



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ "СТЕФАН АНГЕЛОВ"

Владислава Георгиева Дишлийска

**КАТАЛАЗА ОТ АНТАРКТИЧЕСКИ ГЪБИ: РОЛЯ В
АНТИОКСИДАНТНАТА ЗАЩИТА, РЕГУЛАЦИЯ И СВОЙСТВА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен
„Доктор”

в професионално направление **4.3. Биологични науки,**
Научна специалност „Микробиология“

Научен ръководител: доц. д-р Екатерина Крумова

Научно жури:

проф. Светла Данова, дн
проф. д-р Нели Георгиева
доц. д-р Златка Алексиева
доц. д-р Мария Гергинова
доц. д-р Людмила Симова

София, 2024г.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица

АТФ - аденозин трифосфат

БА - бирен агар

ГлПР – глутатион пероксидаза

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

ДНФХ - динитрофенилхидразин

ЕПР - ендоплазмен ретикулум

КАТ - каталаза

КБ - какодилатен буфер

КДА - картофено-декстрозен агар

МК - мастни киселини

МДА - малондиалдехид

мРНК - матрична рибонуклеинова киселина

НАДФН - никотинамидаденин динуклеотид фосфат - редуцирана форма

НК - нуклеинови киселини

ОН• - хидроксилен радикал

супероксиден радикал

ПФП - пентозофосфатен път

РК- разтворен кислород

РНК - рибонуклеинова киселина

СА – температурно чувствителни

СЕМ - сканкраща електронна микроскопия

СОД – супероксид дисмутаза

СОР - свободни окси-радикали

ТЕМ - трансмисионна електронна микроскопия

ЧДА- Чапек-Докс агар

Съкращения на латиница

AFPs - антифриз белтъци

Вр - нуклеотидна двойка

CAPs - стрес-белтъци на аклиматизация към нискотемпературния стрес

CSPs - стрес-белтъци на нискотемпературния стрес

CN - цианкалий

GAPDH - глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназа

GSH - глутатион

kDa - кило далтон

OD - разтворен кислород

PAGE - полиакриламидна гел електрофореза

PCR - полимеразна верижна реакция

SDS-PAGE - додецилфосфат полиакрил гел електрофореза

NAD(P)H - никотинамидаденин динуклеотид фосфат - редуцирана форма

UV - ултравиолетово облъчване

I. ВЪВЕДЕНИЕ

В последните години се наблюдава значително разширяване на проучванията върху физико-химичните граници на живот (температура, налягане, засушаване, съдържание на соли, рН, тежки метали и т.н.). Екстремните условия на средата нарушават най-важните взаимодействия, които поддържат функциите и структурата на биомолекулите. В резултат на това се наблюдава бързо увреждане на клетъчната цялост. Ето защо, интересът на много изследователи се насочва към живота в екстремно студени местообитания и към организмите, които са в състояние да живеят там. В тези райони на планетата доминират най-често бактерии, археи и гъби, които са най-разпространените адаптирани към ниски температури форми на живот по отношение видовото разнообразие и образувана от тях биомаса. Микроорганизмите, изолирани от океанските дълбочини, от алпийските и полярни местообитания, се считат за най-добрите експериментални модели при проучване живота на Земята в екстремни условия. Има доказателства, че тези организми не само могат да оцеляват при екстремни параметри на средата, но в някои случаи дори изискват наличието им, за да съществуват.

Представителите на Царство Гъби са най-разнообразната група в антарктическите екосистеми. Екологичната селекция, както и еволюционната адаптация са осигурили тяхното оцеляване в екстремни условия като суша, слънчева радиация, ниски температури и др. Въпреки интензивните изследвания в този аспект, все още има редица нерешени проблеми, свързани с механизмите на оцеляване в местообитания като Антарктика. Връзката между въздействието на ниските температури и проявите на оксидативен стрес привлича интереса на учените. Докато, обаче, клетъчният отговор срещу студовия стрес е изследван при различни бактерии и растения, много малко се знае за адаптацията на гъбите за оцеляване при температури, близки до отрицателните. Хипотезата за повишаване нивото на оксидативния стрес при ниски температури се нуждае от повече доказателства чрез проучване нивото на биомаркерите на стреса и активността на антиоксидантните ензими. Все още не е изяснена ролята на клетъчния отговор срещу оксидативния стрес в механизма за оцеляване на микроорганизми, особено на гъби, изолирани от перманентно студени местообитания. Няма проучвания относно участието на антиоксидантния ензим каталаза

(КАТ) в този отговор. Липсват данни за експресията на гените, отговорни за синтеза на този ензим при ниски температури.

Гъбите, изолирани от местообитания с екстремно ниски температури, показват способността да произвеждат температурно чувствителни (cold-active, СА) ензими, включително и КАТ като първа линия на антиоксидантна защита. Поради високата си конформационна гъбкавост, СА ензимите се характеризират с повишен оборот на каталитично действие и висока каталитична ефективност при ниски температури. Такива ензими притежават температурен оптимум между 20 и 45 °C и поддържат термична стабилност при много по-ниски температури. Малко се знае за получаването и свойствата на СА КАТ. В повечето случаи, публикуваните данни се отнасят за ензимен синтез от бактериални видове.

СА ензими могат да бъдат приложени в редица области на живота – в хранителната, текстилната и фармакологичната индустрия, в технологията за биоремедиация като индикатор за разграждането на въглеводороди на замърсена със суров нефт почва и др. Те имат потенциал като терапевтични средства при заболявания, предизвикани от повишеното ниво на свободни радикали (напр. диабет, болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон, витилиго и акаталаземия), както и при криоконсервацията на човешки и животински гамети. Трябва да се добави и възможността такива проучвания да подобрят познанията за екстремофилите и екстремозимите.

Проучванията, включени в настоящия дисертационен труд са концентрирани върху посочените нерешени проблеми.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се изследва участието на антиоксидантния ензим каталаза в механизмите на адаптация към нискотемпературен стрес при филаментозни гъби, изолирани от екстремно студени местообитания (Антарктика).

За постигането на поставената цел са предвидени следните задачи:

1. Температурна характеристика на 61 избрани щама антарктически филаментозни гъби.

2. Характеризиране на изолираните гъби по отношение синтеза на вътреклетъчна и извънклетъчна КАТ. Определяне на моделни щамове, принадлежащи към различни температурни класове.

3. Изследване ролята на КАТ в клетъчния отговор на моделните щамове към стрес, причинен от ниски температури.

3.1. Морфологични адаптации и ултраструктурни промени

3.2. Промени в биомаркерите на оксидативен стрес

3.3. Активност на антиоксидантната ензимна защита

4. Изолиране, секвениране и сравнение на КАТ гени в моделния щам

5. Изследване експресията на КАТ гени на моделния щам, поставен в условия на ниско-температурно въздействие

6. Разработване на лабораторен метод за получаване КАТ от ефективен антарктически продуцент

7. Пречистване и охарактеризиране на получената КАТ

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Характеристика на използваните щамове

2. Хранителни среди и култивиране

3. Морфологични и физиологични изследвания

3.1. Морфологични изследвания и електронна микроскопия

3.2. Температурна характеристика

3.3. Определяне на биомаса

3.4. Получаване на безклетъчен екстракт

4. Аналитични методи

4.1. Определяне специфичната активност на антиоксидантни ензими: КАТ и СОД

4.2. Определяне на концентрацията на глюкоза и количество белтък

4.2. Промени в биомаркерите на оксидативен стрес - съдържание на оксидативно увредени белтъци, количество на резервни въглехидрати, липидна пероксидация и нивото на генерираните свободни окси-радикали.

5. Генетичните методи

- 5.1. Изолиране и секвениране на гени, кодиращи белтък с каталазна активност на моделния щам
- 5.2. Определяне на генна експресия на каталазните гени при култивиране на моделния щам в нормооксигенни условия и в условията на нискотемпературен стрес - изолиране на ДНК, класически PCR, Quantitative Real-Time PCR
6. Пречистване на температурно-чувствителна КАТ
 - 6.1. Етапи на пречистване на КАТ
 - 6.2. Определяне свойствата на пречистената СА КАТ.

Статистическа обработка на резултатите Статистическото сравнение между отделните повторения на експериментите се извършва чрез Student's *t*-тест и чрез one way analysis (ANOVA), последван от *F*-тест с ниво на значимост 95% ($\alpha=0.05$).

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. ТЕМПЕРАТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА АНТАРКТИЧЕСКИ ЩАМОВЕ ГЪБИ

1.1. Проучване възможностите за растеж и развитие при различни температури

В изследванията са използвани 61 щама филаментозни гъби, изолирани от антарктически почвени проби, принадлежащи на микологичната колекция на ИМикБ. Те са проучени за растеж и развитие при различни температури. Като оптимална температура 10°C е определена за 2 щама, които са изолирани при 4°C; оптимална температура 15°C – за 13 щама (2 щама, изолирани при 4°C, 9 щама, изолирани при 10°C и 2 щама при 25°C); оптимална температура 20°C – 8 щама (2 щама, изолирани при 10°C и 6 щама, изолирани при 25°C); оптимална температура 25°C – 17 щама (10 щама, изолирани при 10°C и 7 щама, изолирани при 25°C); оптимална температура 30°C – 21 щама (3 щама, изолирани при 10°C и 18 щама, изолирани при 25°C) (Фиг.1).



Фиг. 1. Разпределение на изолатите в съответствие с оптималната температура на растеж

Повечето от получените антарктически щамове се отнасят към психротолерантните и мезофилните представители на гъбите. Това разпределение е направено в съответствие с приетата в литературата дефиниция на Morita (1975) и Russell (2006).

2. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА КАТАЛАЗИТЕ В АНТАРКТИЧЕСКИ ГЪБИ

2.1. Характеристика на изолираните гъби по отношение синтеза на вътреклетъчна и извънклетъчна КАТ

2.1.1. Синтез на КАТ от изолираните антарктически щамове при оптимална температура на растеж

Изолираните антарктически щамове гъби са проучени за способността им да синтезират вътреклетъчна и извънклетъчна КАТ (Табл. 1).

След 72 ч култивиране, всички изпитвани щамове, включително и изолираните при температура 4°C, 10°C и 25°C, демонстрират КАТ активност. Както се вижда от Табл. 1, всички те продуцират вътреклетъчна КАТ. Ензимната активност е в широки граници – между 0.8 и 40.2 Е/мг белтък.

От проучените 61 щама, 28 се проявяват като добри продуценти с активност над 10 Е/мг. Щамове P29 (28.9 Е/мг), III-112 (40.2 Е/мг), P27 (35.8), I-9 (39.2 Е/мг), III-81 (31.0 Е/мг), I-82 (33.2 Е/мг), I-15 (31.1 Е/мг) и др. демонстрират синтез на КАТ с висока активност.

Таблица 1. Антарктически изолати, продуциращи извънклетъчна и вътреклетъчна КАТ

N	Щам	Извънкл. КАТ [Е/мг Б]	Вътрекл. КАТ [Е/мг Б]	N	Щам	Извънкл. КАТ [Е/мг Б]	Вътрекл. КАТ [Е/мг Б]
1.	P27	2.5	22.9	32.	I-1 ₄	2.09	5.72
2.	P22	3.6	16,5	33.	III-2 ₁	1.20	8.16
3.	III-6 ₃	2.3	14.7	34.	III-7 ₁	1.33	19.54
4.	P21	0.6	11.3	35.	III-8 ₁	6.96	31.04
5.	P29	2.9	28.9	36.	III-8 ₃	1.70	26.72
6.	M12	0	16.4	37.	III-11 ₃	0.76	4.89
7.	P44	1.5	9.4	38.	III-2 ₂	0	6.32
8.	P31	0	35.7	39.	III-6 ₃	10.27	19.97
9.	P33	следи	5.9	40.	III-2 ₂₁	0	следи
10.	M5	0.9	10.4	41.	III-6 ₇	2.04	17.55
11.	II-6 ₂	2.3	10.0	42.	II-6 ₁	1.42	12.39
12.	II-6 ₅	4.0	15.3	43.	III-11 ₂	8.19	40.21
13.	II-6 ₆	1.1	14.9	44.	K1	5.36	1.61
14.	II-5 ₁	3.9	12.2	45.	K7	1.79	следи
15.	T35	1.6	15.8	46.	K9	1.00	5.52
16.	119	1.3	13.4	47.	15	1.93	19.97
17.	M0	4.4	6.8	48.	16	0.86	23.94
18.	I-2 ₁	0	9.5	49.	19	1.34	9.75
19.	I-6 ₁	1.3	5.7	50.	22	0	10.18
20.	I-8 ₂	1.12	3.8	51.	I-S	2.43	5.29
21.	I-10 ₁	0.89	11.9	52.	B3 ₂	1.64	12.09
22.	I-13	4.25	8.7	53.	II-4 ₃	1.81	17.23
23.	I-1 ₁₂	2.27	4.7	54.	I-7 ₃	1.77	4.38
24.	I-11 ₁	3.5	33.9	55.	I-10	1.6	21.0
25.	I-14 ₁	7.3	15.4	56.	I-1 ₉	1.3	22.0
26.	I-1 ₁	1.7	6.8	57.	I-7 ₂	3.4	36.9
27.	I-BH	1.6	15.0	58.	I-9 ₂	2.5	6.02
28.	I-1 ₅	2.2	31.1	59.	I-2 ₁	4.8	7.1
29.	I-8 ₂	2.7	33.2	60.	I-7 ₁	2.7	27.4
30.	I-9	3.9	39.2	61.	I-11 ₂	2.6	17.5
31.	I-8	0.8	18.9				

При анализ на резултатите не се установява ясно изразена връзка между каталазната биосинтеза и принадлежността на щамовете към температурните класове (психрофили, психротолерантни и мезофили). Висока ензимна активност се среща както при психротолерантните, така и при мезофилните представители. Всички те са изолирани от антарктически почвени проби и са адаптирани към условията на живот там. При ниските

температури на Антарктика, мезофилите се съхраняват като спори и прорастват само през краткото лято или когато попаднат при благоприятни условия.

