PURIFICAREA PARȚIALĂ A PROTEAZELOR EXOCELULARE OBȚINUTE LA CULTIVAREA MICROMICETEI *TRICHODERMA KONINGII* CNMN FD 15

Alexandra CILOCI, Cezara BIVOL*, Tatiana KOLKER*, Veaceslav REVA*
Laboratorul Enzimologie, Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM

Enzimele proteolitice (EC 3.4) reprezintă enzime hidrolitice care catalizează scindarea legăturilor peptidice din moleculele de proteine sau polipeptide. Răspândirea lor este universală, mecanismele catalitice fiind aceleaşi, indiferent de origine. Principalele surse de proteaze industriale au origine bacteriană şi fungică. Proteazele exocelulare (EC 3.4.11-3.4.19) sunt sintetizate intracelular, dar eliberate extracelular, unde îşi exercită activ funcțiile. Avantajul economic al microorganismelor producătoare de exoenzime constă în recuperarea enzimelor din mediu. Cele mai importante surse de exoenzime sunt fungii miceliali (genurile *Aspergillus, Rhyzopus, Fusarium, Trichoderma*) [1].

În cadrul laboratorului Enzimologie al AŞM, a fost izolată în cultură pură din probe de sol din zona centrală a Moldovei şi depozitată în Colecția Națională de microorganisme nepatogene a AŞM tulpina de micromicete *Trichoderma koningii* CNMN FD 15, caracterizată prin nivel înalt al activității proteazelor neutre şi acide. Cultivarea producătorului *T. koningii*, separarea lichidului cultural de biomasa micelială prin filtrare, sedimentarea proteazelor solubile cu etanol în raport de 1:4 C_2H_5OH, cu uscarea ulterioară a fazei solide asigură obținerea preparatului enzimatic cu o activitate a proteazelor neutre de 513,25u/g. Purificarea enzimelor sporeşte activitatea preparatelor enzimatice şi, astfel, lărgeşte domeniile de aplicare ale acestora.

Scopul cercetărilor prezente a constituit sporirea gradului de puritate a proteazelor neutre izolate din lichidul cultural al micromicetei *T. koningii* CNMN FD 15.

Activitatea proteolitică a fost determinată prin metoda descrisă de Anson [2] cu utilizarea în calitate de substrat a cazeinatului de sodiu. Unitate de activitate enzimatică a fost considerată cantitatea de ferment care timp de 1 min la temperatura de 30^oC transformă proteinele substratului în peptide ce corespund 1µM Tyr (1µM Tyr = 0,181mg). Pentru aprecierea gradului de puritate, a fost dozată cantitatea de proteine totale conform metodei Lowry [3] şi efectuată SDS-electroforeza în gel de poliacrilamidă [4]. Experiențele au fost efectuate în trei repetări, datele prezentate fiind calculate conform $p \leq 0,05$. Purificarea preparatului proteolitic: 100 mg preparat a fost spălat cu 1ml soluție 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5, centrifugat 10 min/14 000 rpm, supernatantul (extract) a fost colectat şi supus gelfiltrării (coloană Toyopearl,

volum 14 ml). Echilibrarea şi eluarea proteinelor a fost efectuată cu aceeaşi soluție-tampon, viteza de eluare 1ml/min (Fig.1).

Profilul de eluare a proteinelor extrase din preparatul proteolitic al *T. koningii* demonstrează separarea a 8 fracții, dintre care doar 3 (fracțiile 3-5) posedă activitate proteolitică.

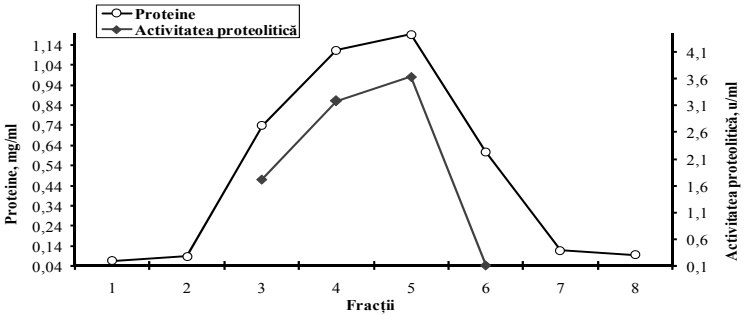


Fig.1. Purificarea preparatului proteolitic prin gelfiltrare

Cea mai înaltă cantitate de proteine este înregistrată în fracțiile ce posedă activitate proteolitică. Purificarea preparatului prin gelfiltare a asigurat o majorare a activității enzimatice specifice în medie de 1,55 ori, cea mai înaltă valoare înregistrându-se în fracția a 5-a (3,004u/mg proteină), fiind de 1,74 ori mai activă decât preparatul proteolitic nepurificat. SDS-electroforeza proteinelor extrase din fracțiile obținute confirmă repartizarea preponderentă a proteinelor în fracțiile active 3-5, profilul polipeptidic repetând profilul polipeptidic al extractului de preparat (Fig.2).

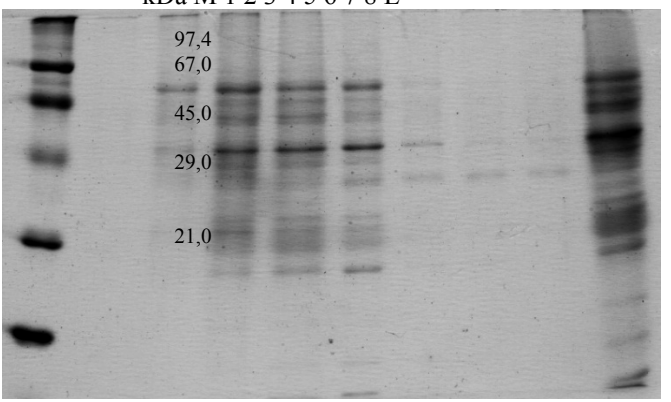


Fig.2. SDS-electroforeza proteinelor din preparatul proteolitic: M – marker; 1-8 – fracțiile proteice obținute în urma gelfiltrării; E – extract de preparat

Referințe:

1. POLAINA, T., MACCABE, A.P. *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*. Dordrecht: Springer, 2007. ISBN 978-1-4020-5376-4.
2. ГРАЧЕВА, И.М., ГРАЧЕВ, Ю.П., МОСИЧЕВ, М.С. *Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов*. Москва: Легкая пищевая промышленность, 1982, 237 с.
3. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FAAR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. In: *Journal of Biological Chemistry*. 1951, no. 48, p. 17-25.
4. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*. 1970, 227(5259), p.680-685.