



Вятский государственный университет
Биологический факультет
Кафедра микробиологии



Оптимизация метода выделения ферментов лигнолитического комплекса из мицелиальной культуры съедобных базидиомицетов

Работу выполнила студентка группы МБ-51

Брызгина Анастасия Сергеевна

Научный руководитель:

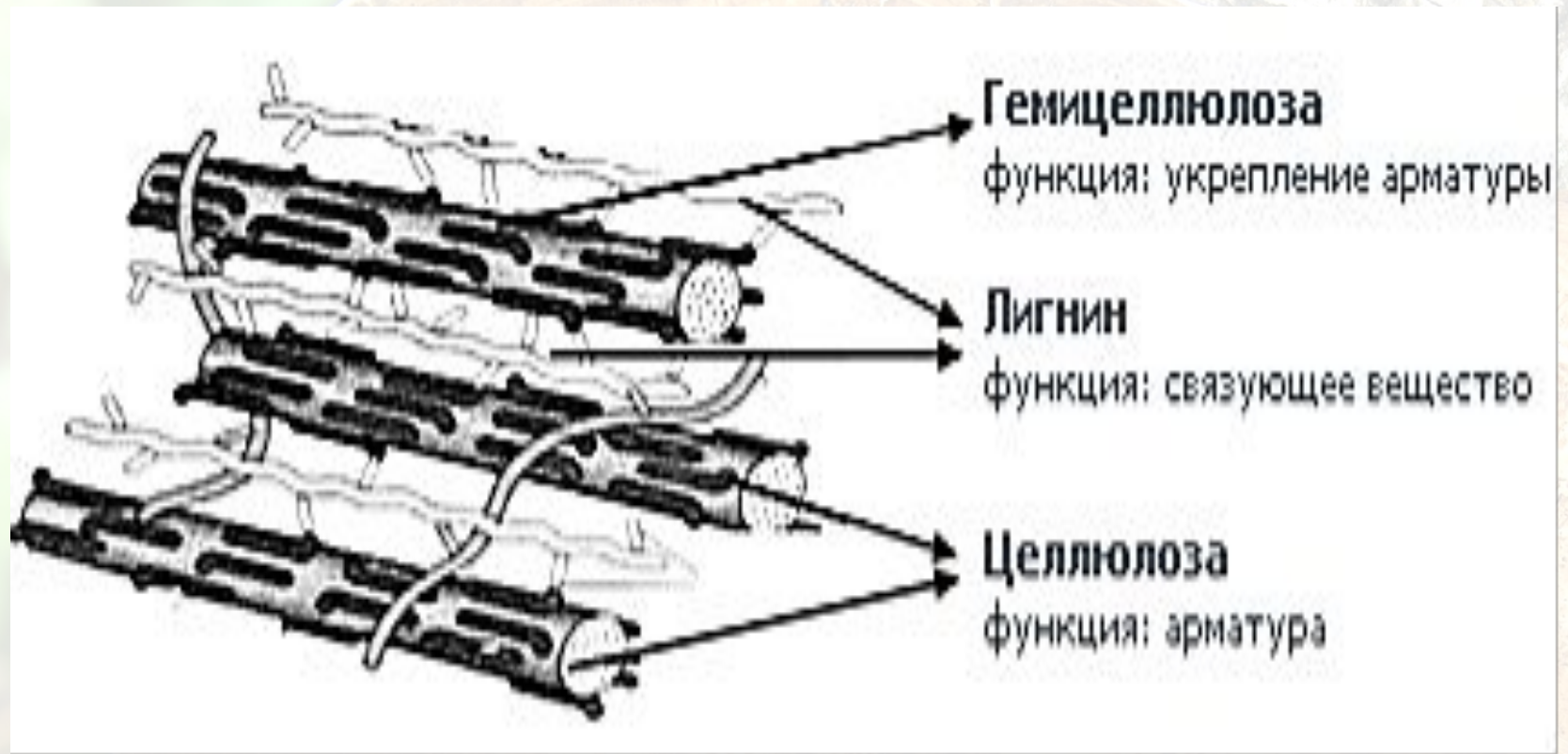
к.б.н., доцент

Бессолицына Екатерина Андреевна

Киров
2015

Работа выполнена в лаборатории
кафедры микробиологии ВятГУ





Лигноцеллюлозный комплекс

Мультиферментный внеклеточный
лигнолитический комплекс

Гемсодержащие
оксидоредуктазы

Лакказы

Флавиносодержащие
ферменты

Лигнинпероксидаза

Марганецпероксидаза



Trametes gibbosa



Schizophyllum commune



Coniophora puteana



Gloeophyllum sepiarium



Pleurotus cornucopiae

Области применения лигнолитических ферментов





Несъедобные
грибы –
продуценты
фармакологически
ценных продуктов



Сложная проверка
получаемых
препаратов на
токсичность и
