## МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ Кафедра микологии и альгологии

# Микромицеты щелочных местообитаний – продуценты алкалостабильных протеаз

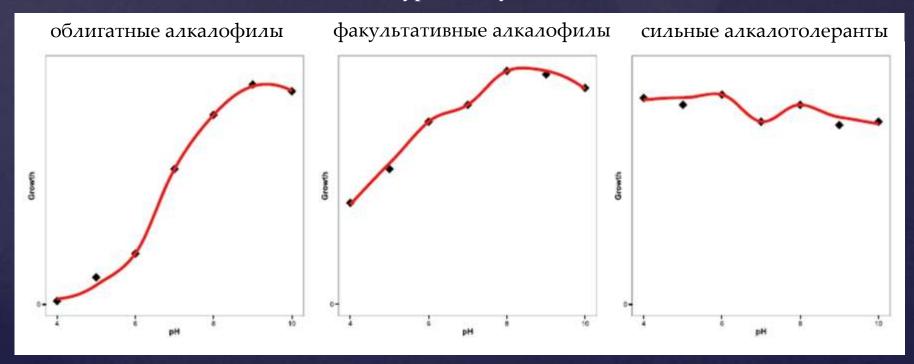
Выпускная квалификационная работа магистра

Студентки II курса магистратуры Покровской Ю.С.

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

# Определение и систематика алкалофильных и алкалотолерантных грибов

отдел Ascomycota п/отдел Pezizomycotina класс Sordariomycetes п/класс Hypocreomycetidae



### Определение и классификация протеолитических ферментов

Протеолитические ферменты относят к классу 3 - гидролаз, образуют подкласс

пептид-гидролазы (3.4).



Эндопептидазы (протеиназы)



Экзопептидазы

- Сериновые
- Цистеиновые
- Металлопротеиназы
- Аспартильные
- Треониновые
- Глутаминовые

- Дипептидазы
- Дипептидил-пептидазы
- Аминопептидазы
- Карбоксипептидазы

#### Цель и задачи

**Целью работы** является изучение спектра протеаз алкалофильных и алкалотолерантных грибов, выявление наиболее активных продуцентов данных ферментов в щелочных условиях и характеристика ряда свойств секретируемых протеаз, важных для их практического применения.

#### Задачи:

- № Изучение спектра секретируемых внеклеточных протеаз алкалофильными и алкалотолерантными грибами и отбор наиболее активных штаммов;

- № Исследование влияния условий, создаваемых при практическом применении протеаз (диапазоны рН, температуры, содержания различных детергентов, соли хлорида натрия) на их активность;
- № Частичная очистка внеклеточных протеаз: диализ культуральной жидкости и гель-фильтрация для определения молекулярных масс активных протеолитических ферментов.

