#### Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова



# Воздействие внеклеточных протеиназ мукоровых грибов на белки системы гемостаза человека

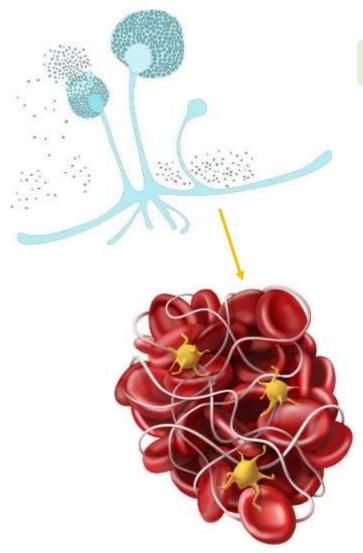
#### Выполнила:

Богуш М. А., студентка 4-го курса, каф. микологии и альгологии

#### <u>Руководители</u>:

д. б. н., зав. кафедрой Кураков А. В., к. б. н., доцент Осмоловский А. А.

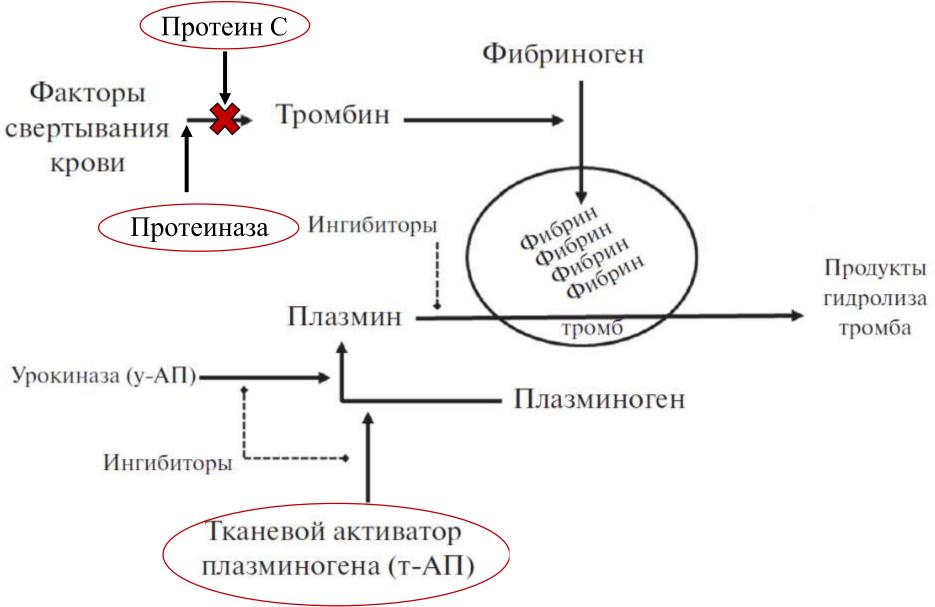
### Актуальность



- Востребованность фибринолитических агентов с высокой активностью и минимальными побочными эффектами в медицине;
- Необходимость изучения **мукоровых грибов** в качестве продуцентов протеиназ в силу недостаточного объёма данных;
  - Zygorhynchus vuilleminii и Z. japonicus, их **протеиназы** слабо работают при значении рН 6,5 7,0 (Abdel-Rahman et al., 1990);
  - Rhizopus chinensis 12, металлопротеиназа, стабильна при нейтральном pH, max активность при pH 10,5 и температуре 45°C (Xiao-lan and Lian-xiang, 2005);
  - *Rhizomucor miehei* показывает фибринолитическую активность с оптимумом при pH 8.0-8.5 и температуре  $45^{\circ}$ C (Ali and Ibrahim, 2008);
  - Rhizopus microsporus var. tuberosus, фермент стабилен при значениях pH в диапазоне 6,0 8,0 и температуре 37°C (Zhang et al., 2015);
  - *Mucor subtilissimus* UCP 1262, **сериновая протеиназа** с максимумом активности при 40°C (Sharma et al., 2021)







#### Цель и задачи

<u>Цель работы</u>: изучение способности мукоровых грибов продуцировать внеклеточные протеиназы, действующие на белки системы гемостаза человека.

#### Задачи работы:

- ✓ Провести первичный и вторичный скрининг штаммов с фибринолитической и коагулазной активностями среди представителей отдела Mucoromycota
- ✓ Выявить продуцентов искомых ферментов и изучить у наиболее активного штамма динамику накопления фибринолитических протеиназ.