аллергенность



Внедрение в
производство
съедобных грибов
в качестве
источников
фармакологически
ценных веществ



Актуальность

Широкие перспективы использования ферментов лигнолитического комплекса делают актуальным поиск новых и оптимизацию уже используемых методов выделения и очистки данных ферментов

Цель работы

поиск путей оптимизации метода выделения ферментов лигнолитического комплекса из мицелиальной культуры базидиомицетов.

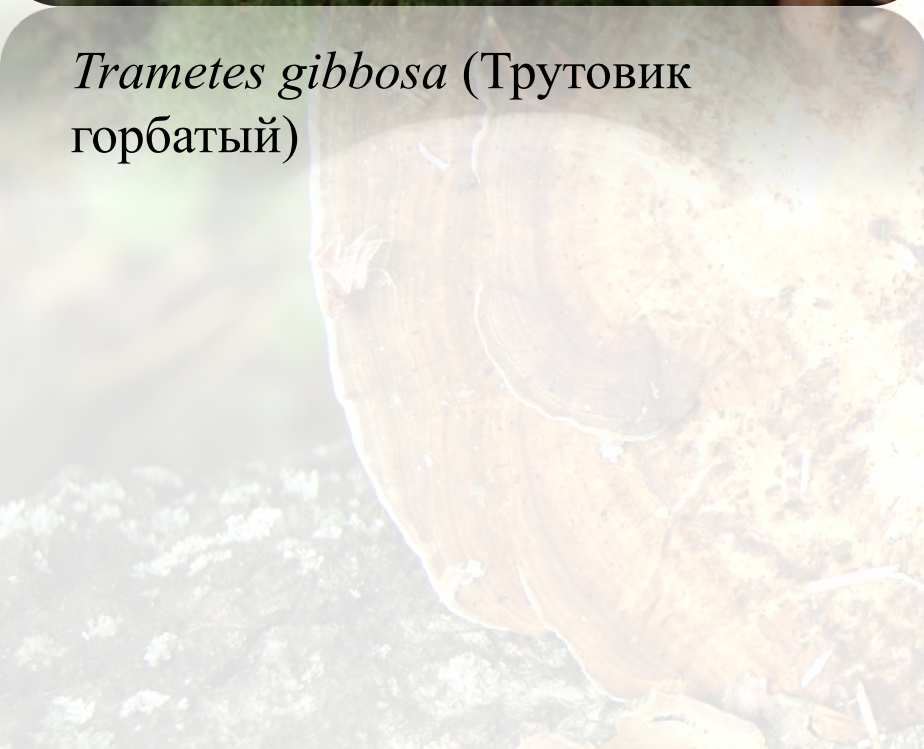
Задачи

исследования:

- выделить из среды культивирования базидиомицетов ферменты лигнолитического комплекса двумя различными методами;
- оценить удельную активность ферментов и концентрацию белка в полученных препаратах



Pleurotus ostreatus (Вешенка
обыкновенная)



Trametes gibbosa (Трутовик
горбатый)



Схема выделения ферментов методом колоночной хроматографии

Культивирование в жидкой питательной среде

Центрифугирование 6000 об/мин 10 минут (или
фильтрация)