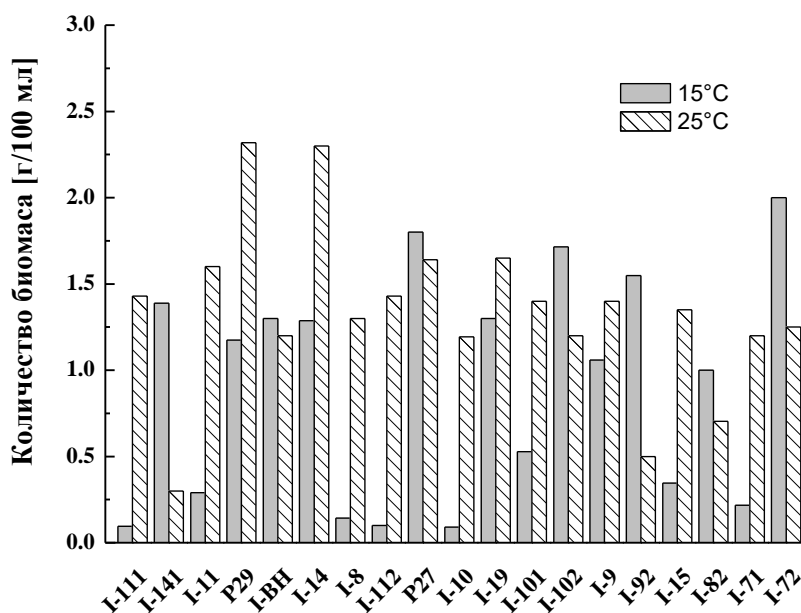
2.1.2. Разпространение на извънклетъчната КАТ в щамове от различни таксономични групи

От гледна точка на приложението, извънклетъчните ензими имат редица предимства пред вътреклетъчните: икономически по-изгодни са и по-лесни за получаване в пречистен вид. Както е известно, КАТ е локализирана в цитоплазмата и пероксизомите и много рядко се установява извън клетките. Съобщенията за продукция на извънклетъчна КАТ от микроорганизми са изключително малко. Проучваните от нас антарктически щамове показват синтеза на извънклетъчна КАТ, но тя е с по-ниска активност от тази на вътреклетъчната (Табл. 1). Очертават се щамове, които показват сравнително добра продуцираща способност. Двадесет и седем щамове показват наличие на извънклетъчна КАТ, като при щамове П-65, М0 и I-13, тя е най-висока (над 4 Е/мг).

2.2. Избор на моделни щамове, принадлежащи към различни температурни класове

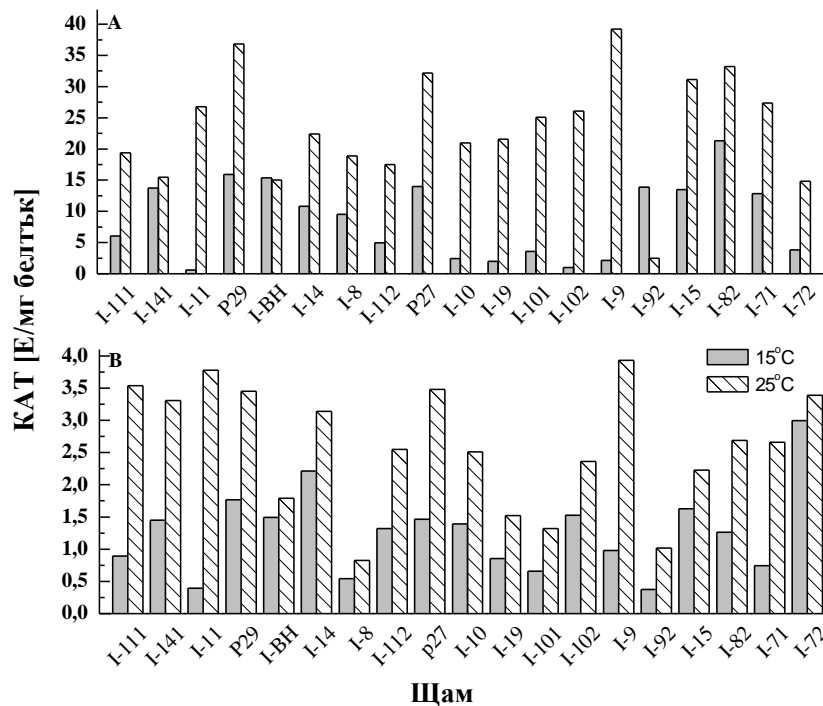
2.2.1. Сравнителен анализ на данните за синтеза на КАТ при различните щамове

Дълбочинното култивиране на изолираните щамове при различни температури (15 и 25°C) показва промени в растежа (Фиг. 2). Температурата значително влияе върху образуването на биомаса в зависимост от щамове. От общия брой изолирани щамове деветнадесет, показващи по-висока каталазна активност, са използвани за избор на моделни щамове. От тях шест щамове демонстрират по-високо количество биомаса при температура 15°C, отколкото при 25°C. Те могат да бъдат класифицирани като психротолерантни. Освен това, 11 щамове, които растат по-добре при 25°C, отколкото при 15°C, могат да бъдат класифицирани като мезофилни. Нашите резултати потвърждават публикуваните данни, че броят на изолираните психрофилни гъби е относително нисък. Както отбелязахме по-горе, микофлората на Антарктика се състои главно от мезофилни и психротолерантни щамове, поради значимите температурни колебания в региона.



Фигура 2. Зависимост между температурата на култивиране и натрупването на биомаса

Избрани антарктически щамове се култивират дълбочинно за 72 часа при 15 и 25°C. Вътреклетъчната каталазна активност е определена и представена на фигура 3А. Всички тествани щамове продуцират вътреклетъчна каталаза и при двете изследвани температури. Сред тях щамовете I-BH и I-14₁ показват независима от температурата синтеза на ензима. За разлика от това, шестнадесет продуциращи каталаза щамове при температура 25°C постигат максимална ензимна активност, която значително се понижава при 15°C. Както може да се види на Фиг. 2 и Фиг. 3А, температурният оптимум за каталазната активност съвпада с оптималната температура на растежа на повечето от изпитваните щамове (25°C). Интересно е, че щамовете I-1-4₁, I-1₆, I-10₂ и I-7₂ показват разлика в предпочитанията си за оптимална температура. Освен това, беше установено, че изолатът I-9₂ продуцира 5.5-кратно по-висока активност на каталаза при 15°C, отколкото при 25°C.



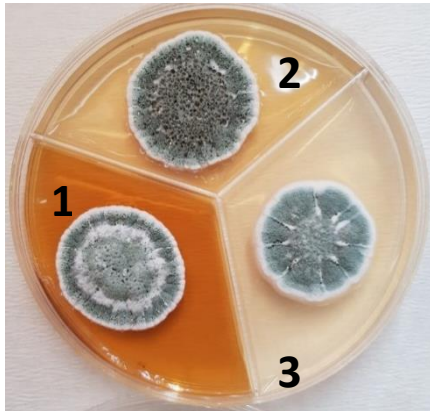
Фигура 3. Синтеза на КАТ от антарктически щамове, култивирани при различна температура. (А)-вътреклетъчна активност; (Б)-извънклетъчна активност

Способността на тестваните щамове да синтезират екстрацелуларният ензим, който предпазва клетките от екзогенно окислително увреждане, е представена на Фиг. 3Б. Почти всички антарктически изолати демонстрират синтез на извънклетъчна КАТ при дълбочинно култивиране. По-висока активност се установява при 25°C, отколкото при 15°C. Нашите резултати показват, че добра синтеза на извънклетъчна каталаза се установява при осем щамове, I- 11₁, I-14₁, I-11, P29, I-14, I-16, I-9 и I-7₂.

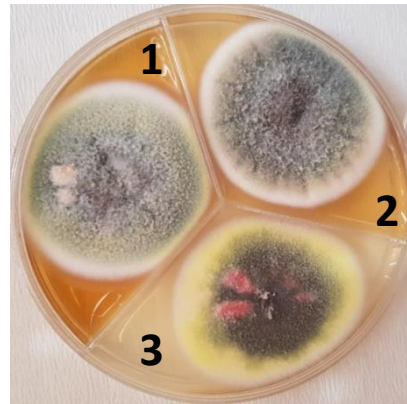
2.2.2. Избор на КАТ-синтезиращи щамове, принадлежащи към различни термални класове

След класифициране на изолатите към съответните термални класове, от тях са избрани два моделни щамове, които се характеризират с висока КАТ активност: *Penicillium griseofulvum* P29 – представител на психротолерантните антарктически гъби и *Penicillium chrysogenum* P27 - представител на мезофилните антарктически гъби. Двата щамове не само показват висока ензимна активност, но и я запазват стабилна в продължение на много ферментационни процеси, включително и при мащабен преход от колби на ферментор.

P. griseofulvum P29



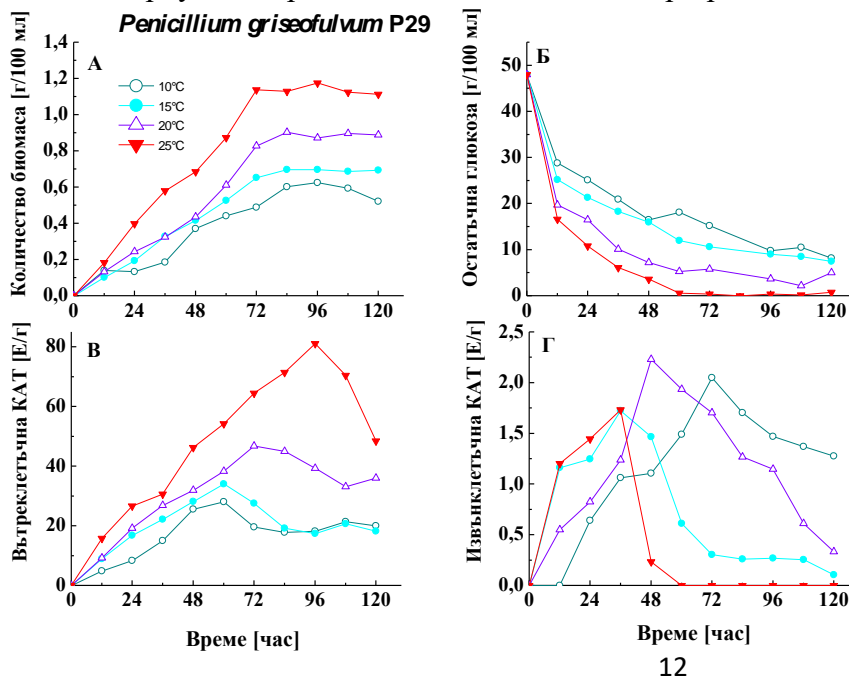
P. chrysogenum P27



Фигура 4. Макроскопски снимки на избраните моделни шамове, култивирани върху различни агарови среди: 1 – малцов агар; 2 – картофено-глюкозен агар; 3- Чапек-Докс агар.

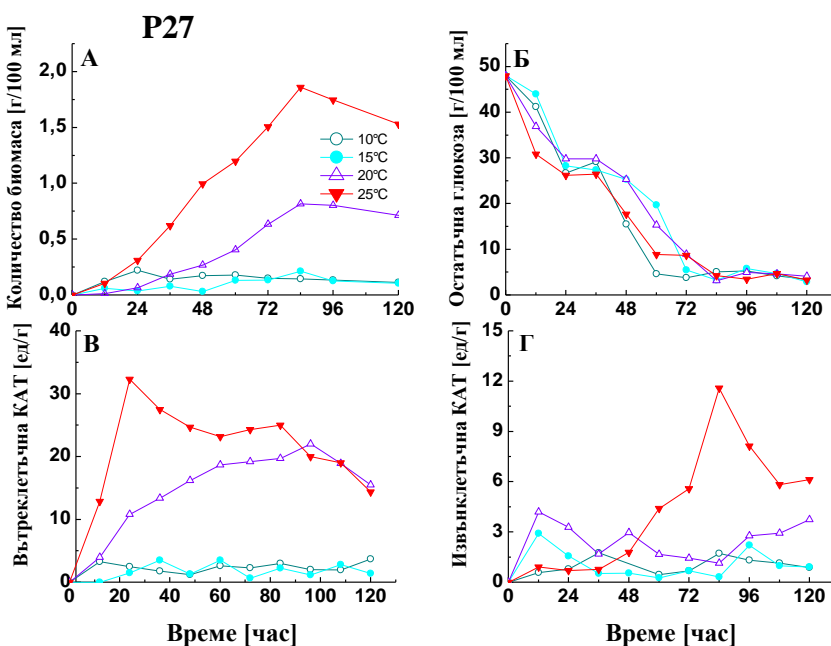
При култивиране на моделните шамове *P. griseofulvum* P29 и *P. chrysogenum* P27 върху различни агарови среди (Фиг. 4), те показват добър растеж, като максимален диаметър на колонията се постига на 5-ия ден. Промените в морфологията на шамовете в зависимост от средата включват промени в оцветяването на спорите. *P. griseofulvum* P29 продуцира най-тъмно оцветени спори върху КГА, а *P. chrysogenum* P27 – върху ЧДА. Много характерно за видовете *P. griseofulvum* е образуването на бели радиални зони върху МА, а за тези от вида *P. chrysogenum* – червеният пигмент върху ЧДА.

Проучено е развитието на двата шаме при различни температури в 3 л биореактори.



Фигура 5. Динамика на растежа (А), усвояването на глюкоза (Б) и синтезата на вътреклетъчна (В) и извънклетъчна (Г) КАТ при шам *P. griseofulvum* P29 култивиран в 3 л биореактор съответно при 10, 15, 20 и 25 °C

Както се вижда от представените резултати на Фиг. 5 А, въпреки че оптимална температура за щам *P. griseofulvum* P29 се очертава 25°C, той расте много добре както на 10, така и на 15 и на 20°C, което го причислява към психротолерантните представители на гъбите.



Фигура 6. Динамика на растежа (А), усвояването на глюкоза (Б) и синтеза на вътреклетъчна (Б) и извънклетъчна (Г) КАТ при щам *P. chrysogenum* P27, култивиран в 3 л биореактор съответно при 10, 15, 20 и 25°C

Подобни щамове се срещат много по-често от психрофилните, независимо от мястото на изолиране. Дори в екстремно студени местообитания над 50% от изолираните микроорганизми са факултативни, а не облигатни психрофили, които са способни да се развиват при температура от 0 до 25°C. В същото време, *P. chrysogenum* P27 (Фиг. 6А) показва растеж, типичен за мезофилни организми: не се развива при 10 и 15°C, показва ускорен растеж при повишаване на температурата до 20 и 25°C.

Усвояването на глюкозата също се влияе от температурата на развитие (Фиг. 5 Б и 6 Б). Понижаването на температурата на култивиране с 5 и 10°C предизвиква инхибиране на процеса. Психротолерантният щам демонстрира забавена консумация на глюкоза в сравнение с мезофилния. Вероятно, това е един от механизмите на адаптация към ниски температури.

Двата моделни щамове са ефективни продуценти на вътреклетъчна КАТ (Фиг. 5В и Фиг. 6В). Максимална синтеза се осъществява при 25°C, но щам *P. griseofulvum* P29 показва 2-пъти по-висока ензимна активност в сравнение с *P. chrysogenum* P27. Интерес представлява по-

високото ниво на КАТ при психротолерантният щам, установено при 10°C, което е указание за участието на този антиоксидантен ензим в адаптацията към ниските температури на развитие. Наличието на извънклетъчна КАТ и в двата моделни щама е рядко срещан феномен при гъбите. При психротолерантния щам *P. griseofulvum* P29 тази синтеза не се влияе от температурата на култивиране, докато при мезофилният *P. chrysogenum* P27 се наблюдава значително ускоряване на синтезата на извънклетъчната КАТ в края на стационарната фаза (84 ч) при 25°C (Фиг. 5 Г и Фиг. 6 Г).

