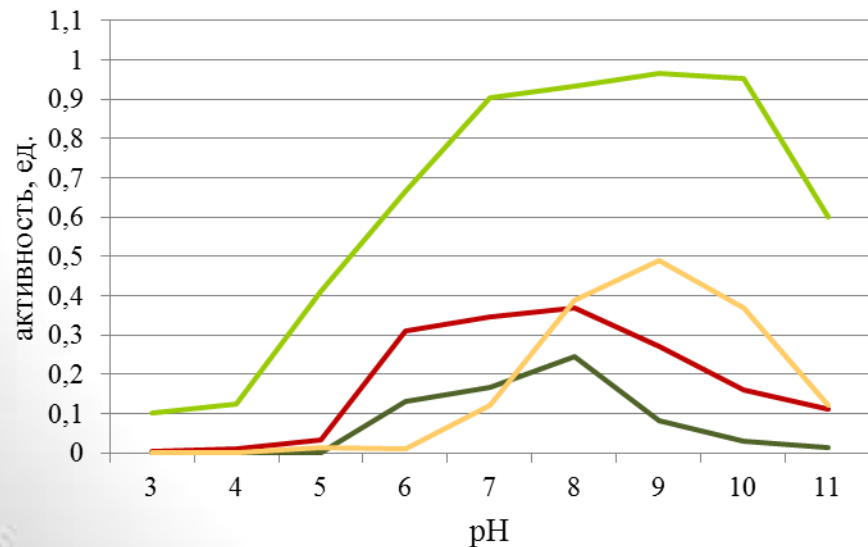
Sodiomyces alkalinus F10



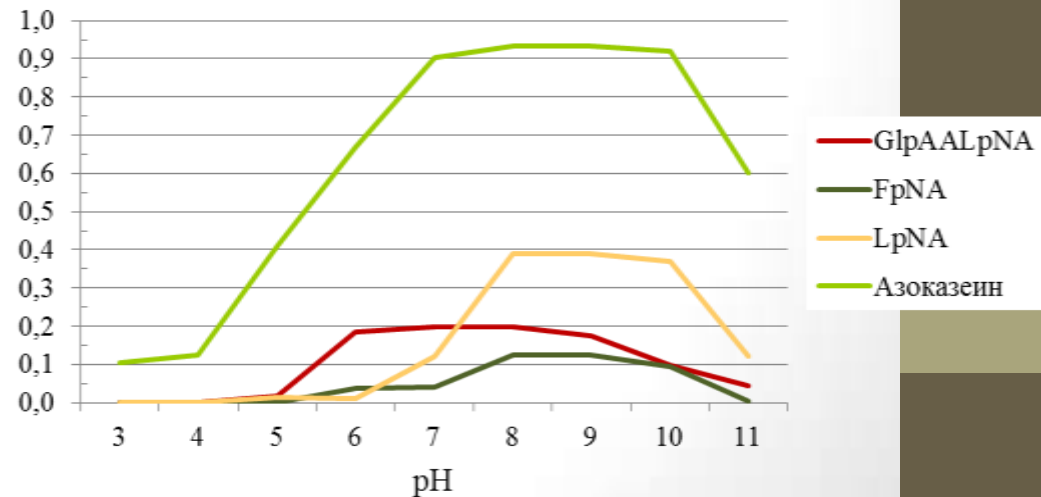
Sodiomyces alkalinus F10



Gibellulopsis nigrescens MAG21

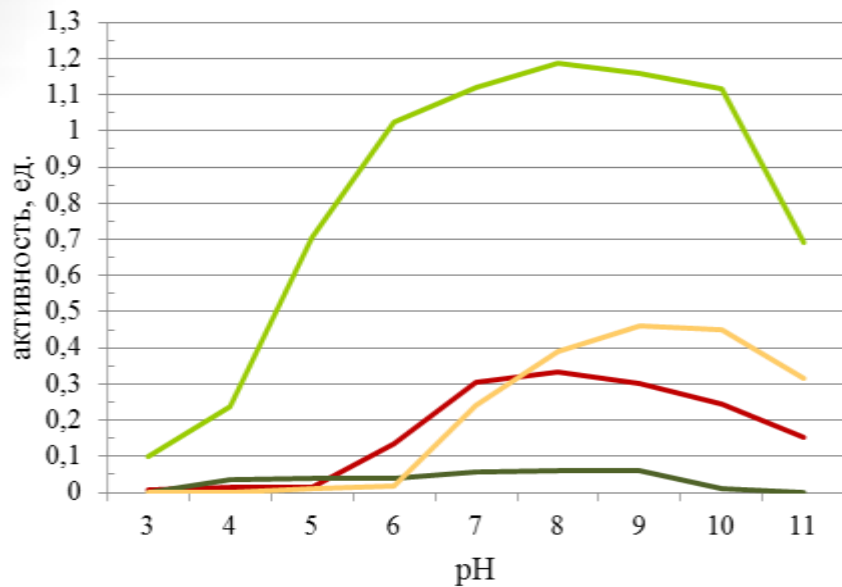


Gibellulopsis nigrescens MAG21

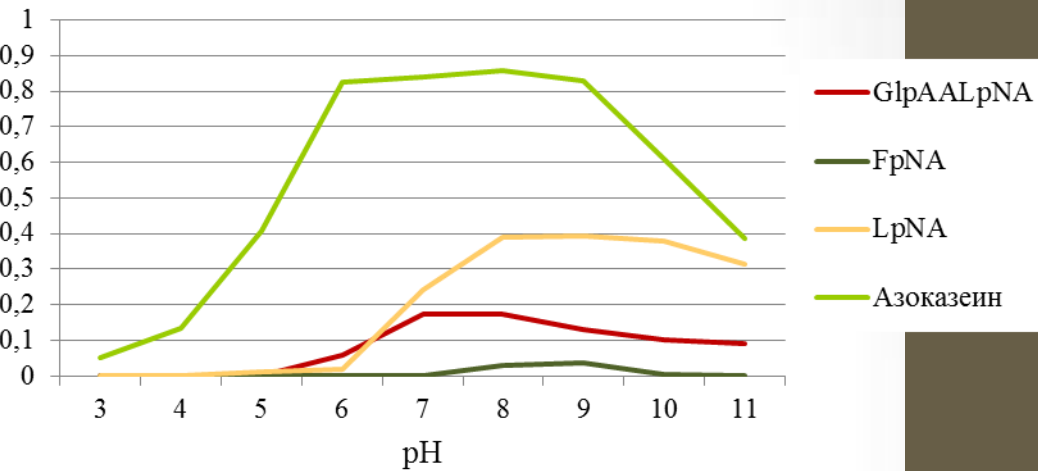


рН оптимум

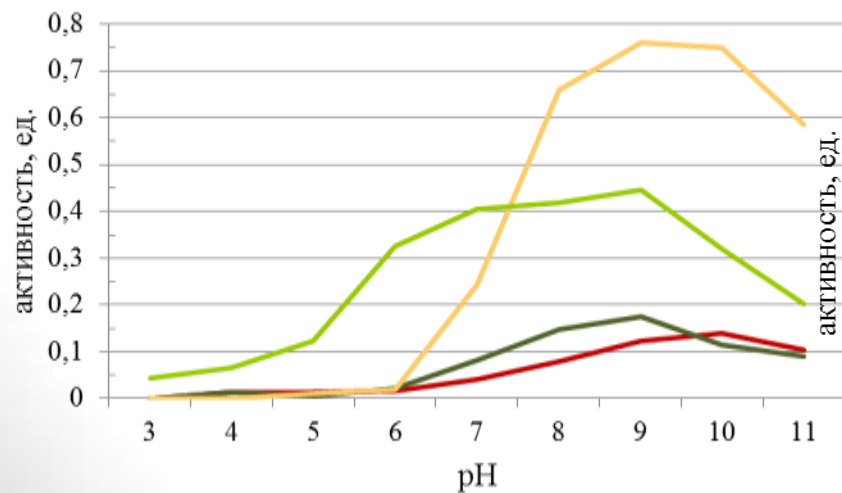
Chordomyces antarcticum M27



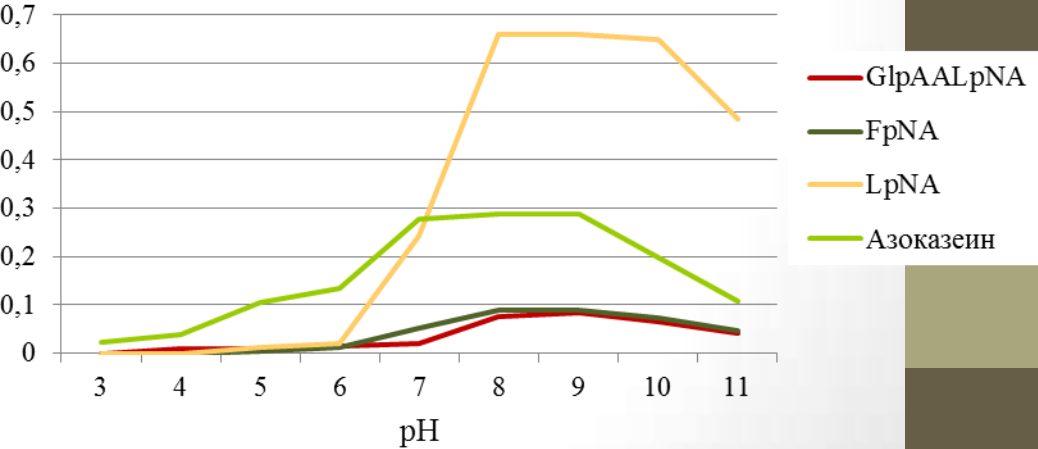
Chordomyces antarcticum M27