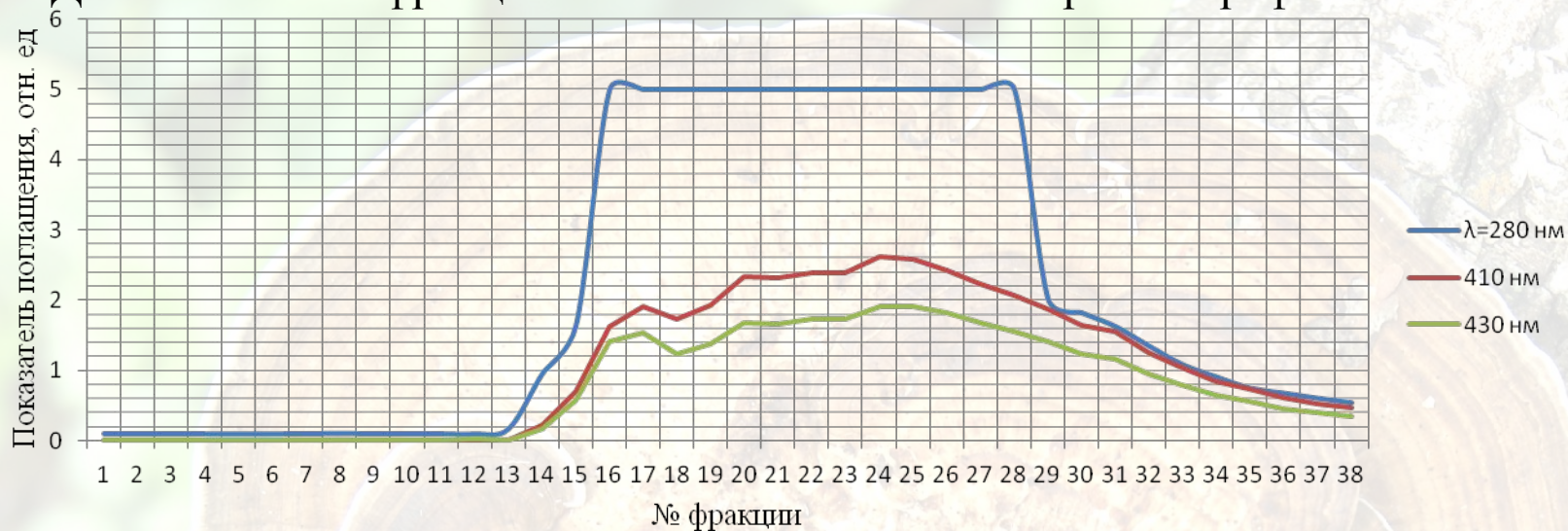
Анионообменная хроматография на DEAE-cellulose (элюция
линейным градиентом NaCl (0 – 1 M))

Гель-фильтрация на Sephacryl S-100 HR

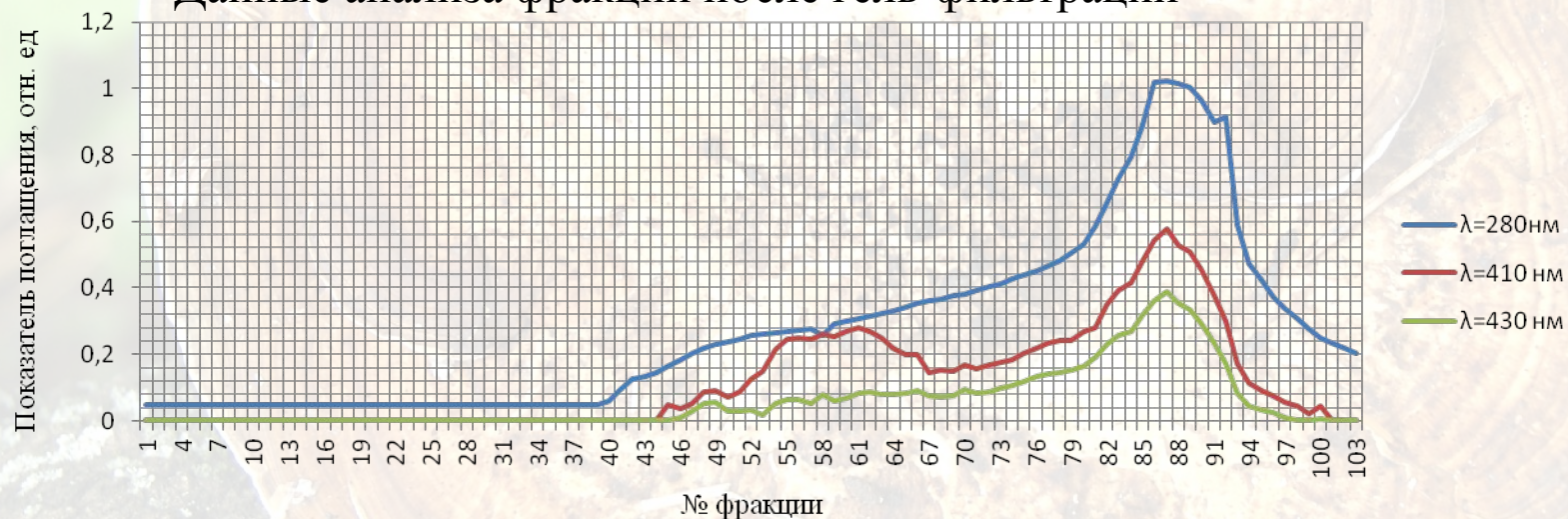
Анионообменная хроматография на Q-Sepharose (элюция
линейным градиентом NaCl (0-1 M))