3. РОЛЯ НА КАТАЛАЗИТЕ В КЛЕТЪЧНИЯ ОТГОВОР НА МОДЕЛНИТЕ ЩАМОВЕ КЪМ СТРЕС, ПРИЧИНЕН ОТ НИСКИ ТЕМПЕРАТУРИ

3.1. Морфологична адаптация при ниски температури

Проследяване промените в растежа, развитието и споролирането на филаментозни гъби в резултат на въздействие с ниски температури

Проучено е влиянието на различни температури (6, 10, 15 и 25°C) върху прорастването на спорите, растежната скорост, дължината и диаметъра на хифите и образуването на конидии от моделните щамове *P. chrysogenum* P27 и *P. griseofulvum* P29 (Табл. 2). Макроскопските проучвания потвърждават хипотезата, че изолираните антарктически щамове притежават различни механизми за успешно адаптиране към ниските температури.

Таблица 2. Развитие на колонии от моделните щамове при различни температури на култивиране

T°C	<i>P. chrysogenum</i> P27				<i>P. griseofulvum</i> P29			
	диаметър на колонията [мм]/ време на култивиране [дни]				диаметър на колонията [мм]/ време на култивиране [дни]			
	3	5	7	9	3	5	7	9
6	-	-	-	0.6	0.1	0.9	1.2	1.6
10	-	-	0.5	0.9	0.2	0.9	1.5	1.8
25	3.8	6.8	9.0	9.0	3.1	6.7	8.4	8.4
30	2.7	5.9	7.3	7.3	2.2	4.9	6.1	6.1

Наблюдава се ускорено разрастване на субстратния мицел и в по-малка степен на въздушния. Култивирането при ниски температури води до кръгово разрастване на колонията под формата на многоклетъчни меристемни клъстери.

Таблица 3. Скорост на растеж на хифите на щам *P. griseofulvum* P29 и *P. chrysogenum* P27 при различни температури

T°C	Скорост на растеж на хифите (мм/ден)	
	P27	P29
6	0.00*	0.00***
10	0.09***	0.23***
15	2.87**	1.25**
25	5.76**	4.87*

^aСтойностите са изчислени от растежните криви между 3-ия и 24-ия ден и са средни от измерванията на 18 - 36 хифи. Значимостта на коефициента на корелация е както следва: *(p<0.05); **(p<0.01) и ***(p<0.001)

Скоростта на удължаване на хифите също е в зависимост от температурата (Табл. 3). Двата щама показват по-добро развитие при 15 и 25°C. При ниските температури за *P. griseofulvum* P29 се установява по-бърз растеж и по-висока скорост на удължаване в сравнение с *P. chrysogenum* P27.

3.2. Промени в биомаркерите на оксидативен стрес

3.2.1. Проследяване нивото на генерирани СОР в нормофизиологични условия и в условията на краткотраен студов стрес

Проследени са промените в биомаркерите на оксидативен стрес в клетките на моделните щамове, поставени в условията на краткотраен (6 часов) нискотемпературен стрес (15°C и 6°C) и последващо възстановяване на оптималната им температура на растеж.

Таблица 4 демонстрира ефекта на ниските температури върху промените в нивата на супероксидния радикал ($\bullet\text{O}_2^-$) и H_2O_2 в клетки от двата моделни щама. Във всички варианти се определя повишено ниво на тези радикали.

Драстичното снижаване на температурата предизвиква дисбаланс в оксидо-редукционния статус и на двата щама чрез ускорено генериране на СОР. Получените резултати демонстрират, че този процес е по-активен:

- в митохондриалните фракции, отколкото в целите клетки;

□ при мезофилния щам *P. chrysogenum* P27, в сравнение с психротолерантния *P. griseofulvum* P29

Както е известно, дори клетките в нормално физиологично състояние, образуват СОР в резултат на едноелектронната редукция на 2% от консумирания кислород. В условията на различни екстремни въздействия продукцията на тези радикали се ускорява (Gómez-Toribio et al., 2009; Gocheva et al., 2009; Krumova et al., 2009; Sánchez, 2017).

Таблица 4. Повишаване продукцията на O_2^- и H_2O_2 в цели клетки и митохондриални фракции при *P. griseofulvum* P29 и *P. chrysogenum* P27, подложени на нискотемпературен шок

Вариант	$\bullet O_2^-$ (мкМ/мг сухо тегло. час)			
	<i>P. griseofulvum</i> P29		<i>P. chrysogenum</i> P27	
	Цели клетки	Митохондриална фракция	Цели клетки	Митохондриална фракция
Контрола	3.59±0.03	5.24±0.03	4.70±0.02	0.55±0.01
15°C	4.15±0.04	6.50±0.01	6.78±0.01	2.25±0.01
6°C	7.05±0.10	7.47±0.05	11.06±0.07	3.63±0.02

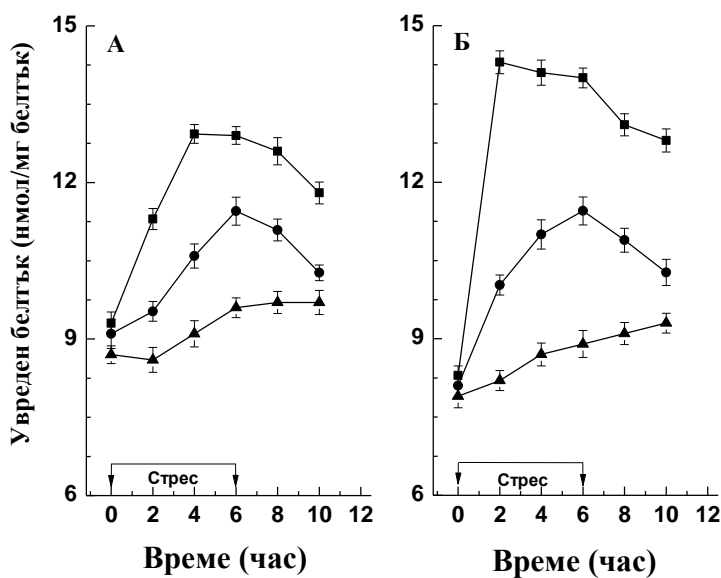
Вариант	H_2O_2 (мкМ/мг сухо тегло. час)			
	<i>P. griseofulvum</i> P29		<i>P. chrysogenum</i> P27	
	Цели клетки	Митохондриална фракция	Цели клетки	Митохондриална фракция
Контрола	5.68±0.18	12.11±0.10	11.39±1.10	6.40±0.28
15°C	6.22±0.40	15.00±0.37	13.72±1.09	9.79±0.33
6°C	9.18±0.11	21.57±0.44	14.61±0.56	11.58±0.43

Нашите експерименти показват, че в условията на нискотемпературен стрес този процес се активизира в значителна степен в зависимост от степента на стреса и от температурната характеристика на моделния щам. В научната литература не се среща често такъв директен анализ на промените в нивото на СОР при филаментозни гъби. Chattopadhyay et al. (2011) съобщават, че продукцията на СОР в *Pseudomonas fluorescens* MTCC 667,

изолирани от антарктически проби, е по-висока при третирането на бактериалните клетки с ниски температури, в сравнение с тази при оптималните 22°C. Според авторите, нискотемпературният стрес предизвиква снижаване на скоростта на ензимните реакции, което, от своя страна, води до спад в консумирането на АТФ и натрупването на електрони в някои етапи на дихателната верига. Тази ситуация е база за рязко повишаване на количеството на СОР.

3.2.2. Определяне нивото на оксидативно увредените белтъчни молекули чрез количеството на карбонилните групи

Проучихме промените в количеството на оксидативно увредените белтъци в клетки от моделните щамове, поставени в условията на 6-часов нискотемпературен стрес (15°C и 6°C) и във фазата на възстановяване на оптималната температура на развитие (Фиг. 7).



Фигура 7. Продукция на оксидативно увредени белтъци при психро-толерантния щам *P. griseofulvum* P29 (А) и мезофилния щам *P. chrysogenum* P27 (Б) при оптимална температура (▲) и в следствие на стреса при понижаване на температурата от оптимална до 6°C (■) и до 15°C (●).

Съдържанието на карбонилни групи в контролния вариант на двата антарктически щама не показва значими промени. Всички останали варианти, обаче, демонстрират рязко повишаване на този индикатор веднага след започването на стреса, което продължава с времето. Нарастването на количеството на карбонилните групи е в зависимост от степента на стреса и от вида на щама. Въздействието с 15°C и при двата щама води до непрекъснато повишаване увреждането на белтъците до края на стреса и снижаване в последвалата фаза

след него. При 6°C се отбелязва рязко и бързо покачване в първите 2-4 часа и запазване на нивото в останалите изследвани периоди.

Психротолерантният щам показва по-висока стабилност по отношение на оксидативното увреждане на белтъците в сравнения с мезофилния. Освен това, въпреки че след спирането на стреса се отбелязва значително намаляване на количеството на карбонилните групи, стойностите в края на експеримента остават много по-високи от тези на контролния вариант. Получените резултати доказват ролята на COP за промените в клетъчните белтъци като част от адаптацията към екстремно ниски температури. Подобен клетъчен отговор е установен при други мицетни култури, подложени на оксидативен стрес (Hua et al., 2017). Според Li и сътр. (2008), индуцираното от температурата карбонилиране на белтъците засяга най-вече дихателните ензими и тези, локализирани в митохондриите, тъй като COP от дихателната верига са главният източник на оксидативното увреждане, установено по време на стрес.

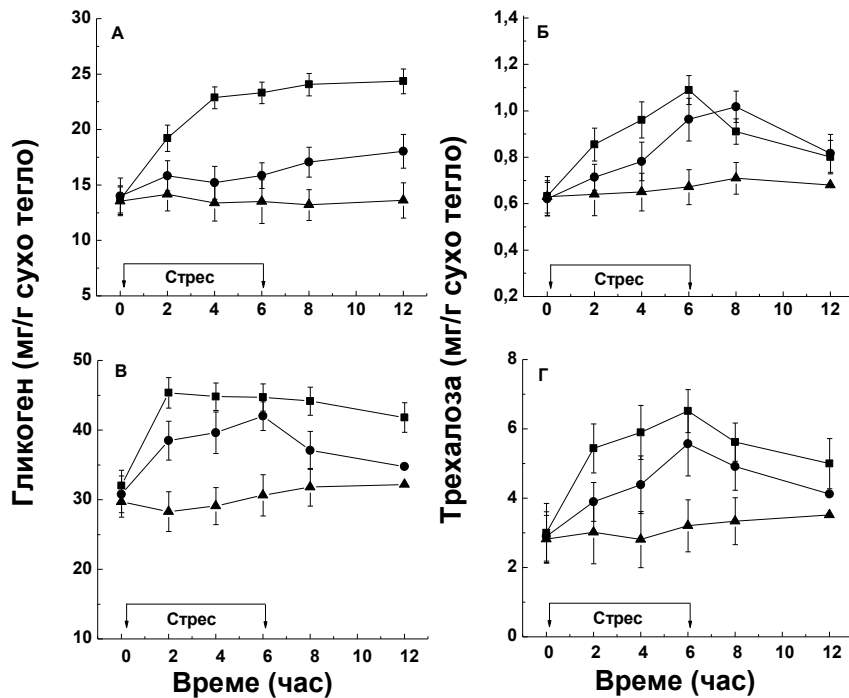
3.2.3. Изследване промените в нивото на резервни въглехидрати – гликоген и трехалоза

Към биоиндикаторите на оксидативния стрес се отнасят и резервните въглехидрати – гликоген и трехалоза. Синтезата на гликоген и трехалоза след понижаване на температурата от оптималната до 6°C или 15°C е представена на Фиг. 8.

Наблюдава се рязко повишаване на съдържанието на двете резервни съединения веднага след започване на стреса.

В експериментите с психротолерантният щам *P. griseofulvum* P29 количеството на гликоген в клетките се повишава от 1.2- до 1.8-пъти над основното ниво, като се придружава от 1.7-пъти по-високо количество на трехалозата. При мезофилния щам *P. chrysogenum* P27 е определено по-високо начално ниво на двата резервни въглехидрата, в сравнение с *P. griseofulvum* P29. В условията на стрес (6°C или 15°C) се отчита допълнително значително нарастване на количеството на гликогена (1.3- и 1.4 пъти) и на трехалозата (2.2- и 1.9 пъти). Тези данни ясно демонстрират зависимостта на количеството на резервните въглехидрати от степента на стреса и от температурната характеристика на моделния щам. След

възстановяване на оптималните условия на култивиране, нивото на гликогена и трехалозата показва тенденция към намаляване до нивото на контролния вариант.



Фигура 8. Съдържание на гликоген (А, В) и трехалоза (Б, Г) при *P. griseofulvum* P29 (А, Б) и при *P. chrysogenum* P27(В, Г) при оптимална температура (▲) и в следствие на стреса при понижениe на температурата до 6°C (■) или до 15°C (●).

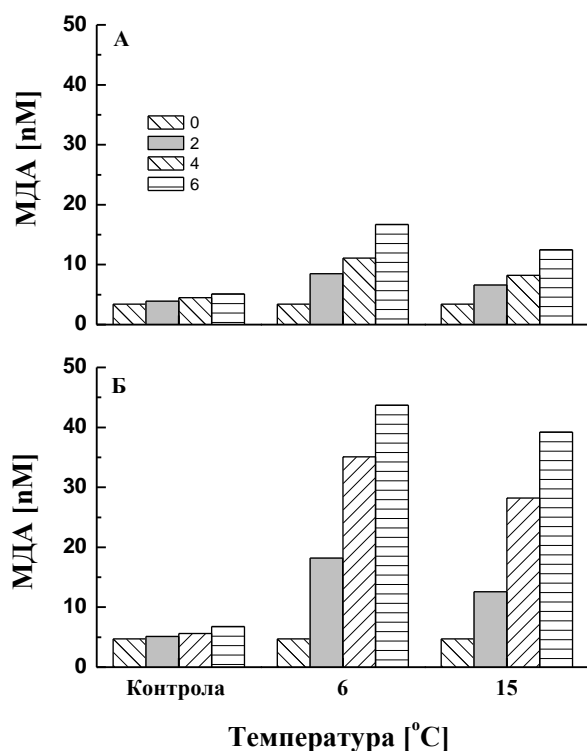
Получените с двата моделни щама резултати демонстрират, че трехалозата и гликогенът са от съществено значение за развитието на гъби, изолирани от екстремно студени местообитания. Предполага се, че трехалозата минимизира оксидативното увреждане на белтъци и липиди, които в противен случай биха се разградили от въздействието на СОР (da Costa et al., 2008; Jain and, 2009). Тя забавя скоростта на образуване на белтъчни агрегати и присъствието ѝ в двойния липиден слой е задължително.