Chordomyces antarcticum V213

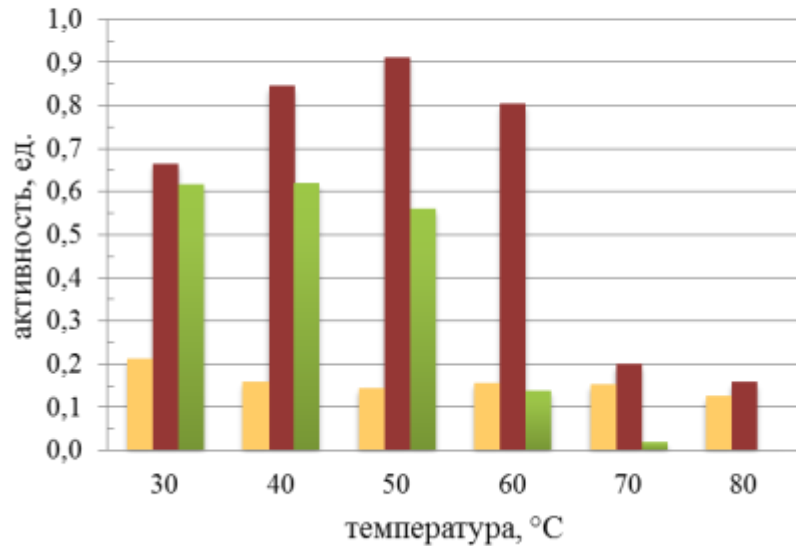


Chordomyces antarcticum V213

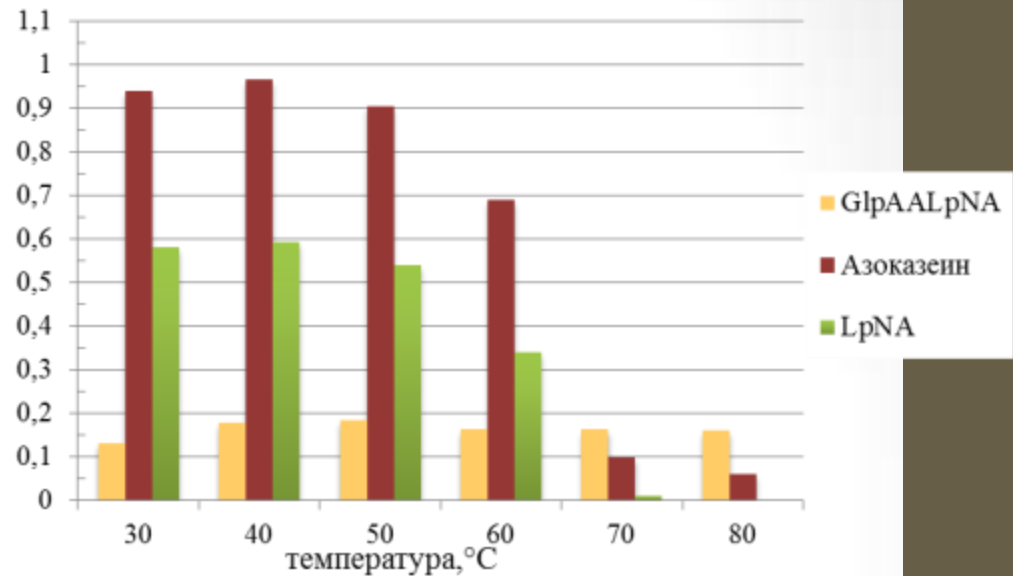


Температурный оптимум внеклеточных протеаз

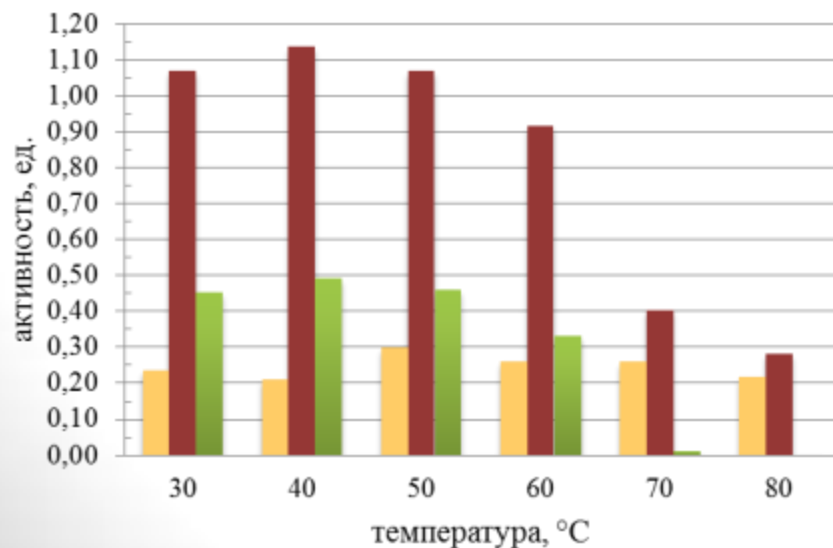
Sodiomyces alkalinus F10



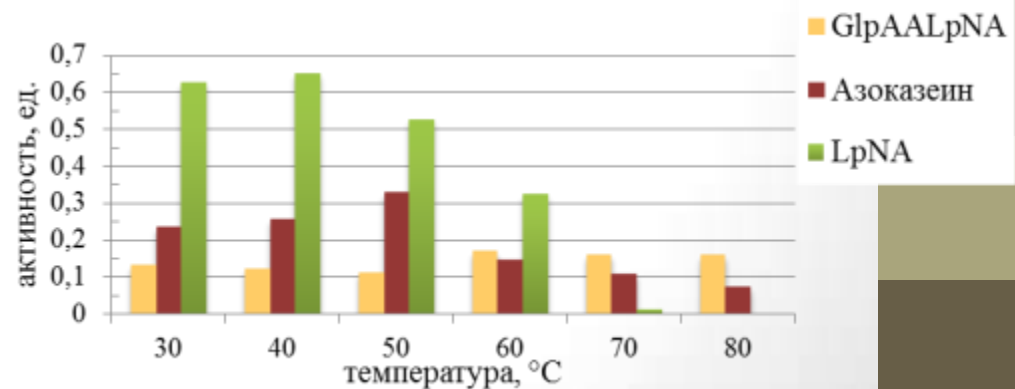
Gibellulopsis nigrescens MAG21



Chordomyces antarcticum M27

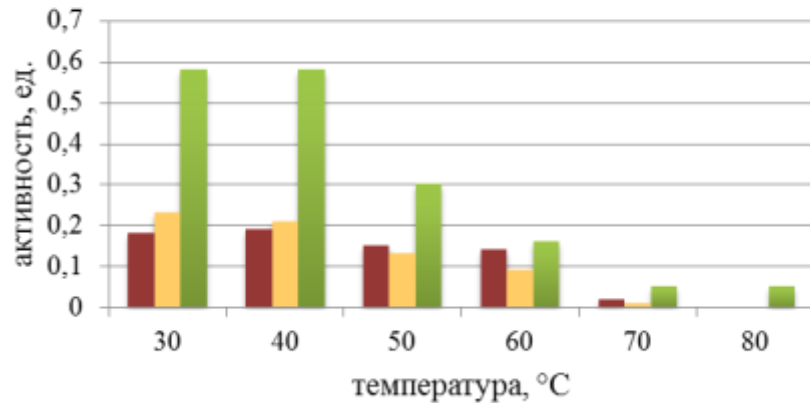


Chordomyces antarcticum V213

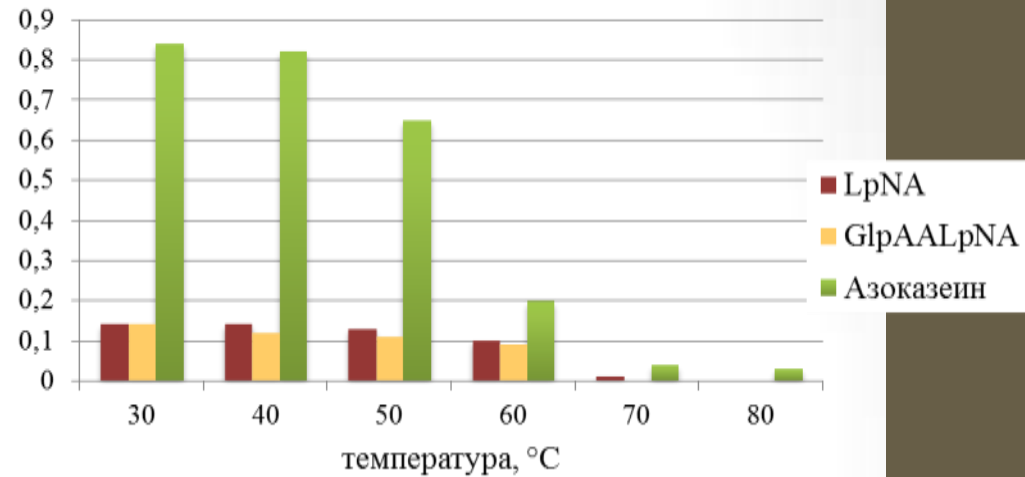