Гель-фильтрация на Sephacryl S-100 HR

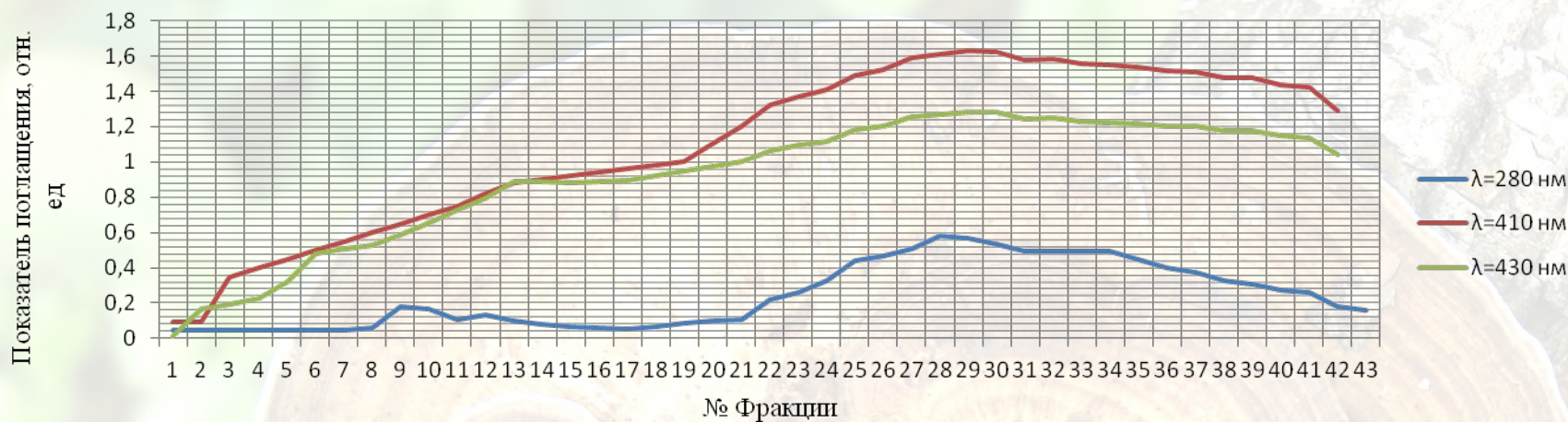
Данные анализа фракций после анионообменной хроматографии