### Материалы и методы

WORLD STAIN OF THE PARTY OF THE

Было использовано 23 штамма мукоровых грибов из коллекции кафедры микологии и альгологии.

	Absidia corymbifera $\it 1ae$		
	Absidia glauca 2 ae		
	Absidia spinosa 3ae	Cuppinghamellaceae	
	Cunninghamella echinulata 4ae	Cunninghamellaceae	
	Cunninghamella elegans 5a8		
	Gongronella butleri 6a8		
	Actinomucor elegans 7a8		
	Mucor circinans 8ae		
	Mucor hiemalis 9ae		
	Mucor plumbeus 10ae	Mucoraceae	
	Mucor racemosus 11ae		
	Zygorhynchus moelleri 12ae		
	Mycotypha microspora 13ав	Mycotyphaceae	
	Rhizopus arrhizus 14ae		
	Rhizopus nigricans 15ae	Rhizopodaceae	
	Rhizopus stolonifer 16ae		
	Circinella umbellate T/ae	Ī	
	Syncephalastrum racemosum 18ae	Syncephalastraceae	
	Thamnostylum piriforme 19ae		
	Umbelopsis angularis 20ae		
	Umbelopsis isabellina 21ae	Umbelopsidaceae	
	Umbelopsis ramanniana 22ae		
	Mortierella polycephala 23aв	Mortierellaceae	

Mucorales

Mortierellales

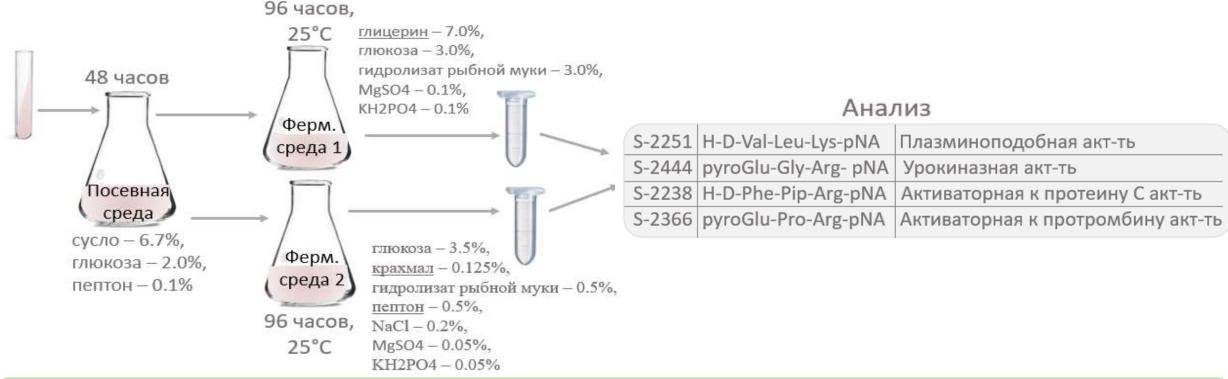
### Материалы и методы. Этапы работы

1 Первичный скрининг

Отбор штаммов по активности расщепления казеина, фибрина и свёртывания плазмы.

2 Вторичный скрининг

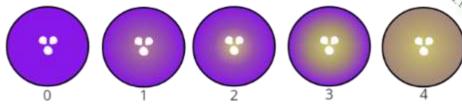
Отбор штаммов по активности со специфическими субстратами и максимальному накоплению внеклеточных белков.



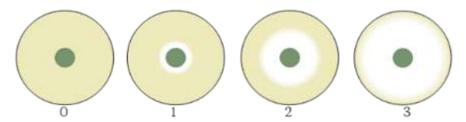
3 Исследование динамики накопления ферментов с прямыми и активаторными активностям Культивирование проводили в трёх повторностях.

## Результаты. Первичный скрининг

	Креатин	Казеин	Фибрин	Коагул.
Absidia spinosa	2	3	2	1
Actinomucor elegans	1	1	2	2
Cunninghamella echinulata	1	0	2	2
Cunninghamella elegans	3	1	2	0
Syncephalastrum racemosum	4	2	2	1
Zygorhynchus moelleri	4	1	2	0
Mucor plumbeus	4	2	1	3
Thamnostylum piriforme	0	3	0	3
Absidia corymbifera	1	3	0	3
Absidia glauca	4	3	1	0
Circinella umbellata	0	3	0	0
Gongronella butleri	2	3	1	2
Mortierella polycephala	4	3	1	0
Mucor circinans	0	2	0	2
Mucor hiemalis	0	2	0	0
Mucor racemosus	0	1	0	1
Mycotypha microspora	0	3	0	1
Rhizopus arrhizus	4	3	1	0
Rhizopus nigricans	0	3	0	0
Rhizopus stolonifer	3	3	0	0
Umbelopsis angularis	3	1	0	0
Umbelopsis isabellina	2	3	0	0
Umbelopsis ramanniana	3	3	0	0



CREA-среда: шкала оценки закисления среды.