3.2.4. Изследване на липидната пероксидация като маркер за степента на мембранныя интегритет

Като маркер на липидната пероксидация е определено количеството на малондиалдехид (МДА) в стресирани и не-стресирани клетки (Фиг. 9).

След снижаване на температурата до 6 и 15°C се отчита значително по-високо количество малондиалдехид (МДА) в сравнение с контролния вариант. Това повишаване е в зависимост от степента на стресовия фактор и нараства пропорционално на продължителността на култивиране в условия на студов стрес.

Ускореното натрупване на увредени липиди при мезофилния щам *P. chrysogenum* P27 е по-значимо от това при психротолерантния щам *P. griseofulvum* P29, който проявява по-висока толерантност към ниските температури, вероятно поради неговата адаптация към екстремни температури.



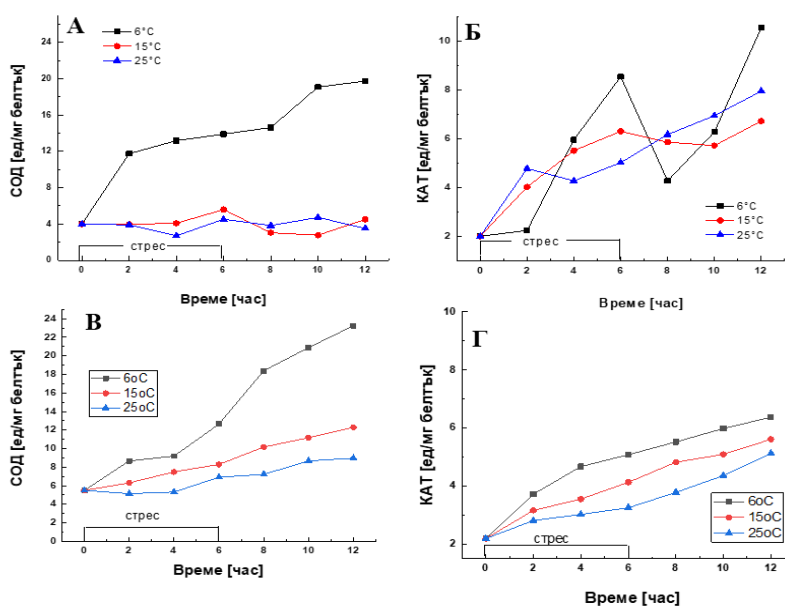
Фигура 9. Ниво на липидната пероксидация в клетки от щам *P. griseofulvum* P29 (А) и *P. chrysogenum* P27 (Б), култивирани при оптимална температура (контрола) и в условия на студов стрес (6 и 15°C) в продължение на 6 часа

3.2.5. Изследване активността на ензимите от антиоксидантната защита

Клетъчният отговор срещу оксидативния стрес включва промени в антиоксидантната ензимна защита. В проведените експерименти е проучена активността на антиоксидантните ензими СОД и КАТ в условията на кратък нискотемпературен стрес (Фиг. 17). Въздействието с температури 6 и 15°C води до активиране на антиоксидантната ензимна защита. Промените в активността на първия антиоксидантен ензим, СОД, по време на стреса и в след-стресовия период са представени на Фиг. 10 А, В.

Очертава се ясно изразено повишаване на активността на СОД при понижаване на температурата на култивиране до 6°C. На 6-ия час от началото на стреса това увеличение е 2

или 3 пъти в сравнение с контролните варианти, съответно за *P. griseofulvum* P29 и *P. chrysogenum* P27. Тази тенденция продължава часове след спиране на стресовото въздействие. На 12^{-ия} час активността на СОД в мицела на *P. griseofulvum* P29, третиран с 6°C, е около 6 пъти по-висока от контролния вариант. При *P. chrysogenum* P27 промяната е около 3 пъти. Краткотрайният стрес, причинен от снижаване на температурата до 15°C, не води до значителни промени и тенденцията е по-близка до контролния вариант. При изследването на втория антиоксидантен ензим понижаването на температурата до 15 и 6°C също индуцира синтезата на втория антиоксидантен ензим, КАТ (Фиг. 10 Б, Г). Клетъчният отговор на културите от двата антарктически щама показват по-ясно изразено повишаване на КАТ активност при въздействие с 6°C в сравнение с този при 15°C. При шам *P. griseofulvum* P29 се наблюдават характерните за неговата синтеза два максимума на активността.



Фигура 10. Промени в активността на антиоксидантните ензими СОД (А, В) и КАТ (Б, Г) при шам *P. griseofulvum* P29 (А, Б) и *P. chrysogenum* P27 (В, Г), култивирани при оптимална температура (контрола) и в условия на студов стрес (6 и 15°C) в продължение на 6 часа

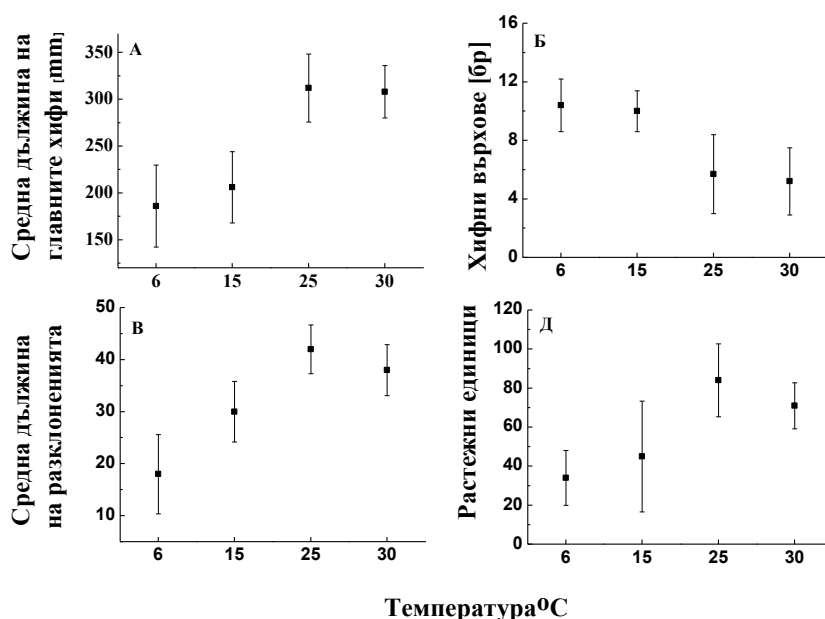
Резултатите очертават по-силно изразено повишаване на СОД за мезофилния шам, докато активирането на антиоксидантната ензимна защита при психротолерантния се дължи в по-голяма степен на повишената КАТ активност. Едно възможно обяснение е по-високото ниво на H_2O_2 при култури от *P. griseofulvum* P29. За обезвреждането на СОР, *P. chrysogenum* P27 индуцира синтезата на СОД в по-голяма степен, докато *P. griseofulvum* P29 повишава по-съществено нивото на КАТ ензим.

Това потвърждава финия баланс между оксидантите и антиоксидантната защита при въздействие с температура. Нивата на различните видове СОР действат като стрес сигнали, които контролират експресията на съответните гени, кодиращи антиоксидантните ензими.

Въз основа на получените резултати се установява, че щам *P. griseofulvum* P29 е по-добър продуцент на ензима каталаза. Като психротолерантен щам той е потенциален продуцент на термочувствителни ензими и следващите експерименти продължават с него.

Ултраструктурни промени в моделния щам, култивиран в нормоокси условия и в условията на нискотемпературен стрес

Проучени са и някои основни параметри на фунгалната морфология при дълбочинно култивиране на щам *P. griseofulvum* P29.



Фигура 11. Средни стойности на дължината на главните хифи (А); броя на връхчета (Б); дължината на разклоненията (В) и броя на растежните единици (Г) в мицел от щам *P. griseofulvum* P29, култивиран дълбочинно при температура 6, 15, 25 и 30°C

Резултатите, отразени на Фиг. 11 показват, че температури от 6 и 15°C не са най-благоприятни за развитието на моделния щам. В тези случаи се наблюдава по-малка дължина

на главните хифи (Фиг. 11А) и на разклоненията (Фиг. 11Б), а така също и най-малък брой на растежните единици. (Фиг. 11Г).

При температури 25 и 30°C се отчитат много по-дълги хифни елементи с по-малък брой разклонения. При тези условия намалява и броя на растежните единици. Подобни морфологични промени са характерни за развитие на филаментозните гъби в условия на стрес. Kreiner и сътр. (2003), както и Islam и сътр. (2017) доказват подобни явления при *A. niger* и *A. nidulans*, култивирани в присъствие на различни стрес фактори. Клетъчният отговор при щама, освен понижена скорост на растеж, включва и образуването на пелети с къси и силно разклонени хифи.

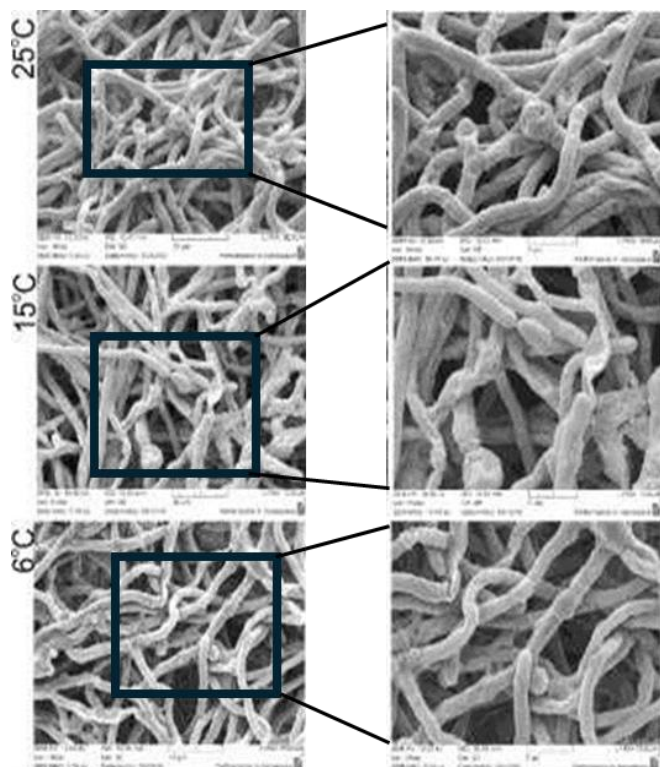
Определяне ултраструктурните промени в клетките, подложени на студов стрес

С помощта на електронна микроскопия са определени ултраструктурните промени в клетките на щам *P. griseofulvum* P29, поставени в условията на нискотемпературен стрес и са проследени електронната им плътност, хомогенност на цитоплазмата, съдържанието на свободни рибозоми, натрупването на мастни капчици в близост до цитоплазмената мембрана, образуване на вакуоли, състоянието на митохондриите в хифите. В пробата, култивирана при оптималната температура 25°C, се установява вариране на повърхностния релеф на хифите, подобен на този, наблюдаван от нас при други видове филаментозни гъби. Интерпретираме това разнообразие с наличието на хифи в различна степен на зрялост.

Култивираните при оптималната за щама растежна температура от 25°C клетки се приемат за „контрола“ в настоящия експеримент. Проби са вземани на час „0“ и час „6 часа стрес“.

Сканираща електронна микроскопия

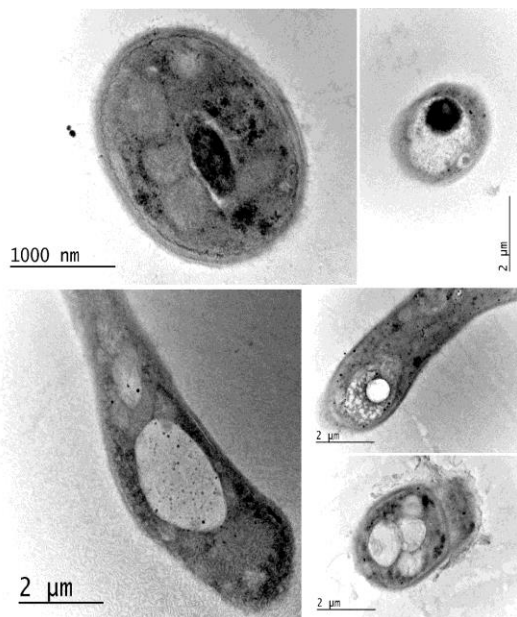
По-младите хифи са тънки, фини и с гладка повърхност. По-зрелите се характеризират с наличието на участъци с вълнист релеф и в тях се виждат вдлъбнатини – участъци, от които са се откъснали млади хифи. Пробата, подложена на 6-часов стрес при 15°C, съдържа гладки фини хифи, подобни на установените за контролната проба. По-зрелите хифи, обаче, имат увреден релеф - груба, неравна повърхност. В пробата, подложена на 6-часов стрес при 6°C, преобладават хифите с нагърчена повърхност и груб релеф, независимо от тяхната дебелина (Фиг. 12).



Фигура 12. Сравнително сканиращо електронно микроскопско изследване относно ефекта на температурния стрес върху повърхностния релеф на хифите на *P. griseofulvum* P29

Трансмисионна електронна микроскопия

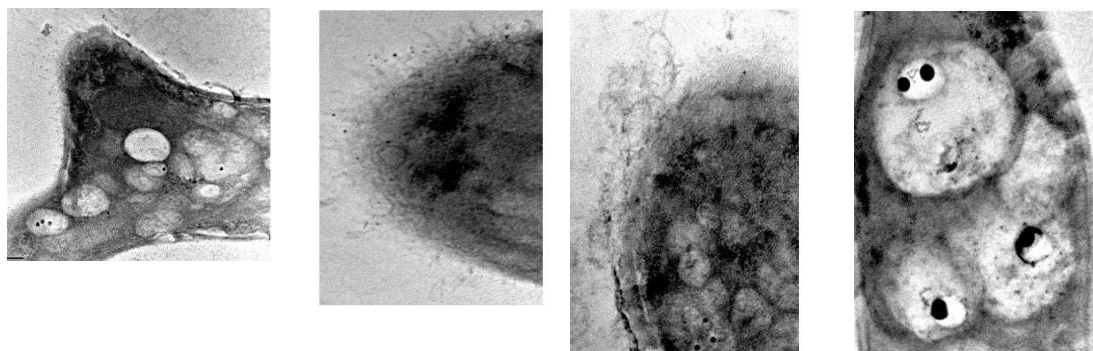
Ултраструктурните характеристики на двете проби не се различават и се описват общо. На Фиг. 13 пробите са подредени според степента на тяхното развитие. Младите хифи имат сравнително плътна цитоплазма. Клетъчната стена съдържа до три слоя с различаваща се електронна плътност и от външната ѝ страна се установяват фини филаментозни елементи. Клетъчната мембрана е с фини вълнисти очертания, като в някои участъци се наблюдават по-малко или повече отчетливо очертани ейзозоми. Митохондриите са с умерена електронна плътност и ясно очертани кристи. В хода на диференциацията в хифите се оформят вакуолите. Характерно за тях е наличието на електронно плътни елементи – първоначално единични зрънца, които впоследствие могат да се обединят в по-големи включения, а в други случаи съдържимото на вакуолата формира електронно-плътна мрежа.