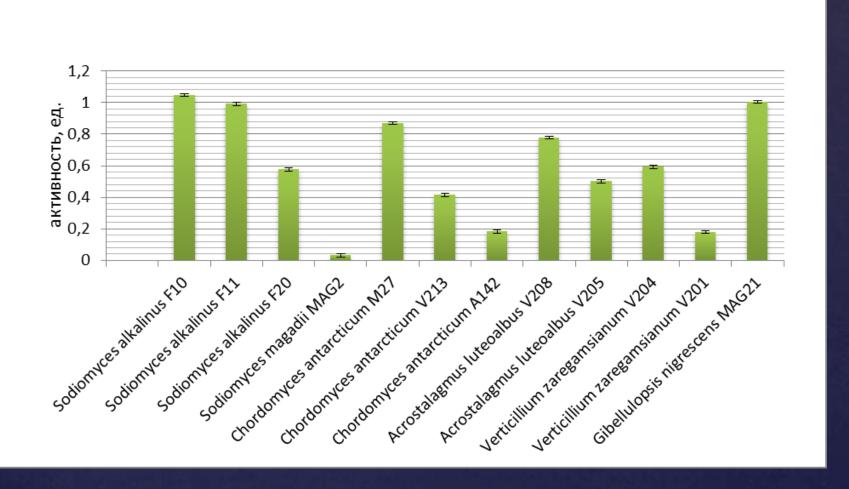
## Объекты исследования

Вид	Штамм	Место сбора	Отношение к pH		
Sodiomyces	F10	Танзания; содовая почва на берегу озера (рН воды 10)	- Облигатный		
alkalinus	F11	Монголия; озеро (рН 10,7)	алкалофил		
	F20	Монголия; почва (рН 9,3)			
	M27	Кулунд.степь; озеро (рН 9,8)	article legislance		
Chordomyces antarcticum	V213	Кулунд.степь; озеро (рН 10,1)	¯ Факультативный _       алкалофил		
	A142	Арал, с солянок; побережье			
Acrostalagmus	V205	Кулунд.степь; озеро (рН 9,6)	Факультативный		
luteoalbus	V208	Кулунд.степь; озеро (рН 9,8)	алкалофил		
Verticillium	V201	Забайкалье; озеро (рН 7,6)	- Факультативный		
zaregamsianum V204		Забайкалье; озеро (рН 8,2)	алкалофил		
Sodiomyces magadii	MAG2	Кения, оз.Магади; берег озера (рН 11)	Облигатный алкалофил		
Gibellulopsis nigrescens	MAG28	Кения, оз.Магади	Сильный алкалотолерант		

#### Методы

- ы Общая протеолитическая активность по азоказеину
- © Специфические протеолитические активности для эндопептидаз: GlpAALpNA, GlpFpNA, BzRpNA, GlpFApNA для экзопептидаз: LpNA, FpNA, EpNA, RpNA, APpNA, GPpNA, RPpNA
- № Ингибиторный анализ (EDTA ингибитор металлопротеиназ, PMSF ингибитор сериновых протеиназ, йодацетамид ингибитор цистеиновых протеиназ)
- ы рН оптимум и стабильность (0,1М натрий-ацетатный и фосфат-боратный буфер при рН 3-11)
- ъ Температурный оптимум и стабильность (0,1 М бикарбонатный буфер рН 9,5; 30-80 °C)
- ы Влияние NaCl и детергентов (Triton X-100, SDS) при концентрациях 1-30% и 0,1-8%
- & Стабильность с коммерческими моющими средствами (Ariel, Vanish Oxi Action 0,7%) и перекисью водорода (0,5; 1 и 3%)
- к Коллагенолитическая активность по азоколлу по в коллагенолитическая активность по в зоколлу по в коллагенолитическая в коллагенол
- № Активности белков системы гемостаза по 5 хромогенным субстратам
- ы Частичная очистка наиболее активных протеаз: фракционирование сульфатом аммония, диализ и разделение гель-фильтрацией