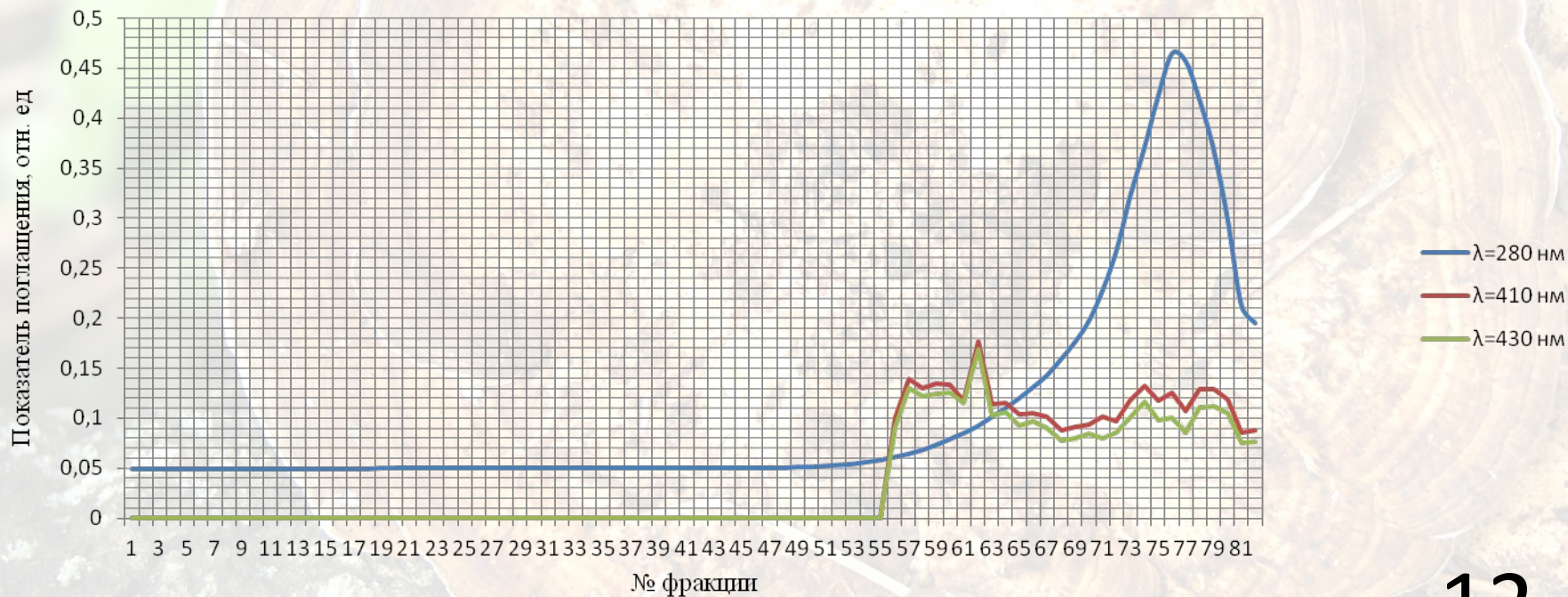
Данные анализа фракций после гель-фильтрации