Фигура 13. ТЕМ на култивиран при Т 25°C мицел от щам *P. griseofulvum* P29

По-нататъшните етапи от диференциацията на хифите се характеризират с развитие на процеси на автолиза. Митохондриите са дезинтегрирани, с просветлен матрикс единични кристи. Върху клетъчната стена в такива участъци се установява натрупване на груб филаментозен материал, вероятно съответстващ на наблюдавания на СЕМ неравен релеф.

След 6-часов температурен стрес при 15°C (Фиг. 14) основните увреждания в ултраструктурата на клетките се отнасят до митохондриите и клетъчната стена.



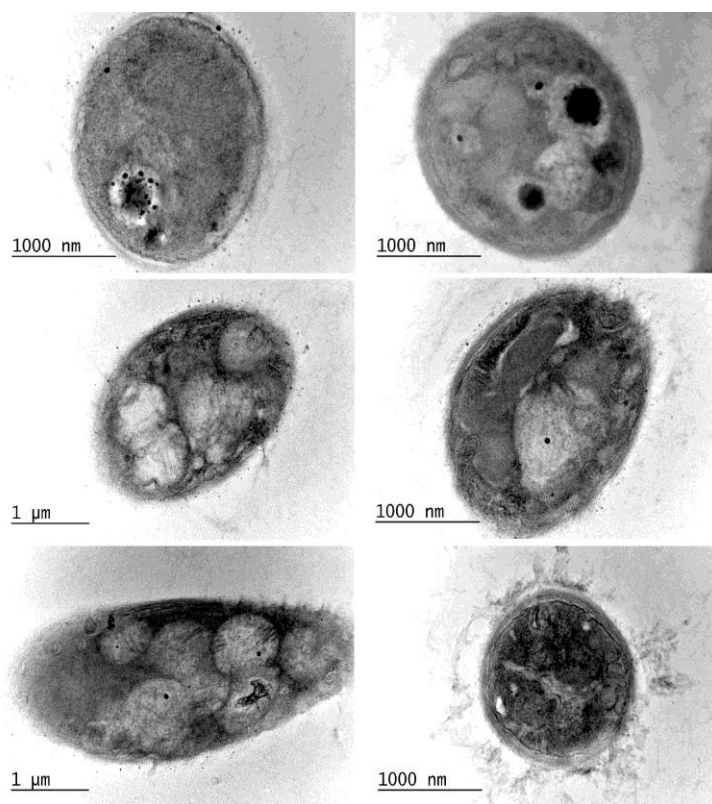
Фигура 14. Клетки на *P. griseofulvum* P29 след 6-часов температурен стрес при 15°C

Съществено се увеличава количеството раздути митохондрии с просветлен матрикс и редуциран брой кристи. Клетъчните стени на хифите често са с неравномерна структура. Там,

където се установяват извънклетъчни филаментозни образувания, подобни на наблюдаваните при контролата, е характерно допълнително наличие на електронно плътни фини гранулки. В по-силно нарушените участъци се установява нарушена плътност на клетъчната стена и локуси на нейното разрушаване.

В сравнение с пробата, стресирана при температура 15°C, 6-часовият температурен стрес при 6°C (Фиг. 15) води до съществено разширяване на обхвата на алтерациите, описани по-горе.

Дегенеративните нарушения в структурата на митохондриите са типични. Клетъчните стени са неравномерни, с участъци на изтъняване и/или разслояване и отлющване, като също така се установява и повърхностно натрупване на детритен материал. Като съществена разлика от по-горе описаните проби, тук се отчита сериозна алтерация в процесите, свързани с динамиката на клетъчната мембрана.



Фигура 15. Клетки на *P. griseofulvum* R29 след 6-часов температурен стрес при 6°C

Ейзозомоподобните структури повсеместно навлизат дълбоко навътре в цитоплазмата на хифите. В работна интерпретация може да се допусне, че нискотемпературният стрес нарушава митохондриалната функция и процесите на обновяване на повърхностните компоненти на хифите. При съпоставяне на данните, получени с двата електронномикроскопски метода, се установява задебеляване на релефа на хифите, вероятно в резултат от натрупването на елементи от клетъчните стени.

Температурният стрес води до промени в клетъчните органели. Най-чувствителни са митохондриите като уврежданията в тяхната ултраструктура са типични и повсеместни и за двете проби, подложени на нискотемпературен стрес. Клетките при 6°C се характеризират със съществено разширяване на ейзозомите, което е индикация за нарушени процеси на експорт и/или импорт на макромолекули, или нарушения в процесите на обновяване на клетъчната мембрана

4. КАТАЛАЗНИ ГЕНИ

4.1. Идентифициране и секвениране на гените, кодиращи белтъци с каталазна активност при моделния щам

4.1.1. Идентифициране на гените, кодиращи белтък с КАТ активност

В резултат на проведените молекулярно-генетични експерименти са идентифицирани и секвенирани каталазни гени при антрактически щам *P. griseofulvum* P29. При анализа на получените секвенции (нуклеотидните последователности) са установени различни типове каталазни гени при изолати с различна активност и различен температурен оптимум. Получените данни са отлична основа за провеждане на следващите изследвания.

Чрез градиентен PCR (апарат BioRad) са оптимизирани условията за провеждане на PCR-реакции с различните двойки праймери. В молекулярно-генетичните експерименти са използвани: DNA Purification Kit (Himedia), QB-96 Satellite Gradient thermal PCR cycler (LKB Vertriebs GmbH, Vienna, Austria), PCR master mix (GenetBio, South Korea), Gene JET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). PCR- продуктите бяха визуализирани чрез 1% гел- електрофореза.

4.1.2. Селектиране, пречистване и секвениране на получените генни фрагменти

На базата на получените резултати от идентифициране на антарктическият изолат P29 като *Penicillium griseofulvum*, са проучени пълните геномни секвенции на този вид, достъпни

в обществените бази данни. В пълната секвенция на вида *P. griseofulvum*, отбелязана под номер GenBank GCA_001561935.1, се установяват 5 каталазни гена (Banani et al. 2016). За да се докаже наличието на тези гени и в щам *P. griseofulvum* P29 са разработени 5 двойки специфични праймери. В резултат на проведените секвенционни анализи са получени продукти (около 550-600 bp) и се установено, че те са част от посочените 5 КАТ гена. Като следваща стъпка са разработени множество нови праймери, чрез които е получена пълната секвенция на гените.

Каталазни гени при антарктически щам *P. griseofulvum* P-29 - пълно секвенирани:

1. *cat1* - кодира бифункционален каталазно-пероксидазен ензим, състои се от 2444 bp и кодира белтък от 744 аминокиселини. Най-близкото съвпадение на тази последователност (MW618002) е с ген каталазо-пероксидаза *katG* (PGRI_023940) от *P. griseofulvum* PG3 (GenBank GCA_001561935.1; 99,72% подобие) и с *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (GenBank AM920427.1; 87,44% подобие) (Van Den Berg et al., 2008; Banani et al., 2016). Очакваното молекулно тегло на ензима е ~82 кДа (Uniprot). Фрагмент от изследвания ген от 718 bp, има 99% подобие с бактериален каталазен ген *katG* от *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 (GenBank: CP000494.1, Giraud et al. 2007).

2. *cat2* - кодира монофункционален каталазен ензим, състои се от 2445 bp и кодира белтък от 730 аминокиселини. Въз основа на мегабластно търсене в базата данни с нуклеотидни секвенции NCBI, най-близкото съвпадение с нашата последователност (MW618003) има каталазен ген PGRI_045000 от *P. griseofulvum* PG3 (GenBank GCA_001561935.1; идентичност 99,84%) и *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (GenBank AM920431.1; идентичност 86,41%) (Banani et al. 2016; Van Den Berg et al. 2008). Очакваното молекулно тегло на ензима е ~80 кДа (Uniprot).

3. *cat3* – състои се от 1673 bp и кодира белтък от 501 аминокиселини. Най-близките попадения, съответстващи на нашата последователност MW618004 са ген за каталаза PGRI_072960 от *P. griseofulvum* PG3 (GenBank GCA_001561935; идентичност 99,94%) и от *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (GenBank AM920437.1; идентичност 91,24%). Очакваното молекулно тегло на ензима е ~57 кДа (Uniprot).

4. *cat4* - кодира монофункционален каталазен ензим. Състои от 1786 bp и кодира белтък от 490 аминокиселини. Най-близко съвпадение с нашата последователност е тази на

ген за каталаза PGRI_034520 от *P. griseofulvum* PG3 (GenBank GCA_001561935; идентичност 99,94%). Въз основа на мегабластно търсене на база данни с нуклеотидни секвенции, най-голяма прилика има с *P. rubens* Wisconsin 54-1255 (AM920431.1; идентичност 82,19%). Очакваното молекулно тегло на ензима е ~54 кДа (Uniprot).

5. *cat5* - кодира монофункционален каталазен ензим, състои се от 1501 bp и кодира белтък от 482 аминокиселини. Най-близкото съвпадение на нашата последователност MW618006 е ген за каталаза PGRI_025320 от *P. griseofulvum* PG3 (GenBank GCA_001561935; идентичност 99,73%), най-голямо сходство има с ген за каталаза (*cnsD*) при *Penicillium sp.* YU-2016 (KU932038.1; идентичност 95,28%) (Lin et al., 2016). Очакваното молекулно тегло на ензима е ~54 кДа (Uniprot).

Установените пет каталазни гена в антарктическият щам *P. griseofulvum* P29 не са изненада. Според литературата гъбите имат повече от един каталазен ензим (Hansberg et al., 2012). Фунгалните КАТ формират група от ензими, които показват разнообразие по отношение на тяхната структура, местоположение и функция. Според филогенетичните анализи, броят на каталазните ензими варира при различните видове. Наличието на най-малко четири диференциално регулирани каталази е критерий за голямата способност на филamentosните гъби да обезвреждат H₂O₂ (Kawasaki and Aguirre, 2001). В *Pleurotus ostreatus* са доказани две различни каталази, които играят различни роли при развитието или в условията на температурен стрес (Wang et al., 2017). За *Sclerotinia sclerotiorum* са докладвани две каталази, свързани с антиоксидантния отговор, чувствителността към QoI фунгицид и патогенността (Huang et al., 2021). В литературата има данни за пет каталази във филamentosната гъба *Podospora anserina*, някои от тях имат основна роля по време на разграждането на лигноцелулозата (Bourdais et al., 2012). Наличието на секреторна каталаза 2, която участва в катаболизма на фенолни вещества, е открито в *Chaetomium thermophilum* var. *disitum* (Chovanová et al., 2019).

Генът *cat1* в щам *P. griseofulvum* P29 ген, кодиращ бифункционален ензим каталаза-пероксидаза, принадлежи към семейството на пероксидазите, подсемейство пероксидаза/каталаза. Подобни протеини са описани в *P. coprophilum*, *P. nordicum*, *P. polonicum*, *P. flavigenum* и *P. crustosum*. Според CDD (NCBI) и ExPASy, предполагаемият ензим е димер с две идентични субединици, като всяка субединица се състои от два

структурно хомоложни домена с топология, подобна на тази на пероксидаза от клас I. Активният сайт е в N-терминален домейн. Мотивът, свързващ хем, присъства само в N-терминалния домен. Функцията на C-терминалния домейн все още не е ясна (Bertrand et al., 2004). Този ензим принадлежи към подгрупа от хем-зависими пероксидази и катализира многостепенна окислителна реакция, включваща водороден пероксид като електронен акцептор. Каталазо-пероксидазите могат да проявяват както каталазна, така и широко спектърна пероксидазна активност, в зависимост от концентрацията на водороден пероксид. Фрагмент от гена *cat1* на 718 нуклеотида има 99% сходство с гена на бактериалната каталаза *katG* от *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 (GenBank: CP000494.1, Giraud et al., 2007). Подобни данни са докладвани и от други автори (Klotz and Loewen, 2003; Marcet-Houben and Gabaldón, 2010). Това вероятно е част от механизма за адаптация към околната среда.

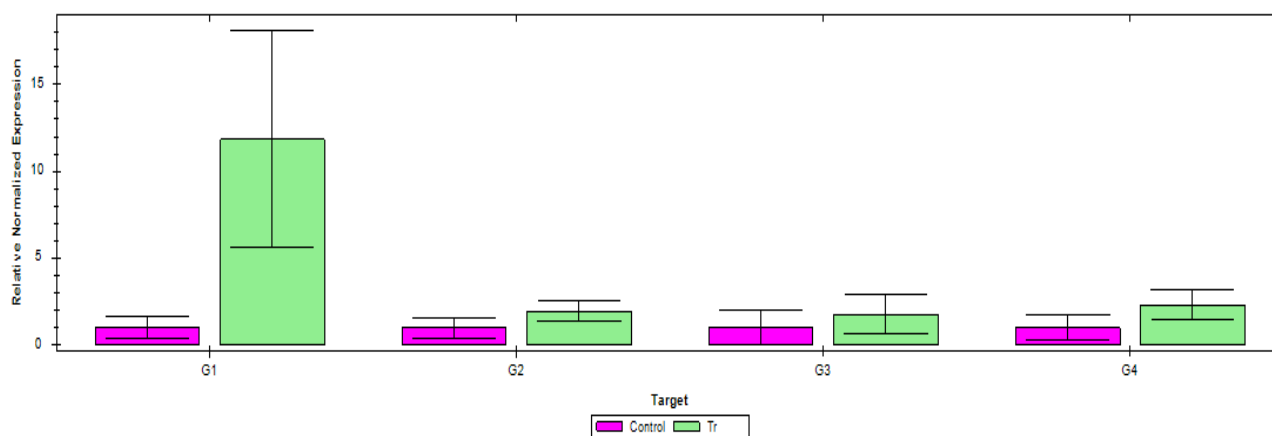
Гените *cat2*, *cat3*, *cat4* и *cat5*, кодиращи монофункционални, съдържащи хем каталази, принадлежат към семейството на каталазите. Гените *cat3* и *cat4* кодират фунгални каталази, подобни на дрождевите А и Т. Това семейство КАТ има относително малък размер на субединицата и образуват тетрамери и използват водороден пероксид за окисляване на различни субстрати като алкохол или феноли.

4.2. Изследване на експресията на кат гени, установени в моделния щам

Изследвана е експресията на 5^{-те} каталазни гена от щам *P. griseofulvum* P29, култивиран при температури 10°C и 25°C. Създадени са специфични праймери за RT-PCR за 5^{-те} каталазни гена и три референтни гена (*housekeeping genes*) за вида *P. griseofulvum*. При използване на всички двойки праймери се получи един продукт с големина около 120bp. Доказана е чистотата на РНК след пречистване с DNase I. Проведена е оценка за работата на праймерите с cDNA и SYBR® Green Supermix. с 8-те двойки праймери в 2 повторения. Получени са продукти ~120 bp при всичките 16 реакции и са установени две отрицателни контроли.