Температурная стабильность

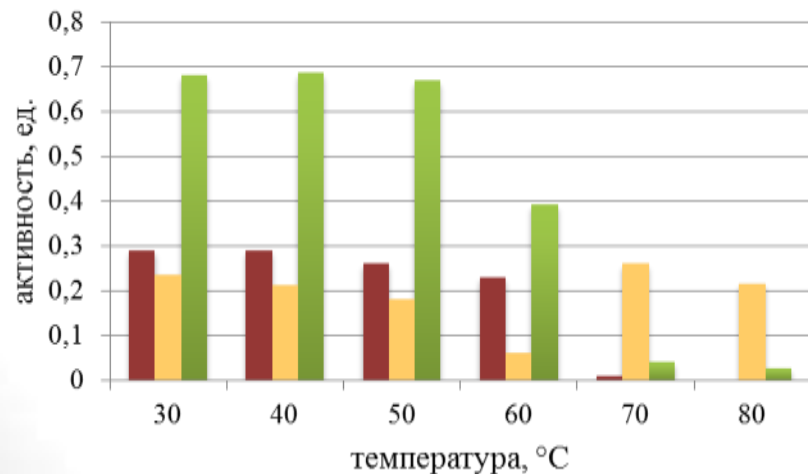
Sodiomyces alkalinus F10



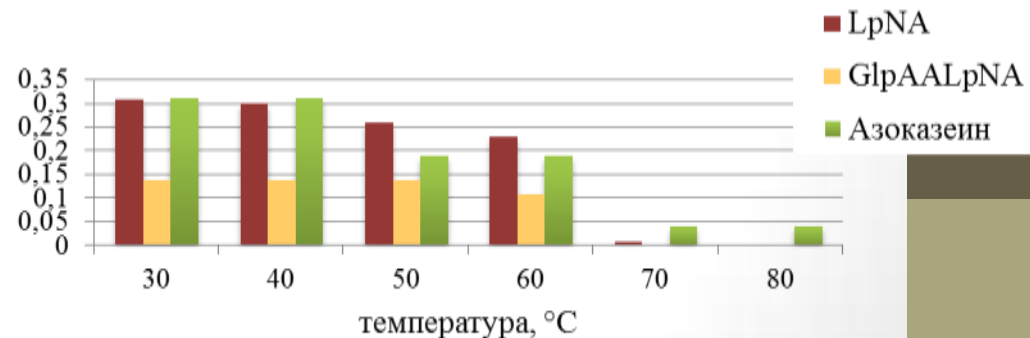
Gibellulopsis nigrescens MAG21



Chordomyces antarcticum M27



Chordomyces antarcticum V213



Выводы

- 1) Среди 12-ти изолятов алкалофильных микромицетов выявлены штаммы, обладающие высокой общей и специфической протеолитическими активностями, в частности, металлопротеазной, субтилизиноподобной, дипептидил-пептидазной