Данные анализа фракций после повторной анионообменной хроматографии



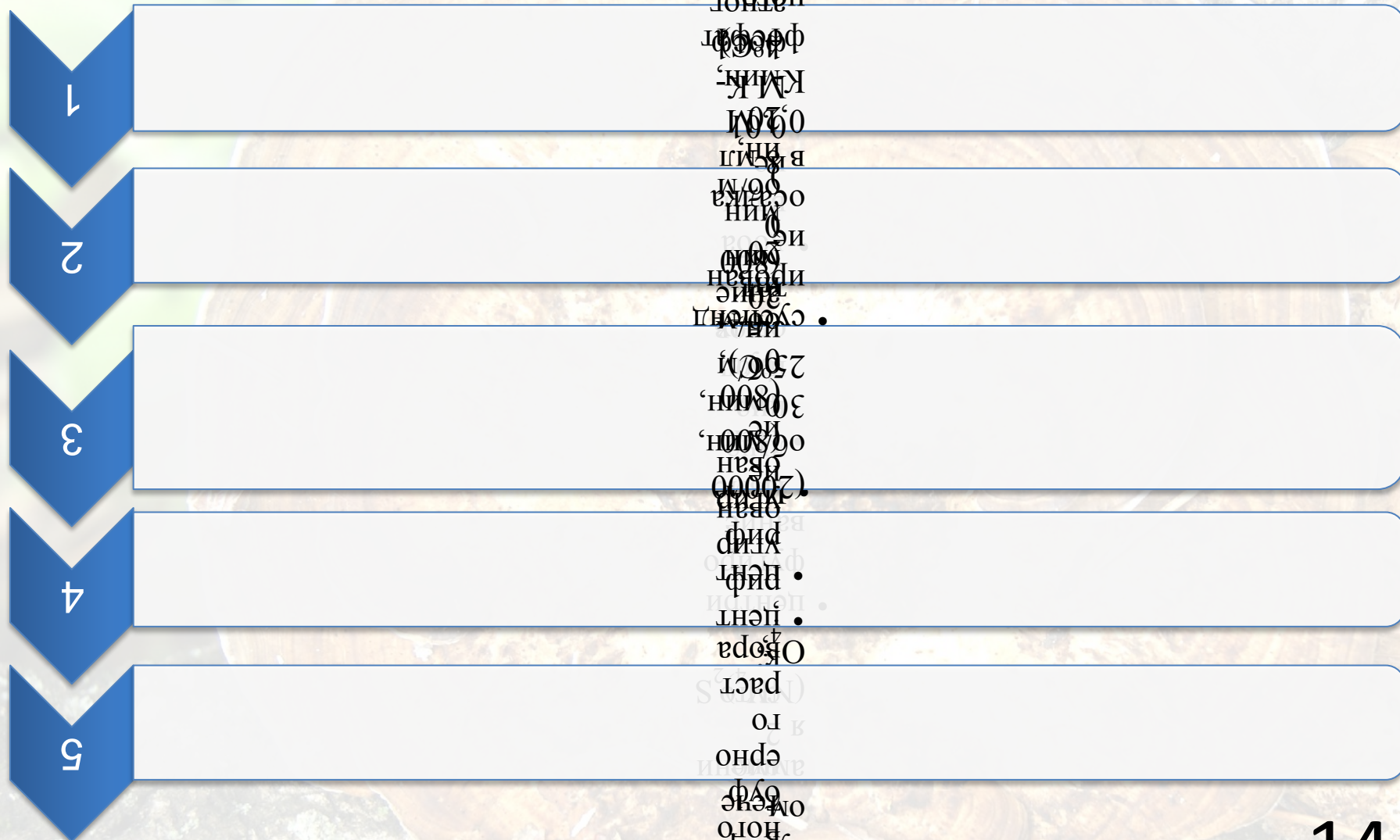
Данные анализа фракций после повторной гель-фильтрации



Удельная активность ферментов и концентрация белка (*T. gibbosa*)

Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность, Е/мг		
			LiP	Lac	MnP
Культуральная жидкость	232	0,65	1,82	75,76	7,66
Анионообменная хроматография на DEAE-cellulose	25	0,65	6,81	791,57	73,79
Гельфильтрация на Sephacryl S-100 HR	35	0,40	2,71	191,03	60,35
Повторная анионообменная хроматография на Q-Sepharose	33	0,39	4,65	157,42	300,49
Повторная гель-фильтрация на Sephacryl S-100 HR	18	0,40	2,22	151,13	425,60