Казеиновая среда: шкала оценки степени гидролиза белка.



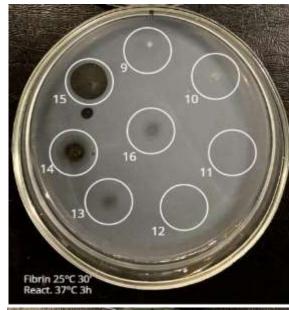
- 2 фибрин полностью гидролизован
- 1 фибрин гидролизован, но не до конца
- 0 фибрин не гидролизован

MONON

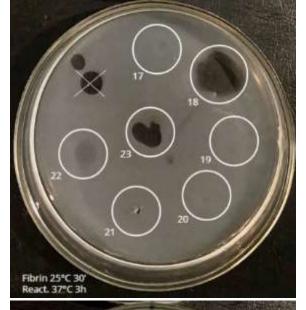
## Результаты. Первичный скрининг

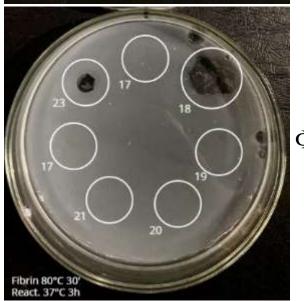












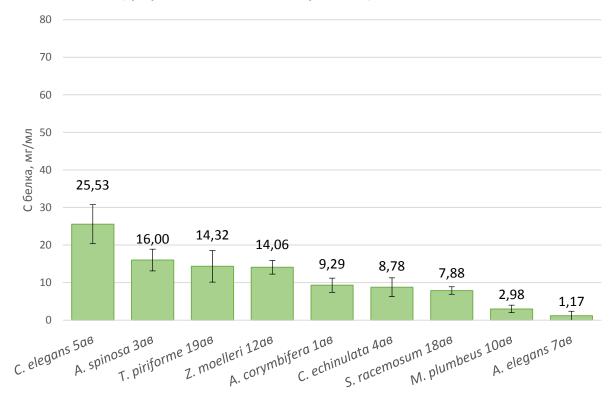


Активирующая плазминоген активность

Фибринолитическая активность

## Концентрация белка в культуральных жидкостях у отобранных штаммов

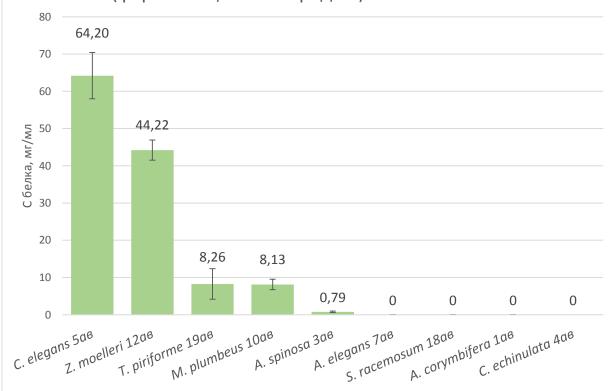
Содержание белка в культуральной жидкости отобранных штаммов мукоромицетов (ферментационная среда 1)



**Ферментационная среда 1** (%): <u>глицерин</u> – 7.0, глюкоза – 3.0, <u>гидролизат рыбной муки</u> – 3.0, MgSO4 – 0.1,KH2PO4 – 0.1.



Содержание белка в культуральной жидкости отобранных штаммов мукоромицетов (ферментационная среда 2)

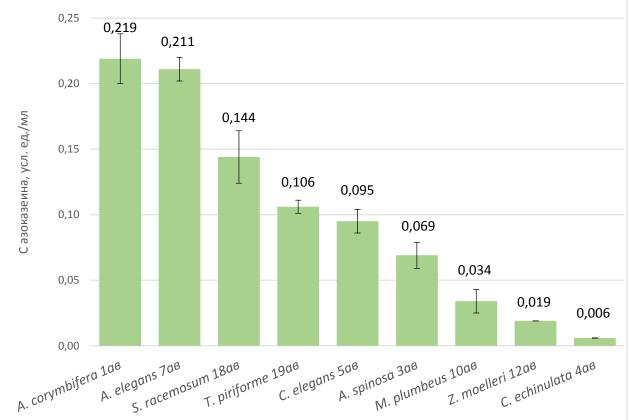


**Ферментационная среда 2** (%): глюкоза -3.5, крахмал -0.125, гидролизат рыбной муки -0.5, пептон -0.5, NaCl -0.2, MgSO4 -0.05, KH2PO4 -0.05.