#### Общая протеолитическая активности среди алкалофильных и алкалотолерантных микромицетов



# Спектр внеклеточных эндопептидаз алкалофильных и алкалотолерантных микромицетов

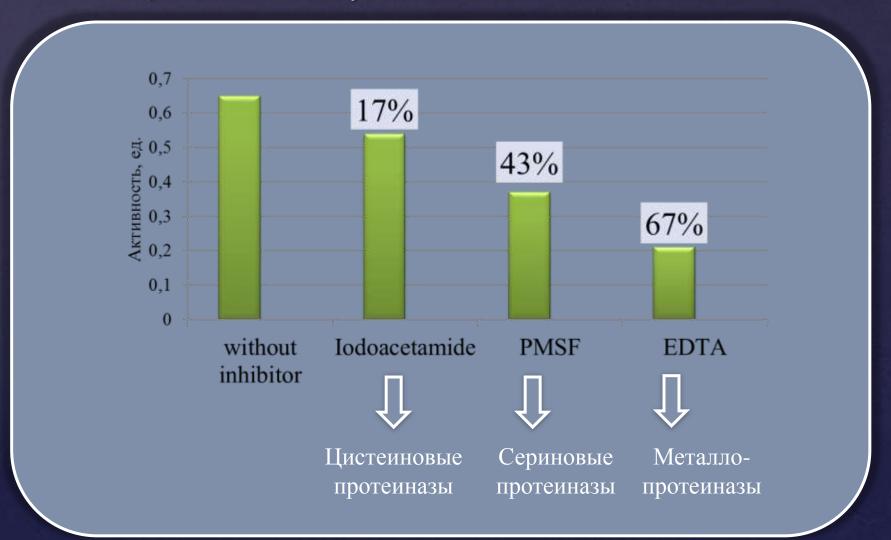
Измеряемая активность* (ед.)/субстраты								
Штамм	Трипсино-подобная	Химотрипсино-подобная	Субтилизино- подобная	Цистеиновые пептидазы				
Sodiomyces alkalinus F10	0	0	0,14	0,28				
Sodiomyces alkalinus F11	0	0	0,23	0,20				
Sodiomyces alkalinus F20	0	0	0,09	0,10				
Chordomyces antarcticum M27	0	0,03	0,29	0,17				
Chordomyces antarcticum V213	0,02	0,03	0,06	0,15				
Chordomyces antarcticum A142	0,03	0,06	0,06	0,09				
Acrostalagmus luteoalbus V205	0,04	0	0	0,23				
Acrostalagmus luteoalbus V208	0	0	0,11	0,25				
Verticillium zaregamsianum V201	0	0	0	0,22				
Verticillium zaregamsianum V204	0	0	0,24	0,30				
Sodiomyces magadii MAG2	0,03	0	0,03	0,07				
Gibellulopsis nigrescens MAG28	0,06	0	0,34	0,26				

## <u>Спектр внеклеточных экзопептидаз алкалофильных и алкалотолерантных</u> <u>микромицетов</u>

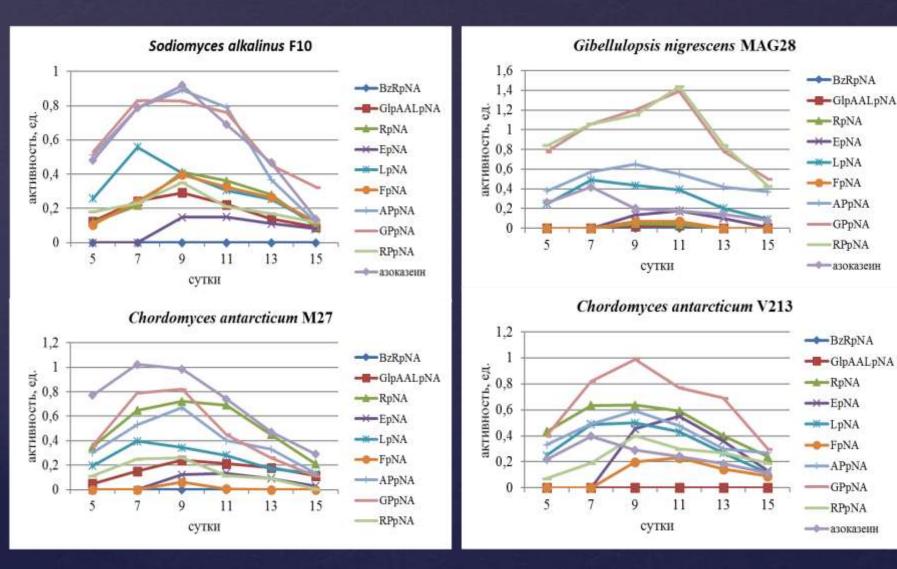
#### Измеряемая активность\* (ед.)/субстраты