Избор на референтен ген (*housekeeping gene*). Създадени са три двойки праймери за референтни гени: 18S, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Actin. След анализ на резултатите 18S и GAPDH гените са избрани да бъдат използвани като референтни, те показват относително еднаква експресия при двата температурни режима.

Основен експеримент по изучаване експресията на 5 каталазни гена в моделния щам, култивиран при нормофизиологични условия и в условия на нискотемпературен стрес. Нивата на експресия на откритите каталазни гени са изследвани при 10 и 25°C. Използвана е 96-ямкова плака (Multiplate™ 96-Well PCR Plates, low profile, unskirted, clear) за CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System. Данните са анализирани чрез относително количествено определяне с threshold cycle method ($\Delta\Delta C_t$) и CFX Maestro Software (Bio-Rad). Установено е, че гените *cat1*, *cat2*, *cat3*, *cat4* имат статистически значима повишена експресия при 10°C, като най-голямата разлика се наблюдава в гена *cat1* (Фиг. 16). Вероятно, функцията на каталазо-пероксидазен ген *cat1* е свързана с антиоксидантния отговор и елиминирането на СОР в клетките на мицела при ниски температури.



Фигура 16. Относителна експресия на иРНК определена по метода $\Delta\Delta C_q$ за гените: *cat1*, *cat2*, *cat3* и *cat4* чрез Reverse Transcription real-time PCR. 18S и GAPDH са приложени като референтни гени. Всяка проба се анализира трикратно от три независими експеримента. Легенда: G1-*cat1* ген, G2-*cat2* ген, G3-*cat3* ген и G4-*cat4* ген, контрол - 25°C, tr - 10°C.

В литературата има данни за индуцирането на каталазни гени в резултат на температурен стрес за някои видове гъби, като *S. cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *A. nidulans*, *P. marneffeii* и *P. brasiliensis* (Wang et al., 2017b). В нашето проучване четири каталазни гена реагират при температура 10°C. Те демонстрират индукция по време на нискотемпературния стрес и са възможност мицелът да синтезира повече ензимен белтък, необходим за разграждането на H₂O₂ при рязко снижаване на температурата. Освен това, наличието на 4 каталазни гена предполага по-добра способност за регулиране разграждането на H₂O₂ в изследвания щам (Kawasaki and Aguirre, 2001).

В резултат на проведените изследвания са получени пълните секвенции на 5 каталазни гена при щам *P. griseofulvum* P29 и е проследено влиянието на ниската температура върху експресията на тези гени чрез Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). При температура от 10°C, най-значимо се увеличава експресията на гена *cat1*, кодиращ ензима каталазо-пероксидаза. Настоящите доказателства предполагат, че *cat1* е един от гените, позволяващи растежа на *P. griseofulvum* P29 при условия на оксидативен стрес, предизвикан от ниска температура.

4.3. Депозиране на резултатите, получени под формата на генни секвенции на изследваните ензими и щамовете-продуценти в международните бази данни (ncbi, kegg, brenda) и микробиологични колекции (dsmz, cbs).

Получените секвенции са депозирани в най-голямата обществена база данни със свободен достъп GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и са представени в Таблица 5.

Таблица 5. Нуклеотидни секвенции, депозирани в база данни GenBank.

Strain	sequencing analysis	GenBank accession number
<i>Penicillium griseofulvum</i> P29	ITS region	MT722118
<i>Penicillium chrysogenum</i> P27	ITS region	MT758190
<i>Penicillium griseofulvum</i> P29	Catalase-peroxidase <i>cat1</i> gene, complete sequence	MW618002
<i>Penicillium griseofulvum</i> P29	Catalase <i>cat2</i> gene, complete sequence	MW618003
<i>Penicillium griseofulvum</i> P29	Catalase <i>cat3</i> gene, complete sequence	MW618004
<i>Penicillium griseofulvum</i> P29	Catalase <i>cat4</i> gene, complete sequence	MW618005
<i>Penicillium griseofulvum</i> P29	Catalase <i>cat5</i> gene, complete sequence	MW618006

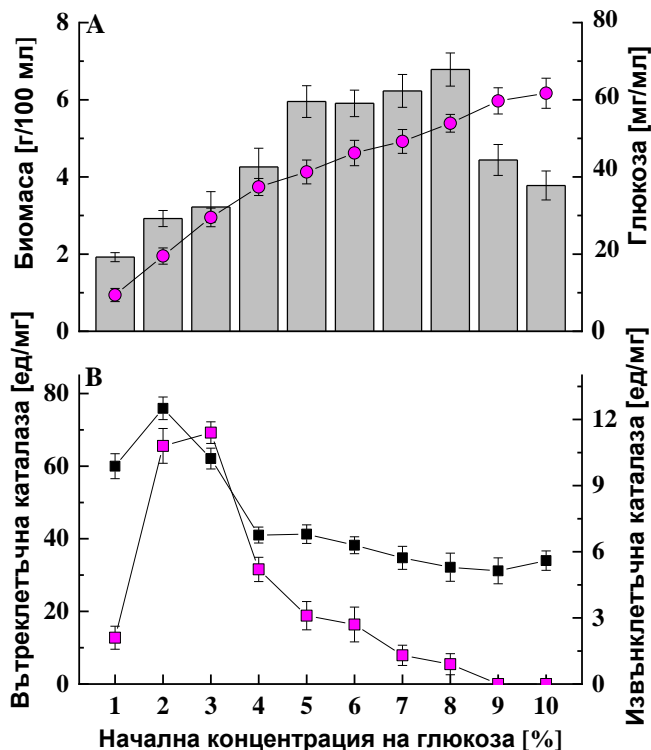
5. ОПТИМИЗИРАНЕ УСЛОВИЯТА НА КУЛТИВИРАНЕ НА ЩАМ *P. griseofulvum* P29 ЗА ПОВИШАВАНЕ СИНТЕЗА НА ЕНЗИМА КАТ

Оптимизирани са условията на култивиране на моделния щам с цел повишаване на добива от ензима КАТ чрез промяна концентрацията на въглеродния източник във

ферментационната среда, съдържанието на инокулума, температурата на култивиране и количеството на разтворения кислород в средата (РК).

5.1. Ефект на глюкозата върху растежа и синтеза на КАТ от *P. griseofulvum* p29

Изследвани са различни концентрации на глюкоза (от 1 до 10%), за да се определи връзката между нивото на въглеродния източник във ферментационната среда и биосинтезата на ензима (Фиг.17).



Фигура 17. Концентрацията на глюкоза оказва съществено влияние върху развитието на продуцента и синтеза на ензима. (А) биомаса (сиви барчета) и консумация на глюкоза (●); (Б) активност на вътреклетъчната (■) и извънклетъчната (□) КАТ.

Съдържанието на биомаса се увеличава с повишаване на концентрацията на глюкоза до 5% и се поддържа почти постоянно до 8%. Последващите варианти (9 и 10%) демонстрират значително забавяне на растежа, но в тези случаи биомасата е над тази, отчетена при 1 и 2%. Освен това, след 96 часа култивиране, докато съдържанието на глюкоза в диапазона между 1 - 5% е напълно изразходвано, в култури над 5%, значителни нива на глюкоза все още са налични.

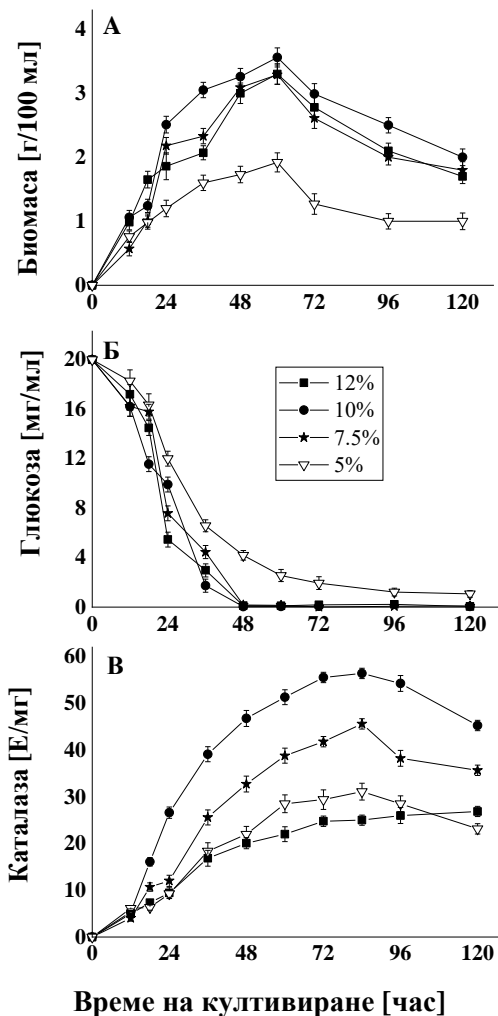
Синтезата на вътреклетъчна КАТ се реализира при всички изследвани концентрации на глюкоза. Оптималната ензимна активност (77.9 Е/мг) се наблюдава при 2% концентрация,

увеличаването и до 3% води до леко намаляване на ензимната активност. По-нататъшното увеличаване на съдържанието на глюкоза (над 3%), репресираща синтеза на изследвания вътреклетъчен ензим. Щамът *P. griseofulvum* P29 демонстрира и извънклетъчна продукция на САТ, но в много по-малка степен. Въз основа на получените до момента резултати е очевидно, че щамът *P. griseofulvum* P29 изисква 2% начална концентрация на глюкоза за максимална КАТ активност.

5.2. Оптимизиране на съдържанието на инокулум

При всички експерименти с вариране на количеството инокулум се отчита обилен растеж, но култивирането с 10% инокулум позволява максимално образуване на биомаса (около 3.5 г/100 мл) след 60 часа (Фиг. 18А).

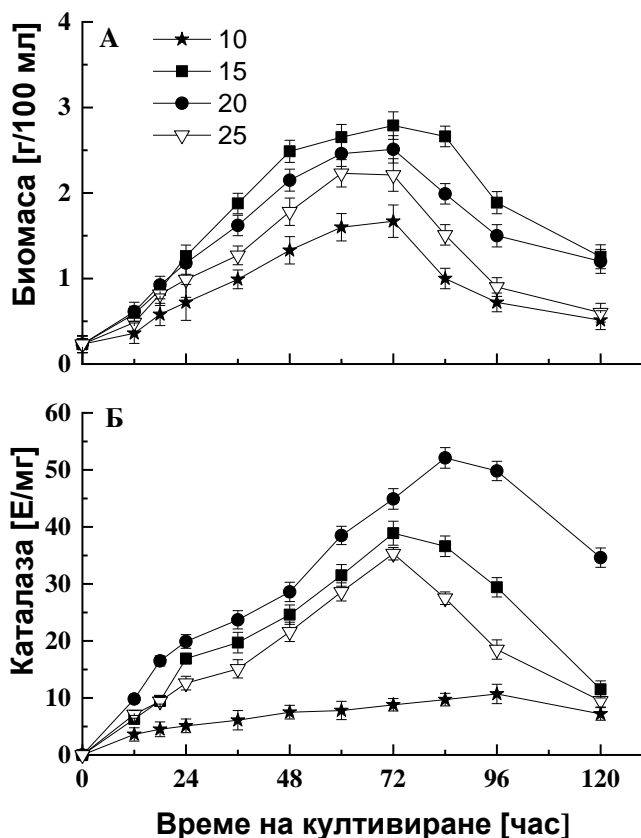
Наблюдават се типични криви на растеж на мицела и бързо усвояване на глюкозата. Културите със 7.5, 10 и 12% инокулум консумират глюкозата за около 36 часа. Както може да се види на Фиг. 18В, използването на инокулум над 7.5% значително подобрява синтеза на ензима, а при 5% посевен материал ензимната активност значително намалява. Максималната стойност на КАТ (56 Е/мг) се наблюдава при 10% инокулум след 84 часа култивиране.



Фигура 18. Количество биомаса (А), остатъчна глюкоза (Б) и активност на КАТ (В) на *P. griseofulvum* P29 в зависимост от количеството на инокулума; 5% - Δ; 7.5% - *; 10% - ●; 12% - ■.

5.3. Развитие на щама и биосинтеза на КАТ в зависимост от температурата на култивиране

Температурата оказва значително влияние върху образуването на биомаса и синтеза на ензима КАТ от *P. griseofulvum* P29 (Фиг. 19). Щамът може да расте при всички тествани температури (от 10 до 25°C) (Фиг. 19А). Температурата от 15°C е най-благоприятната за натрупване на биомаса, като максималната стойност е 2.78 г/100 мл, спрямо 1.67 г/100 мл при най-ниската използвана температура (10°C). Не се наблюдава значителна разлика в развитието на културата, когато температурата варира между 20 и 25°C.

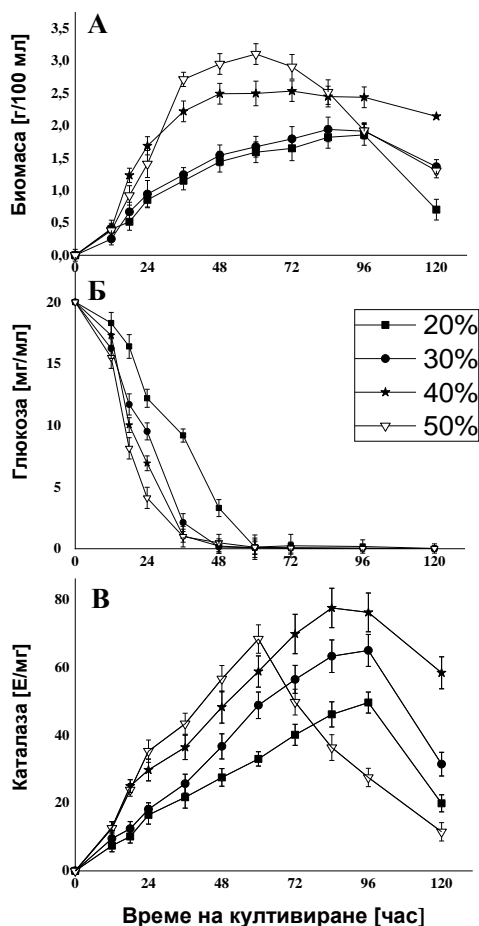


Фигура 19. Количество биомаса (А) и КАТ активност (Б) от *P. griseofulvum* P29, култивиран при различни температури: 10 °С - *; 15°С - ■; 20°С - ●; 25°С - Δ.

За разлика от горепосочените данни, активността на КАТ от *P. griseofulvum* P29 е най-висока при 20°C. Максималната активност (52.1 Е/мг) се постига след 84 часа култивиране (Фиг. 19Б). Култивирането при температури под или над 20°C води до намаляване на максималната активност до 38.9 и 25.3 Е/мг след 72 часа съответно при 15 и 25°C.