#### Общая протеолитическая активность штаммов

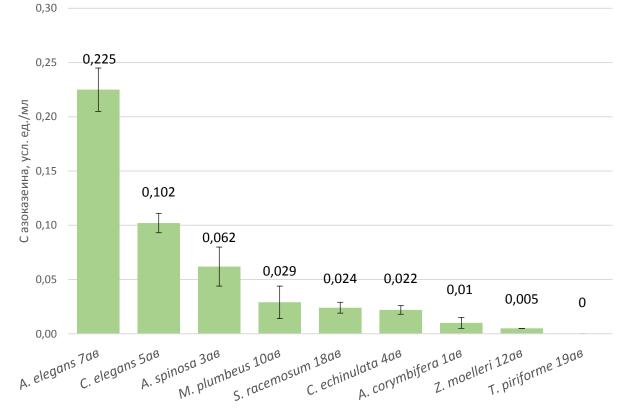


Азоказеинолитическая активность штаммов мукоромицетов при культивировании на ферментационной среде 1



**Ферментационная среда 1** (%): <u>глицерин</u> -7.0, глюкоза -3.0, <u>гидролизат рыбной муки</u> -3.0, MgSO4 -0.1, KH2PO4 -0.1.

Азоказеинолитическая активность штаммов мукоромицетов при культивировании на ферментационной среде 2



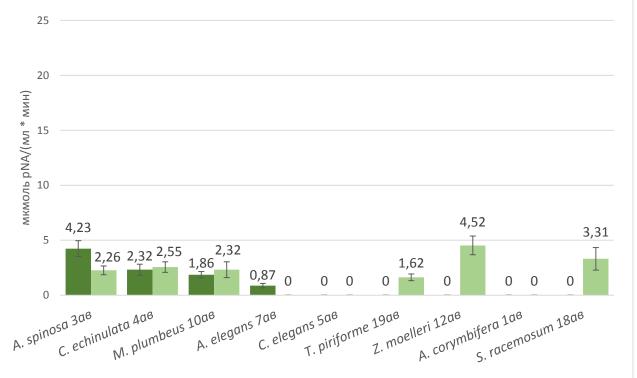
**Ферментационная среда 2** (%): глюкоза -3.5, крахмал -0.125, гидролизат рыбной муки -0.5, пептон -0.5, NaCl -0.2, MgSO4 -0.05, KH2PO4 -0.05.

## Плазминоподобная и урокиназная активность у отобранных штаммов мукоромицетов

4)

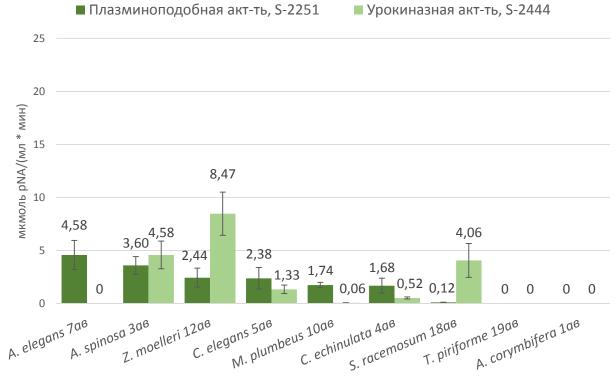
Плазминоподобная (S-2251) и урокиназная (S-2444) активность внеклеточных протеиназ, образуемых мукоромицетами (ферментационная среда 1, 4-е сутки)

■ Плазминоподобная акт-ть, S-2251 ■ Урокиназная акт-ть, S-2444



**Ферментационная среда 1** (%): <u>глицерин</u> -7.0, глюкоза -3.0, <u>гидролизат рыбной муки</u> -3.0, MgSO4 -0.1, KH2PO4 -0.1.