			•		•			
Штамм		Аминопептидазн активность	ая	Дипептидил-пептидазная активность				
	FpNA	EpNA	LpNA	APpNA	GPpNA	RPpNA		
Sodiomyces alkalinus F10	0,20	0,03	0,61	0,51	0,83	0,23		
Sodiomyces alkalinus F11	0,07	0	0,59	0,42	0,71	0,05		
Sodiomyces alkalinus F20	0,04	0	0,52	0,54	0,84	0,28		
Chordomyces antarcticum M27	0	0,06	0,44	0,53	0,79	0,25		
Chordomyces antarcticum V213	0,06	0,08	0,63	0,49	0,82	0,19		
Chordomyces antarcticum A142	0,04	0,14	0,63	0,42	0,79	0,09		
Acrostalagmus luteoalbus V205	0,02	0	0,51	0,42	0,73	0,15		
Acrostalagmus luteoalbus V208	0,03	0	0,57	0,48	0,77	0,19		
Verticillium zaregamsianum V201	0,28	0	0,59	0,54	0,79	0,18		
Verticillium zaregamsianum V204	0,45	0	0,68	0,55	0,81	0,21		
Sodiomyces magadii MAG2	0,07	0	0,19	0,35	0,94	0,07		
Gibellulopsis nigrescens MAG28	0,05	0,02	0,58	0,57	1,06	1,06		

# <u>Вклад различных протеаз в общую</u> протеолитическую активность *C.antarcticum* M27



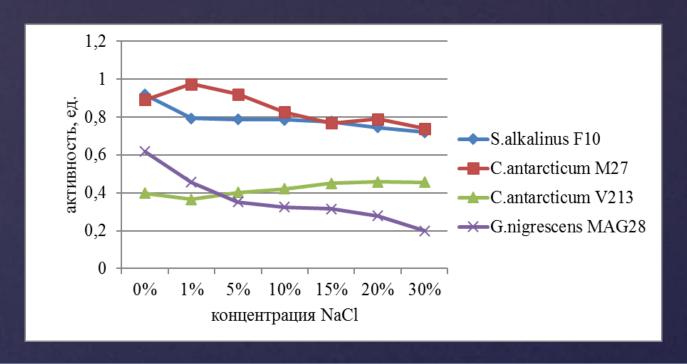
Динамика активности протеаз разных групп при росте штаммов на жидкой среде с казеином при рН 9,5



# Стабильность внеклеточных протеаз алкалофильных штаммов при широком диапазоне pH и температуры

Штамм/			рН, ед.				Температура, °С					
условия	Контроль	7	8	9	10	11	30	40	50	60	70	80
S.alkalinus F10	100%	84%	87%	100%	75%	40%	67%	100%	99%	96%	16%	11%
C.antarcticum M27	100%	90%	92%	100%	55%	41,5%	69%	85%	100%	93%	36%	24%
C.antarcticum V213	100%	87%	93%	100%	58%	35%	70%	82%	91%	78%	15%	9%
G.nigrescens MAG28	100%	95%	95%	100%	49%	37%	65%	87%	80%	62%	28%	8%

#### Стабильность внеклеточных протеаз алкалофильных штаммов в присутствии NaCl



Штамм/	Контроль	NaCl, %					
условия		1	5	10	15	20	30
S.alkalinus F10	100%	100%	99%	99%	98%	94%	91%
C.antarcticum M27	100%	100%	99%	89%	82%	82%	79%

Результаты

# Стабильность протеаз в присутствии детергентов, коммерческих моющих средств и окисляющего агента

Штамм/ условия	<b>Контро</b> л ь	Triton X-100, %				SDS, %			Ariel,	Vanish		
		0,5	1	2	4	8	0,1	0,2	0,4	0,6	(	),7
S.alkalinus F10	100%	59%	51%	51%	40%	34%	42%	40%	39%	39%	60%	72%
C.antarcticum M27	100%	78%	64%	63%	42%	36%	39%	39%	30%	27%	46%	82%

Штамм/ условия	Контроль	$\mathrm{H_2O_2},\%$					
		0,5	1	3			
S.alkalinus F10	100%	35,5%	33%	28%			
C.antarcticum M27	100%	26,5%	24%	20%			

#### Очистка внеклеточных протеаз отобранных алкалофильных штаммов



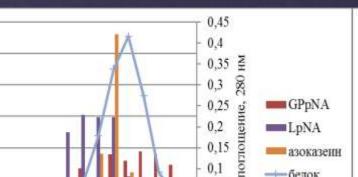
0.3

0,25

0,15

0,05

активность, ед.