Схема выделения ферментов методом диализа

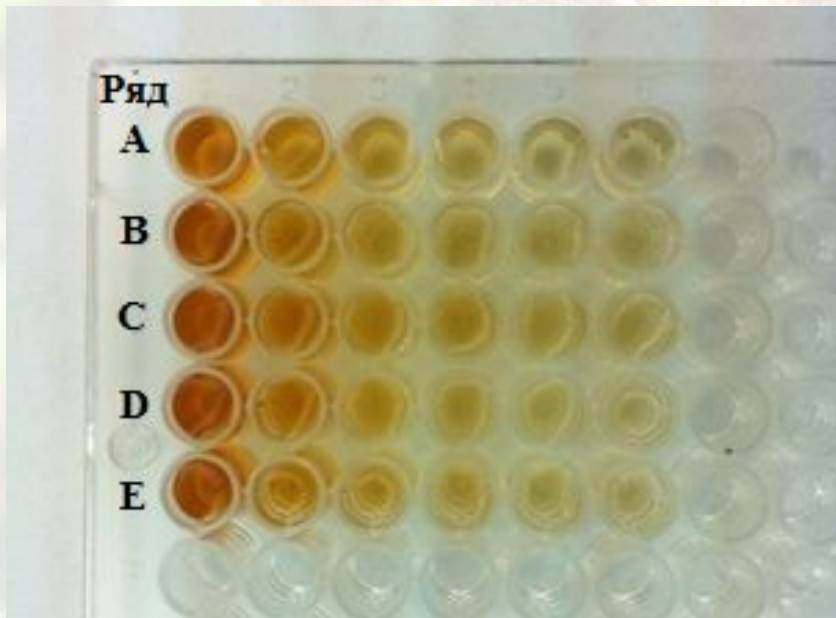


Удельная активность ферментов и концентрация белка (*Pleurotus ostreatus*)

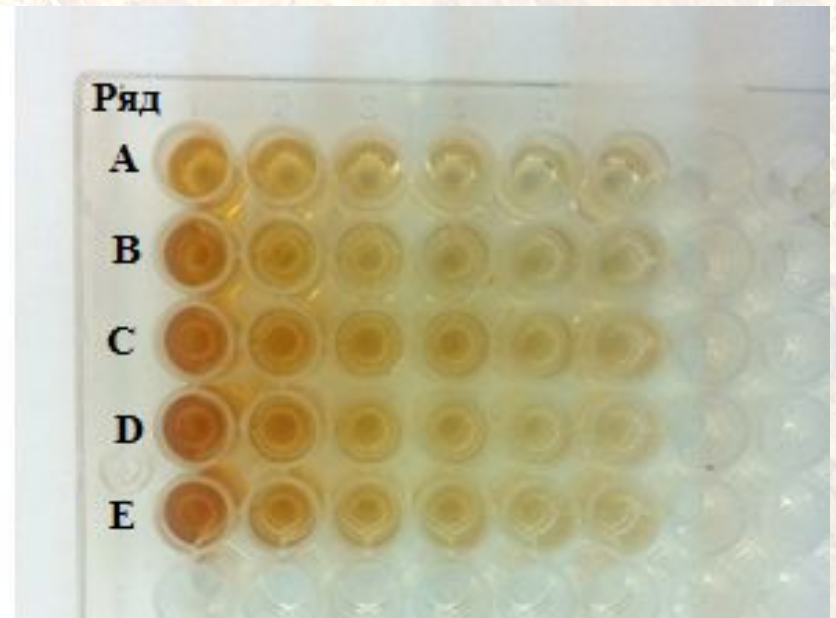
	Фракция 1	Фракция 2	Фракция 3	Фракция 4
Лигнинпероксидаза, Е/ml	8,87	1,23	0,25	0,23
Лакказа, Е/ml	225,89	76,02	15,82	17,89
Марганецпероксидаза, Е/ml	8,59	7,14	5,92	2,19
Концентрация белка, мг/мл	0,958	0,853	0,730	0,625

Расщепление пигментов чая ферментным препаратом

Условия инкубирования: время — 4 часа; температура - 27°C; постоянное перемешивание.



До инкубирования



После инкубирования

Выводы

1. Из среды культивирования *T. gibbosa* с помощью методов анионообменной хроматографии и гель-фильтрации получен препарат ферментов лигнолитического комплекса.

2. Показано, что предложенная схема очистки эффективна при выделении лакказ и маргенецпероксидаз из среды культивирования базидиомицетов