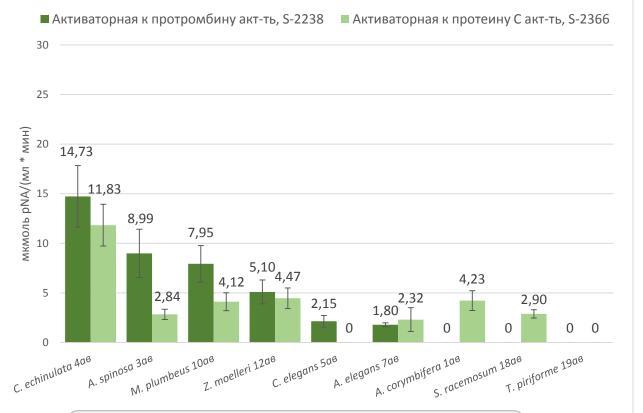
Плазминоподобная (S-2251) и урокиназная (S-2444) активность внеклеточных протеиназ, образуемых мукоромицетами (ферментационная среда 2, 4-е сутки).



**Ферментационная среда 2** (%): глюкоза – 3.5, крахмал – 0.125, <u>гидролизат рыбной муки</u> – 0.5, <u>пептон</u> – 0.5, NaCl – 0.2, MgSO4 – 0.05, KH2PO4 – 0.05.

### Активаторные к протромбину и протеину С активности у отобранных штаммов мукоромицетов

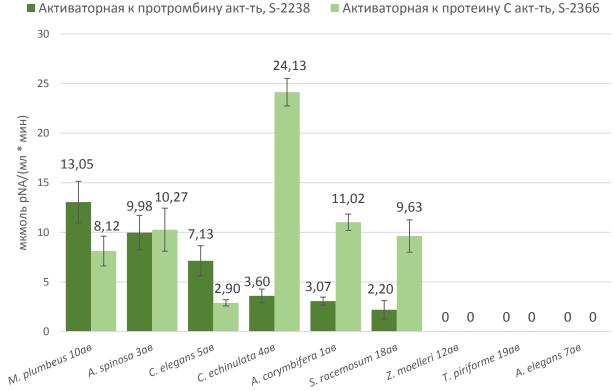
Активность с субстратами тромбина (S-2238) и протеина C (S-2366) активность протеиназ, образуемых мукоромицетами (ферм. среда 1, 4-е сутки)



Ферментационная среда 1 (%): глицерин – 7.0, глюкоза -3.0, гидролизат рыбной муки -3.0, MgSO4 -0.1,KH2PO4 - 0.1.

Активность с субстратами тромбина (S-2238) и протеина C (S-2366) активность протеиназ,

образуемых мукоромицетами (ферм. среда 2, 4-е сутки)

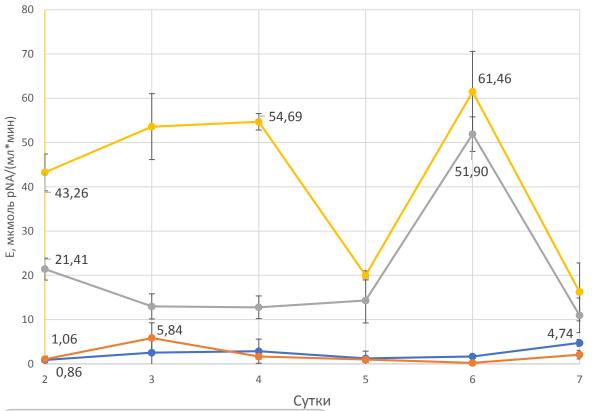


**Ферментационная среда 2** (%): глюкоза – 3.5, -0.5, NaCl -0.2, MgSO4 -0.05, KH2PO4 -0.05.

## Динамика накопления фибринолитических и активаторных ферментов штаммом Cunninghamella echinulata 4aв

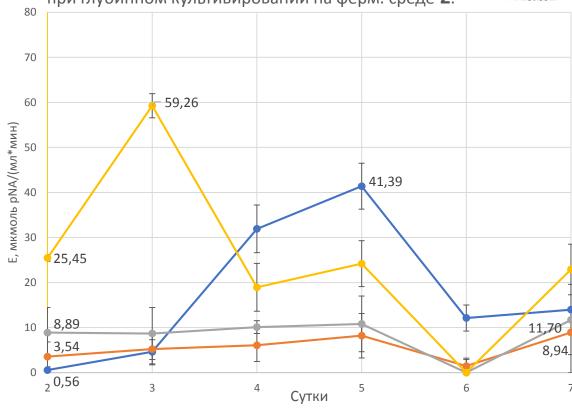
Динамика накопления протеолитических ферментов штаммом *C. echinulata* 4ав