9 10 11 12 13 14 15 16

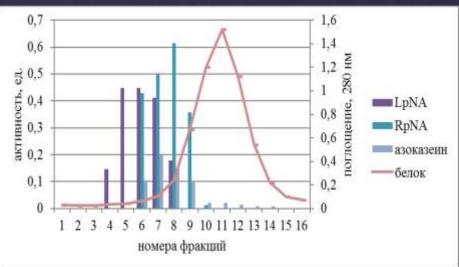
номера фракций

0,1

0.05

—белок

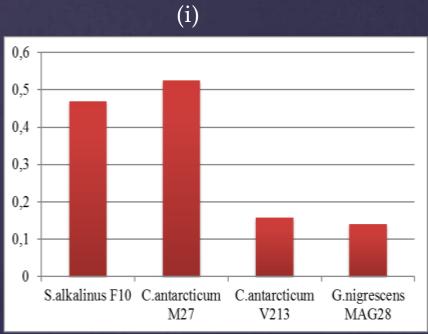
#### C.antarcticum M27

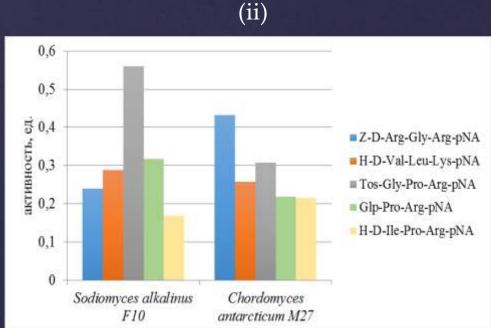


#### Молекулярные массы активных ферментов

Штамм/ субстрат	Азоказеин	LpNA	RpNA
S.alkalinus F10	19,9 қДа	32 кДа	
C.antarcticum M27	52 қДа	83 кДа	52 қДа

# <u>Коллагенолитическая активность (i) и активности внеклеточных</u> протеаз, сходных с белками системы гемостаза (ii)





Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA – субстрат Ха-фактора плазмы крови,

H-D-Val-Leu-Lys-pNA— субстрат плазмина, Tos-Gly-Pro-Arg-pNA— субстрат тромбина, Glp-Pro-Arg-pNA— субстрат активированного протеина C,

H-D-Ile-Pro-Arg-pNA – субстрат сериновых протеиназ и тканевого активатора плазминогена

#### Выводы

- № На основании ингибиторного анализа у факультативного алкалофила *C.antarcticum* M27 установлено, что внеклеточные металлопротеиназы вносят основной вклад в проявление протеолитической активности данного штамма в щелочных условиях;
- № Значения рН оптимума и алкалостабильности протеолитических ферментов у исследованных штаммов S.alkalinus F10, G.nigrescens MAG28, C.antarcticum M27 и V213 соответствуют их экофизиологическим особенностям щелочным условиям местообитания и способности к хорошему росту на средах с рН 9-10,5. Высокой термостабильностью протеазы не обладали;
- № По отношению к NaCl внеклеточные протеазы были устойчивы и сохраняли высокие активности даже при 30%-ном содержании соли. Протеазы проявили довольно хорошую устойчивость к воздействию ионного (SDS) и неионного (Triton X-100) детергентов;
- № Полученные частично очищенные внеклеточные протеазы алкалофильных штаммов *S.alkalinus* F10 и *C.antarcticum* M27 обладали выраженной аминопептидазной активностью, в том числе и со сравнительно редкой активностью по субстрату RpNA, молекулярные массы данных ферментов составили 32, 83 и 52 кДа;
- № Установлено сохранение высокой активности протеаз отобранных штаммов в присутствии коммерческих моющих средств и их компонентов, наличие у этих ферментов коллагенолитической активности и активностей, сходных с таковой у белков системы гемостаза. Это указывает на возможности их практического применения и перспективности дальнейшего изучения их свойств.

## Выражаю благодарность

Куракову А.В., Дунаевскому Я.Е., Биланенко Е.Н., Кудрявцевой О.А., Георгиевой М.Л., Осмоловскому А.А., Бондаренко С. Спасибо за внимание!