и аминопептидазной. У представителей *S. alkalinus*, *A. luteoalbus*, *V. zaregamsianum* и *G. nigrescens* обнаружена крайне редкая для грибов активность цистеиновых протеиназ.
- 2) На основании ингибиторного анализа у *C. antarcticum* M27 установлено, что металлопротеиназы вносят основной вклад в проявление протеолитической активности данного штамма в щелочных условиях.
- 3) Значения pH оптимумов и стабильности протеолитических ферментов коррелируют с экофизиологическими особенностями исследуемых алкалофильных и алкалотолерантных грибов
- 4) Отобраны перспективные штаммы алкалофилов *S. alkalinus* F10, *G. nigrescens* MAG21, *C. antarcticum* M27 и V213, внеклеточные протеазы которых стабильны в диапазоне pH от 6-7 до 9-10 и диапазоне температур 30-50 °C.

Спасибо за внимание!

Благодарности

Выражаю благодарность моим научным руководителям: Александру Васильевичу Куракову и Якову Ефимовичу Дунаевскому за помощь в подготовке дипломной работы и осмыслении результатов; Елене Николаевне Биланенко за предоставление использованных в работе штаммов, а также за помощь в работе с данными культурами; Ольге Александровне Кудрявцевой за курирование практической части работы и помощь в оформлении результатов; Александру Андреевичу Осмоловскому за оказание экстренной помощи, а также всем сотрудникам кафедры микологии и альгологии за поддержку и понимание.