5.4. Значение на концентрацията на разтворения кислород за развитието на щама и синтеза на ензима

Резултатите показват, че растежът на щама зависи в значителна степен от концентрацията на РК. В култури с контролирано ниво на РК от 20 и 30%, преходът от експоненциална фаза към стационарна фаза се осъществява на 84^{-ия} час, когато се наблюдава и максимално натрупване на биомаса (около 1.9 г/100 мл) (Фиг. 20А).



Фигура 20. Зависимост на количеството биомаса (А), консумацията на глюкоза (Б) и синтеза на КАТ (В) от нивото на РК; 20% - ■; 30% - ●; 40% - *; 50% - △.

Увеличаването на концентрацията на РК до 40 или 50% скъсява времето за настъпване на стационарната фаза до 36^{-ия} час. Най-добрият добив на мицел се отчита във варианта с 50% РК (3.1 г/100 мл след 60 ч култивиране). Докато консумацията на глюкоза при вариантите с 30, 40 и 50% РК (Фиг. 20Б) показва незначителна разлика, то при 20% РК се наблюдава леко забавяне на този процес.

С увеличаване нивото на РК до 40%, ензимната активност се повишава до максималната – 77.5 Е/мг, постигната след 84-96 часа култивиране (Фиг. 20В). В културите с 20 или 30% РК се наблюдава значително забавяне на синтеза на КАТ. Въпреки че максималното ниво на КАТ във варианта с 50% РК е достигнато след 60 ч култивиране, ензимната активност тук е с около 15% по-ниска в сравнение с варианта с 40% РК.

5.5. Сравнение на ефективността на биосинтеза на КАТ ОТ *P. griseofulvum* P29, култивиран при различни условия

За разработване на ефективен метод за получаване на КАТ с най-висок добив, е направено сравнение на параметрите на продукцията на ензима в култури при неконтролирано ниво на РК (Фиг. 18 и 19) и такива с контролирано ниво (40 и 50%) (Фиг. 20). Данните са обобщени в Таблица 6.

Таблица 6. Сравнение продуктивността на синтеза на КАТ при максимумите на активност в зависимост от нивото на РК

Система на култивиране ^а	Време на култивиране [ч]	Биомаса ^б [г/л]	Добив от белтък ^в [мг/л]	Специфична КАТ активност ^г [ед/мг белтък]	Обща КАТ активност ^д [U l ⁻¹] $\times 10^3$	Коефициент на добив ^е [ед/кг] $\times 10^3$	Ензимна продуктивност ^ж [ед/кг] час $\times 10^3$
Неконтролирано ниво на РК	84	21.1	925.6	55	50.9	2 412.7	28.7
Контролирано ниво на РК							
40%	84	25.2	1102.0	79	87.1	3 454.1	41.1
50%	60	31.1	1085.3	62	67.3	2 164.1	36.7

^а*P. griseofulvum* се култивира при неконтролирано РК или контролирано РК (40 или 50%)

^бБиомаса като сухо тегло в момента на спиране на ферментацията

^вДобив от белтък (мг вътреклетъчен белтък в суха биомаса, получена от 1 литър културална среда.

^гАктивност в момента на спиране на ферментацията

^дОбща КАТ активност, определена за сухата биомаса от 1 литър културална среда

^еКоефициент на добив от КАТ, определен като ензимна активност за кг суха биомаса.

^жПродуктивност на КАТ, определена за кг суха биомаса, получена за 1 час

Резултатите показват, че в условия на контролирано ниво на РК се постига по-добър растеж и по-ускорена синтеза на ензима от *P. griseofulvum* P29 в сравнение с вариантите с неконтролирано РК. Най-високата стойност на кинетичните параметри за добив на белтък, активност на КАТ, коефициент на добив и ензимна продуктивност се наблюдава след 84 ч култивиране при РК 40%. Въпреки по-високото съдържание на биомаса и по-ранното постигане на максимална ензимна активност при 50% РК, най-високата стойност на горепосочените параметри се наблюдава при 40% РК (1102 с/у 1085, 79 с/у 62, 3454.1 $\times 10^3$ с/у 2164.1 $\times 10^3$ и 41.1 $\times 10^3$ с/у 36.7 $\times 10^3$).

Антарктическият щам *P. griseofulvum* P29 е ефективен продуцент на КАТ. Повишената продукция на един от антиоксидантните ензими от такъв щам не е изненада. Суровите условия в подобни местообитания, и специално Антарктика, включват освен ниска

температура, високо ниво на разтворен кислород, повишена UV радиация, силни сезонни промени и често редуващи се цикли на замразяване и размразяване, което води до усилено генериране на СОР и активиране на антиоксидантната защита. Информацията за ефективно производство на температурно-чувствителна КАТ е много оскъдна. Сред големия брой микроорганизми, способни да синтезират вътреклетъчни ензими, включително каталаза, филаментозните гъби са особено интересни поради някои предимства, като напр. бързо развитие, образуването на обилно количество мицел и др. В това проучване е използвана връзката между третирането с концентрация на РК и засилената антиоксидантна защита, за да се разработи метод за получаване на температурно-чувствителна КАТ. Прилагането на такава стратегия позволява поддържането на контролираното и стабилно ниво на генериране на СОР за оптимален ензимен синтез без увеличаване на скоростта на разбъркване. Няма информация за прилагане на РК за подобряване на температурно-чувствителна КАТ в биотехнологичния процес.

6. ПРЕЧИСТВАНЕ НА ТЕМПЕРАТУРНО-ЧУВСТВИТЕЛНА КАТ

6.1. Схема на пречистване

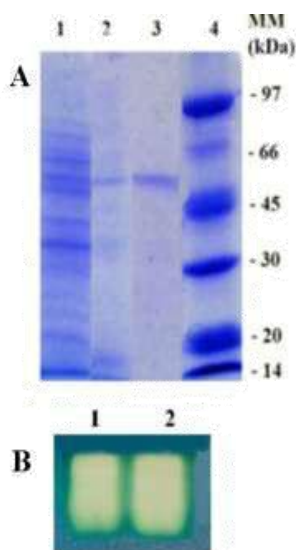
За пречистване на ензима се използва безклетъчен екстракт (200 мл) от 60 г свежа биомаса. Протоколът за пречистване включва: концентриране на белтъка в безклетъчния екстракт чрез мембранна ултрафилтрация с Amicon PM-10 или Minitan II ултрафилтрационна система (Millipore, USA 10 kDa), последвано от едноетапна анионообменна хроматография върху Q-сефароза и едноетапна хроматография с хидрофобно взаимодействие върху фенил-сефароза (Табл. 7).

Специфичната активност се повишава повече от 12 пъти в сравнение с безклетъчния екстракт, докато общото съдържание на белтък намалява до 1.96 мг в сравнение с първоначалното съдържание от 398.4 мг.

Таблица 7. Резултати от проведените стъпки за пречистване на КАТ от *P. griseofulvum* P29

Стъпка	Общо съдържание на белтък (мг)	Обща каталазна активност (Е)	Специфична ензимна активност (Е/мг б.)	Добив (%)	Пречистване (пъти)
Безклетъчен екстракт	398.40	17199	43	100.0	1.00
Millipore (10 kDa)	133.75	7070	53	41.1	1.22
Q-Sepharose	71.75	5940	83	34.5	1.93
Phenyl-Sepharose	1.96	1055	538	6.1	12.51

Според молекулярния стандарт получената КАТ е с молекулна маса 45.5 кДа за една субединица или около 182 кДа за молекулно тегло на целия ензим. Трябва да се подчертае, че на SDS-PAGE се проявява само основна лента, която след оцветяване за активност доказва присъствието на КАТ ензим (Фиг. 21В).

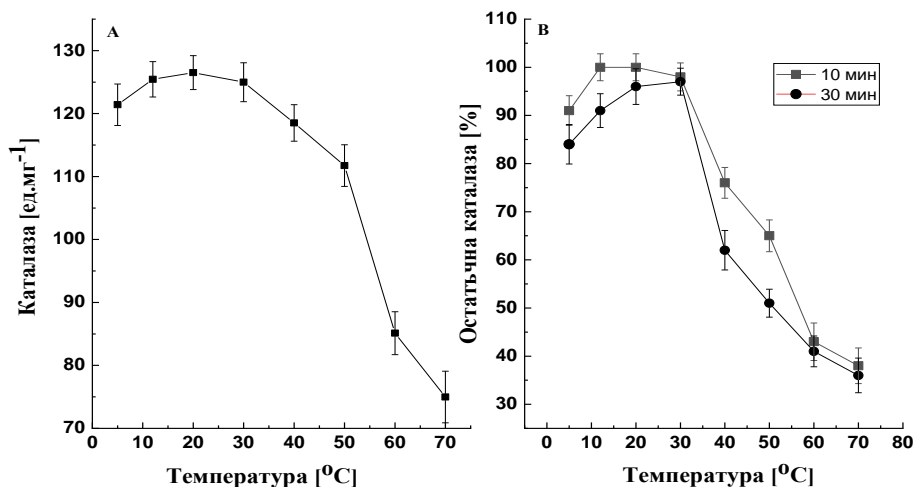


Фигура 21. PAGE анализи. (А) SDS-PAGE анализ на КАТ от *P. griseofulvum* след съответен етап на пречистване: 1 - безклетъчен екстракт; 2 - след хроматография с Q-Sepharose; 3 - след колона с фенил-сефароза; 4 - белтъчен стандарт; (Б) Нативна PAGE на пречистен ензим; 1-CAT стандарт от *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich); 2 - КАТ от *P. griseofulvum* P29

Нашите резултати предлагат неусложнена и ефективна процедура за пречистване на КАТ. Специфичната активност се повишава повече от 12 пъти в сравнение с безклетъчния екстракт, докато общото съдържание на белтък намалява до 1.96 мг в сравнение с първоначалното съдържание от 398.4 мг. Подобни резултати относно степента на пречистване и ензимния добив на КАТ са докладвани за *N. crassa* (Santoso et al., 2016), *Serratia marcescens* FZSF01 (Jia et al., 2017), *T. claveryi* (Marqués-Gálvez et al., 2019) и др.

6.2. Ефект на температурата и рН върху активността на пречистения нов ензим КАТ

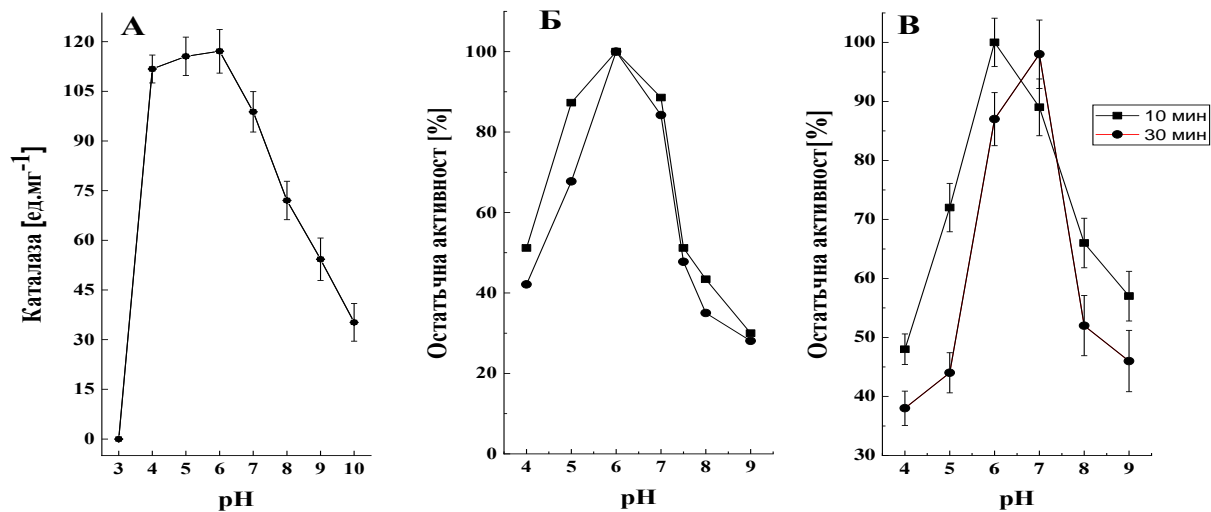
Определен е ефектът на температурата върху активността и стабилността на пречистената КАТ (Фиг. 22А).



Фигура 22. Ефект на температурата върху: (А) активността на КАТ; (В) стабилността на ензима след инкубиране при различни температури за 10 (■) или 30 (●) минути.

Резултатите показват, че ензимът е активен в широк температурен диапазон: от 5 до 70°C. Оптималната температура е 20°C, а високо ниво на активност (>90%) се поддържа между 5 и 40°C. При 50, 60 и 70°C ензимът запазва съответно 88, 67 и 59% от първоначалната си активност. Новата КАТ е стабилна до 30°C в продължение на 10 и 30 минути и поддържа около 70, 65, 40 и 38% съответно при 40, 50, 60 и 70°C (Фиг. 22Б).

Най-висока ензимна активност е установена при стойности на рН между 4.0 и 6.0 (Фиг. 23А), а при рН 3.0 ензимът е неактивен. Рязкото намаляване на активността на КАТ при рН над 7.0 предполага, че ензимът е с кисела природа. Определена е и рН стабилността на ензима при различни стойности на рН и температура 20 или 30°C. Инкубацията за 10 и 30 минути при повишаване на рН при температура 20°C показва сходство между кривите на стабилност (Фиг. 23Б).



Фигура 23. Ефект на рН върху (А) ензимната активност; рН стабилността при температура 20 (Б) или 30°C (В) след инкубиране за 10 или 30 мин.

Докато в киселата област (4.0 - 5.0) КАТ запазва от 30 до 50% от първоначалната активност, при рН 5.0 - 6.0 се установява 100% запазване на активността. В алкалния диапазон на рН, КАТ от *P. griseofulvum* P29 запазва около 45-60% от своята активност. Експериментът при 30°C също показва значителна рН стабилност за 10 и 30 минути (Фиг. 22В). Ензимът се оказва най-стабилен при рН 6.0. Около 90% от максималната специфична активност се открива при рН 5.0 и 7.0. Резултатите показват, че при 30°C рН стабилността на КАТ е по-ясно изразена в киселата област, отколкото в алкалната.

ДИСКУСИЯ

Настоящите резултати разкриват, че психротолерантният щам *P. griseofulvum* P29 е ефективен продуцент на температурно-чувствителна КАТ. Този щам е изолиран от проби от Антарктика - континент, който е основен източник на адаптирани към ниски температури гъби (Robinson, 2001, Wang et al., 2008). Според Wang и сътрудници (2017), в антарктическите почви се намират главно филаментозни плесени, принадлежащи към отдел Ascomycota и по-малко от Basidiomycota и Zygomycota. Bridge и Spooner (2012) също правят подобно заключение за разпределението на плесените в Антарктика. В литературата има

много съобщения за антарктически гъби, които са добри продуценти на термочувствителни ензими (Fenice et al., 1997, Duarte et al., 2018, Pasqualetti et al., 2019), но липсват данни за СА КАТ.