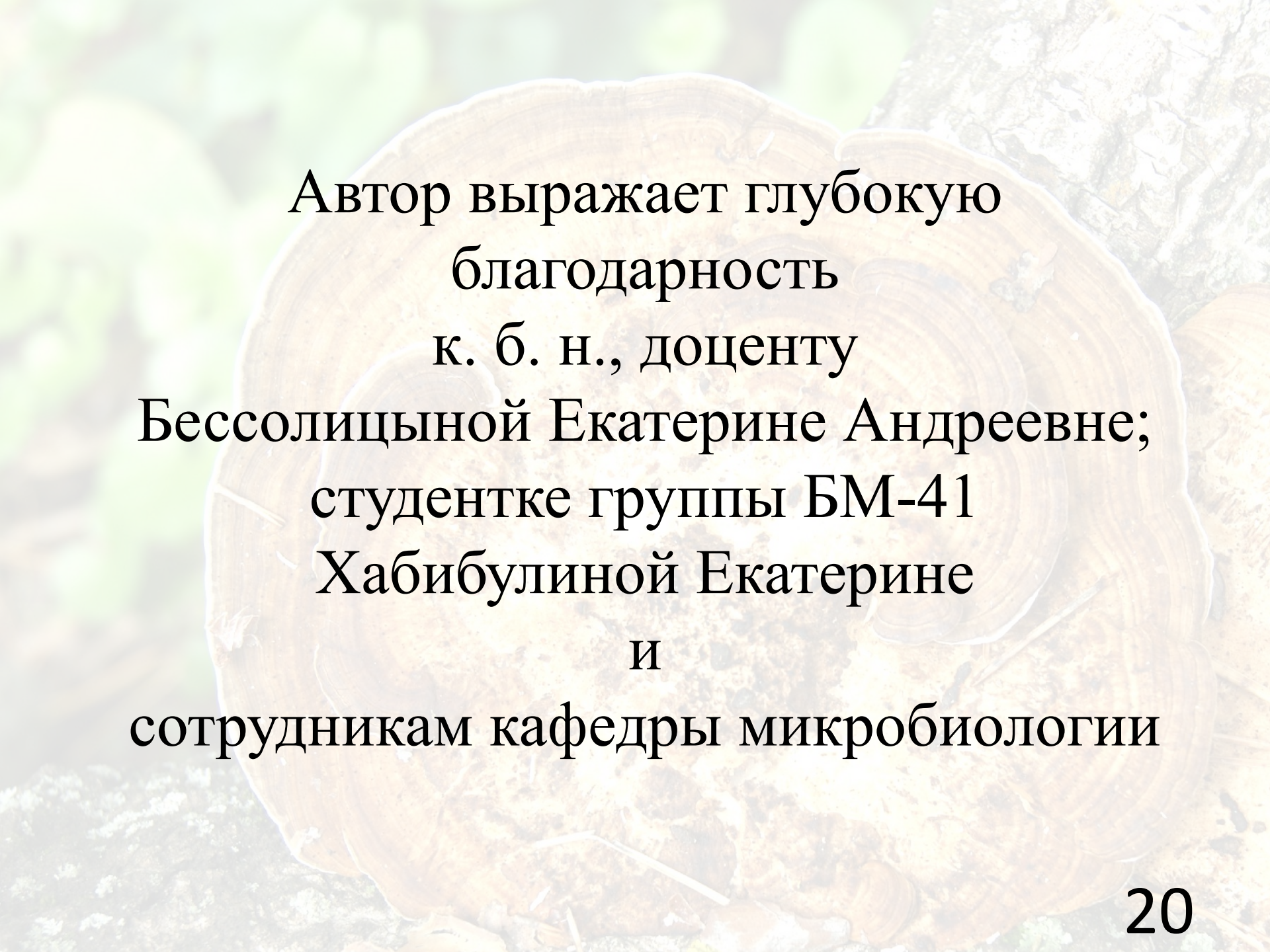
Выводы (продолжение)

3. Для получения чистых препаратов лигниноксидаз необходимо включение дополнительных стадий в схему очистки, в частности, проведение гидрофобной хроматографии.

4. Отработан экспресс-метод выделения лигнолитических ферментов путем осаждения белков сульфатом аммония и диализа в К-фосфатном буферном растворе.

Практические предложения

- Продолжить исследования по оптимизации методов выделения ферментов лигнолитического комплекса базидиальных грибов.
- Использовать полученные данные при создании отбеливающего препарата на основе лигнолитических ферментов



Автор выражает глубокую
благодарность
к. б. н., доценту
Бессолицыной Екатерине Андреевне;
студентке группы БМ-41
Хабибулиной Екатерине
и
сотрудникам кафедры микробиологии



***Благодарю за
внимание!***