Динамика накопления протеолитических ферментов штаммом *C. echinulata* 4ав





**Ферментационная среда 1** (%): <u>глицерин</u> – 7.0, глюкоза – 3.0, <u>ГРМ</u>– 3.0, MgSO4 – 0.1,KH2PO4 – 0.1.

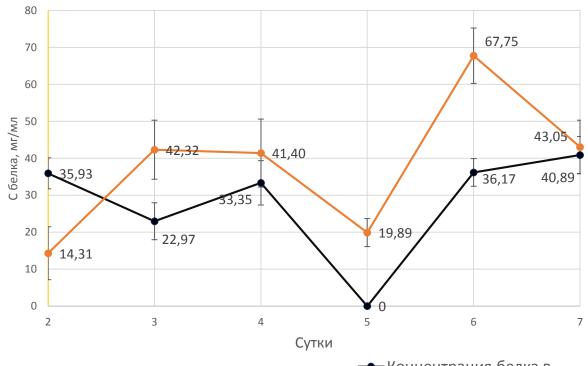
- → Плазминоподобная активность (S-2251)
- → Урокиназная активность (S-2444)
- → Активаторная к протеину С активность (S-2366)
- —— Активаторная к протромбину активность (S-2238)

Ферментационная среда 2 (%):

глюкоза – 3.5, <u>крахмал</u> – 0.125, <u>ГРМ</u> – 0.5, <u>пептон</u> – 0.5, NaCl – 0.2, MgSO4 – 0.05, KH2PO4 – 0.05.

## Динамика накопления белка и изменение азоказеинолитической активности у штамма Cunninghamella echinulata 4ав

Динамика **накопления белка** штаммом *C. echinulata* 4ав в культуральных жидкостях при глубинном культивировании на ферментационных средах 1 и 2.

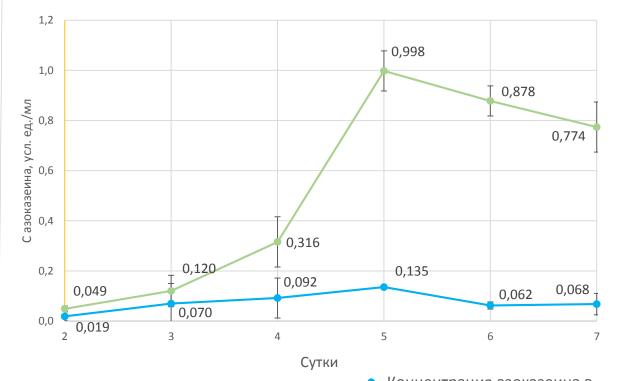


**Ферментационная среда 1** (%): <u>глицерин</u> – 7.0, глюкоза – 3.0, <u>ГРМ</u>– 3.0, MgSO4 – 0.1,KH2PO4 – 0.1.

- ── Концентрация белка в ферментационной среде 1
- Концентрация белка в ферментационной среде 2

#### Изменение азоказеинолитической активности

в течение шести суток глубинного культивирования штамма *C. echinulata* 4ав на ферментационных средах 1 и 2.



#### Ферментационная среда 2 (%):

глюкоза — 3.5, <u>крахмал</u> — 0.125, <u>ГРМ</u> — 0.5, <u>пептон</u> — 0.5, NaCl — 0.2, MgSO4 — 0.05, KH2PO4 — 0.05.

- Концентрация азоказеина в ферментационной среде 1
- Концентрация азоказеина в ферментационной среде 2





- У 23 штаммов разных видов отдела **Mucoromycota** изучена способность **продуцировать внеклеточные протеиназы**, действующие на белки системы гемостаза человека. Установлено, что они не проявляли или имели низкие плазминоподобную и урокиназную активности, но проявляют значительную активаторную к протромбину и протеину С активности.
- Наибольшую активность по отношению к протромбину и протеину С показали три штамма мукоромицетов Cunninghamella echinulata 4aв, Absidia spinosa 3aв и Mucor plumbeus 10aв, так как они проявили оба типа активностей при культивировании на рекомендуемых для синтеза этих пептидаз ферментационных средах.
- Максимальных значений активаторная к протромбину и протеину С активности у штамма *С. echinulata* 4ав достигают на **4-е и 6-е сутки** культивирования на ферментационной среде 1 при 25°C.



## Спасибо за внимание!