Оскъдна е информацията за ефективно производство на температурно чувствителна КАТ. Сред голям брой микроорганизми, способни да произвеждат вътреклетъчни ензими, включително КАТ, филаментозните гъби са особено интересни поради лесното им култивиране и натрупване на биомаса. Нашите резултати демонстрират способността на *P. griseofulvum* P29 да произвежда КАТ не само при култивиране в колби, а и в биореактор при многократно увеличение на работния обем. Този щам синтезира вътре- и извънклетъчна КАТ като по-голяма част от ензимната активност е вътре в клетките (8:1). Производството на двата ензима (вътре- и извънклетъчни КАТ) от *P. griseofulvum* P29 се повлиява негативно при повишаване концентрация на глюкоза над 2%–3%, вероятно поради действието на регулационния механизъм катаболитна репресия. Подобна информация е публикувана и за мезофилни КАТ продуценти. Например, установено е, че оптималната първоначална концентрация на глюкоза за производство на КАТ от *A. niger* AM-11 е 0,2% (w/v) (Fiedurek and Gromada, 2000). Петрова и сътр. (2002) съобщават, че активността на КАТ от *S. cerevisiae* се увеличава след изчерпване на глюкозата в хранителната среда. Противоположни резултати са публикувани за арктически плесени, предпочитаци 8% съдържание на глюкоза в средата (Fiedurek, 2003).

Температурно-чувствителните ензими са необходими за поддържане на метаболизма на микроорганизмите в условия на ниска температура (Feller, 2013). Максимална активност на КАТ от моделния щам се отчита при 20°C и значително намалява при 25°C, което потвърждава температурно-чувствителния характер на ензима от *P. griseofulvum* P29. Изискването за температура на растеж е щам-зависима характеристика на адаптираните към студени местообитания микроорганизми. Duarte и сътр. (2018) отбелязват, че по-голямата част от антарктическите гъбни изолати произвеждат ензими при ниски и умерени температури в диапазона от 4,0°C до 26,0°C. При психрофилния щам *P. cyclopium* 1 най-високата активност на КАТ се измерва на осмия ден от ферментационния процес при 15°C, а при 20°C времето за достигане на максимална активност се съкращава до шест дни (Fiedurek et al., 2003). Психрофилни дрожди, принадлежащи към рода *Yamadazyma*, произвеждат СА

пектиназа, амилаза и протеаза при 15°C (Daskaya-Dikmen et al., 2018). Температура 15–20°C се счита за оптимална за производството на СА пектиназа от антарктическата морска гъба *Geomyces sp.* F09-T3-2 (Poveda et al., 2018).

Аерирането на средата е друг фактор, силно повлияващ растежа и производството на КАТ от *P. griseofulvum* P29. Докато по отношение на растежа се наблюдава положителен ефект до ниво 50% на разтворения кислород, за синтеза на КАТ положителния ефект е до 40%, след което активността на ензима намалява. Подобни данни са представени от Bai и сътр. (2003) за *A. niger* и *Fusicoccum amygdali*. Освен това високата концентрация на кислород (до определени нива според капацитета на клетките) ускорява генерирането на СОР при филаментозните гъби, което води до повишена активност на антиоксидантните ензими, включително КАТ (Pashova et al., 1999; Bai et al., 2003; Lushchak, 2011). Шнайдер и сътр. (2019) съобщават за значително повишаване на активността на лаказа и пероксидаза от гъби *Marasmiellus palmivorus* VE11, когато РК се поддържа на 50%. Много високите концентрации на РК (50%) причинява прекомерно производство на СОР и ензимната антиоксидантна защита не може да възстанови нормалния баланс оксидант-антиоксидант в клетките на *P. griseofulvum* P29. Вероятно при тези условия $O_2^{\cdot-}$ се произвеждат в толкова токсични количества, че нивото на СОД е недостатъчно, за да ги неутрализира. Супероксидните радикали, които избягват дисмутация, могат да инхибират КАТ активността (Kono and Fridovich, 1982). Сравним ефект на концентрацията на РК върху клетките се наблюдава и при *Humicola lutea* (Pashova et al., 1999). Bai и сътр. (2003) представят друга хипотеза, в която предполагат, че високото ниво на обогатяване с кислород (50%) води до включването на алтернативен респираторен път, който намалява генерирането на ендогенни СОР и активности на антиоксидантни ензими.

В настоящото изследване се използва връзката между концентрацията на РК и активиране на антиоксидантна защита, за да се разработи метод за ефективно производство на СА КАТ от *P. griseofulvum* P29. Прилагането на такава стратегия позволява поддържането на контролирано и стабилно ниво на генериране на СОР за оптимален ензимен синтез без увеличаване на скоростта на разбъркване. Известно е, че по-високата скорост на разбъркване предизвиква накъсване на нишковидния гъбен мицел и се понижава добива на целевия продукт (Ibrahim et al., 2015). В научната литература не се открива информация за прилагане

на РК в биотехнологичен процес за повишаване активността на термочувствителна КАТ. Fiedurek и Gromada (2000) използват 30% концентрации на РК за синтеза на мезофилен ензимен препарат, съдържащ глюкозооксидаза и КАТ. Аерирането е успешно използвано за производство на хитинолитичен ензим от антарктическата гъба *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003 (Fenice et al., 2012).

Невъзможно е да се направи сравнение на данните за ефективността на производството на ензима между настоящето изследване и тези, публикувани от други автори, поради няколко причини. Първо, няма сравнителни данни за параметрите на синтеза на СА КАТ, съответстващи на информацията в таблица 11. Докладът за плесенна СА КАТ от *P. cyclopium* 1 предоставя доказателства само за времето на култивиране, необходимо за достигане максимална активност, а именно 8 или 6 дни (Fiedurek et al., 2003). В настоящото изследване максималната активност е постигната след 84 часа и това по-кратко време на култивиране за получаване на ензима е значително предимство. Второ, данните за плесенна температурно-чувствителна КАТ са изключително оскъдни. Трето, изследователският дизайн и методите за анализ на КАТ активност в подобни проучвания са доста различни. Докато нашето проучване представя ензимната активност като единици на милиграм протеин (Е/мг), другите публикувани резултати я определят като единици на милилитър (Е/мл).

Пречистеният и характеризираният ензим КАТ от *P. griseofulvum* P29 проявява активност и термостабилност в широки температурни граници, които се различават значително от тези на мезофилните ензими. Експериментите показват, че КАТ от *P. griseofulvum* P29 запазва 40% от първоначалната си активност след инкубиране при 60°C за 30 минути, което предполага, че е подобна на термостабилността на температурно-чувствителната КАТ от *P. cyclopium* 1 (Fiedurek et al., 2003). Тъй като това е единственото съобщение, което отбелязва термостабилността на СА КАТ от гъби, ние сравнихме настоящите резултати с данни за бактериални температурно-чувствителни ензими. Докато КАТ от *Vibrio salmonicida* LFI123 показва подобна термостабилност при 60°C (50%, 5 минути), ензимите от *Bacillus* sp. N2a (12%, 15 минути) и *V. rumoiensis* S-1T (15 минути, 0%) (Lorentzen et al., 2006; Wang et al., 2008) демонстрират по-ниска термостабилност в сравнение с КАТ от *P. griseofulvum* P29. От друга страна, този ензим проявява по-значителна термолабилност от мезофилни аналози (Vatsyayan and Goswami, 2016). Неговата лабилност заедно с високата му каталитична

ефективност близо до 5°C ясно показва, че това е температуро-чувствителен ензим. Връзката между повишената каталитична активност при ниски температури и намалената термостабилност улеснява бързото им инактивиране чрез умерено повишаване на температурата, което ги прави особено подходящи за приложение в различни индустриални процеси и за фундаментални изследвания. Например, СА КАТ е важна алтернатива за неутрализиране на остатъчните избелващи химикали в текстилната промишленост, които биха могли да спестят вода, време и енергия, както и да намалят значително замърсяването. Този ензим може да осигури защитен ефект срещу H₂O₂, които са отговорни за влошаване на хранителните продукти и опаковъчните материали. Освен това, такава КАТ се използва в производството на сирене, за да се отстрани водородният пероксид от млякото след студената пастеризация. Към този ензим се проявява интерес и като потенциална съставка на фармакологични формули за лечение на много заболявания (диабет, Алцхаймер, Паркинсон и др.). Екзогенното добавяне на температуро-чувствителна катализа може да се прилага с голям успех при криоконсервация на полови клетки.

В заключение: СА КАТ играе основна роля в стратегията за оцеляване на антарктически плесенни гъби в условията на нискотемпературен стрес. Настоящите проучвания доведоха до създаване на ефективна лабораторна технология за продукция на ензима в биореактори, която осигурява условия за достигане на висок ензимен добив за кратко време на култивиране, което е предпоставка за мащабиране на неговото производство. Полученият пречистен ензим е с температурен оптимум 20°C и оптимално рН на ензимната реакция - 6.0. Той запазва термостабилността си в диапазона от 5°C до 40°C, а рН стабилността - от 5.0 до 8.0. Всичко това характеризира КАТ от *P. griseofulvum* P29 като температурно чувствителен ензим с потенциално приложение за медицински цели, както и за биотехнологични или индустриални процеси.

V. ИЗВОДИ

1. Изследваните 61 антарктически щама се отнасят към психротолерантните (38%) и мезофилните (62%) представители на гъбите.

2. Всички проучени щамове притежават способността да синтезират един от основните антиоксидантни ензими вътреклетъчна КАТ, а повечето от тях (88%) продуцират и извънклетъчна КАТ.

3. Нискотемпературното въздействие предизвиква проявата на оксидативен стрес в клетките на моделните щамове като повишава нивата на биомаркерите на оксидативен стрес.

4. В отговор на стреса моделните щамове активизират своята антиоксидантна защита: повишава се активността на ензимите от първата линия на защита СОД и КАТ.

5. Нискотемпературният стрес води до ултраструктурни промени в клетките на психротолерантния *P. griseofulvum* P29. Най-чувствителните клетъчни органели са митохондриите.

6. В психротолерантния щам *P. griseofulvum* P29 са установени 5 каталазни гена, един от които експресира ензима каталазо-пероксидаза, а останалите кодират монофункционални, хем-съдържащи каталази.

7. При рязко снижаване на температурата до 10°C в клетъчния отговор на моделния щам се включва индуцирана експресия на 4 от каталазните гени, в най-голяма степен това се отнася за ген *cat1*, гена на каталазо-пероксидазата.

8. Разработеният лабораторен метод за получаване на КАТ от антарктическият щам *P. griseofulvum* P29 на базата на промени в стойността на РК позволява повишаване на общата ензимна активност, ензимния добив и ензимната продуктивност.

9. Полученият нов ензим е температурно-чувствителна КАТ с температурен оптимум 20°C и рН оптимум 6.

VI. ПРИНОСИ

На базата на направен сравнителен анализ на връзката между ниско-температурното въздействие и оксидативния стрес на моделни щамове, изолирани от екстремно студени местообитания могат да се извлекат следните приноси:

1. Получени са нови доказателства на молекулно ниво за участието на ензима КАТ в адаптацията към ниско-температурен стрес на филаментозни гъби, изолирани от Антарктика.
2. Доказано е разпространението на вътреклетъчната КАТ при антарктически гъби от различни термални класове. Установено е наличието на извънклетъчна КАТ, което е рядко срещан феномен.
3. За първи път е разработен ефективен лабораторен метод за получаване и пречистване на температурно-чувствителна КАТ. Новият ензим, изолиран от *Penicillium griseofulvum* P29 е с температурен оптимум 20°C и рН оптимум 6.0.
4. В база данни са депозираны 5 нуклеотидни секвенции, които отговарят на 5-те гена, кодиращи синтезата на КАТ в щам *Penicillium griseofulvum* P29.

Приложение

Част от резултатите, получени от проведените експерименти са отразени в статии, публикувани в списание с импакт фактор, а именно:

1. Krumova, E., Abrashev, R., **Dishliyska, V.**, Stoyancheva, G., Kostadinova, N., Miteva-Staleva, J.,...& Angelova, M. (2021). Cold active catalase from the psychrotolerant fungus *Penicillium griseofulvum*. *Journal of Basic Microbiology*, 61(9), 782-794. **IF 2.532; Q3.**
2. **Dishliyska, V.**, Stoyancheva, G., Abrashev, R., Miteva-Staleva, J., Spasova, B., Angelova, M., & Krumova, E. (2023). Catalase from the Antarctic Fungus *Aspergillus fumigatus* I-9– Biosynthesis and Gene Characterization. *Indian Journal of Microbiology*, 63(4), 541-548. **IF 3; Q3.**

Общ IF на статиите 3,532

Изнесени доклади по темата на дисертацията пред научни мероприятия:

- Доклад на XV конгрес на микробиолозите в България с международно участие (5-6 октомври 2022г., Копривщица) на тема: Cell response to cold stress in Antarctic fungus *Penicillium griseofulvum* – V. Dishliyska, G. Stoyancheva, R. Abrashev, J. Miteva-Staleva, B. Spasova, M. Angelova, E. Krumova

- Доклад на 4-ти интердисциплинарен докторантски форум с чуждестранно участие (16-19 май 2023, Сандански):

Improved production of cold-active catalase from the psychrotolerant fungus *Penicillium griseofulvum* P29 during submerged cultivation - V. Dishliyska, G. Stoyancheva, R. Abrashev, J. Miteva-Staleva, B. Spasova, M. Angelova, E. Krumova

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам най-сърдечни благодарности на научния си ръководител доц. д-р Екатерина Крумова за методичното ръководство, ценните съвети и всеотдайното съдействие и подкрепа по време на цялото ми обучение, както и при изготвянето на настоящия дисертационен труд.

Благодаря на целия екип от Департамент „Микология”, по специално на проф. Мария Ангелова, дбн, доц. д-р Р. Абрашев, гл. ас. д-р Жени Митева-Сталева и инж. Боряна Спасова за безценната помощ и подкрепа.

Генетичните изследвания на антарктически микромицетни щамове, включително на *Penicillium griseofulvum* P29 продуцент на СА КАТ са осъществени от доц. д-р Галина Стоянчева от лаборатория Генетика Департамент Обща микробиология и доц. д-р Екатерина Крумова. Благодаря Ви за съдействието и консултациите по време на проведените опити.

Експерименталните изследвания във връзка с ултраструктурните изменения на морфологията на психротрофния продуцент при ниско температурен стрес са проведени с любезното съдействие на колеги от лаборатория Клетъчна микробиология Департамент Обща микробиология.

Безкрайно съм задължена и изказвам благодарност от сърце на моето прекрасно семейство за обичта, търпението и безрезервната подкрепа.