

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ МАРГАНЦА НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

И.А. Ильючик, аспирант, А.Д. Кульгавеня, О.А. Бокова, 4 курс
Научный руководитель – О.Н. Жук, к.б.н., доцент
Полесский государственный университет

Протеолитические ферменты широко применяются в пищевой, фармакологической, медицинской и сельскохозяйственной промышленности. Основным источником их получения являются поджелудочная железа и слизистая желудка крупного рогатого скота и свиней. Данный ресурс является ограниченным и не дешевым, поэтому на современном этапе развития биотехнологических процессов остается востребованным поиск новых более дешевых источников протеиназ.

Одной из перспективных групп продуцентов протеолитических ферментов являются базидиальные грибы. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что среди дереворазрушающих базидиомицетов имеются активные продуценты молокосвертывающих и прочих протеиназ [1, с.237]. Протеиназы обнаружены в мицелии и в культуральном фильтрате гриба вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*). Род вешенка представлен 39 видами, 9 из которых являются объектами культивирования в различных странах Европы, Азии и Америки. Преимуществами видов рода *Pleurotus* перед другими культивируемыми грибами являются: высокая скорость роста мицелия и значительная конкурентоспособность по отношению к посторонней микрофлоре, способность утилизировать из разнообразных растительных отходов различные углеродсодержащие соединения, относительная простота технологии выращивания, устойчивость к бактериальным, грибным и вирусным болезням, высокие вкусовые и питательные свойства [2, с. 4].

Марганец – незаменимый микроэлемент, постоянно присутствующий в живых организмах и необходимый для их нормальной жизнедеятельности. Он входит в структуру или активирует ряд ферментов, участвующих в реакциях окисления-восстановления, декарбоксилирования и гидролиза. Например, Mn-зависимая пероксидаза – один из лигнолитических энзимов, синтезируемых *Basidiomycetes* [3, с. 64]. Значение марганца в реализации биохимических и физиологических процессов изучается давно, однако механизм действия этих ионов еще не до конца изучен.

Цель исследования – изучить особенности влияния ионов марганца на активность протеолитических ферментов мицелия вешенки обыкновенной (*P. ostreatus*) и культуральной жидкости, полученных методом глубинного культивирования.

Материалы и методы. Объектом исследования служили мицелий и культуральная жидкость двухнедельной глубинной культуры «дикого» штамма *P. ostreatus*, выделенного в 2014 г. из плодовых тел, растущих на тополе в г. Минске. Гриб культивировали на картофельно-сахарозной среде с добавлением пяти концентраций $MnCl_2$ (контроль – без Mn^{2+} , 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л и 10 мг/л) при средней температуре 27 °С в течение двух недель. Образцы мицелия и культуральной жидкости отбирали на льду. Мицелий гомогенизировали с добавлением бидистиллированной воды в течении 2 минут на льду и центрифугировали при 4 °С и 8000 об/мин в течении 10 минут. Протеолитическую активность супернатантов экстракта мицелия гриба вешенка обыкновенная и культуральной жидкости оценивали на двух белках-субстратах – гемоглобине

(Sigma, США) и желатине (Fluka, Германия) в тонком слое агар-агара [4, с. 143-144]. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали раствор хлорида натрия 0,15 М, рН 7,4. Концентрация гемоглобина или желатина составляла 10 г/л, агар-агара – 10 г/л. Пластины с нанесенными пробами (10 мкл) супернатантов экстракта мицелия или культуральной жидкости инкубировали при 37 °С в термостате в течение 20 часов. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 1 н хлорной кислотой.

Все эксперименты выполнены четырехкратно. Полученные результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Супернатанты гомогенатов мицелия вешенки расщепляли оба белка-субстрата – гемоглобин и желатин (таблица). В контроле интенсивность расщепления желатина на 78,3 % превосходила таковую у гемоглобина.

При расщеплении гемоглобина протеолитическая активность гомогенатов мицелия вешенки, произрастающей с добавлением в питательную среду ионов Mn^{2+} концентраций 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л и 2,5 мг/л, снижалась по отношению к контролю на 42,2 %, 14,1 %, 0,9 % и 52,8 % соответственно, но увеличивалась по отношению к контролю на 10,6 % при добавлении ионов Mn^{2+} в концентрации 10 мг/л.

Протеолитическая активность при расщеплении желатина гомогенатами мицелия вешенки, произрастающей с добавлением в среду ионов Mn^{2+} в концентрациях 0,025 мг/л; 2,5 мг/л; 10 мг/л по отношению к контролю снижалась на 4,5 %, 16,9 %, 26,3 % соответственно, но при концентрациях ионов марганца 0,1 мг/л и 0,5 мг/л увеличивалась на 12,7 % и 21,8 % соответственно.

Культуральная жидкость расщепляла оба белка-субстрата – гемоглобин и желатин (таблица). Протеолитическая активность культуральной жидкости при расщеплении желатина в контроле на 25,7 % выше по сравнению таковой с гемоглобином.

Добавление ионов Mn^{2+} в исходную среду при культивировании вешенки в концентрациях 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л и 10,0 мг/л приводило к снижению интенсивности протеолиза гемоглобина на 5,9 %, 6,1 %, 2,1 %, 0,3 % по сравнению с контролем соответственно. Добавление ионов Mn^{2+} в исходную среду в концентрации 2,5 мг/л, незначительно усиливало протеолиз гемоглобина по сравнению с контролем (на 5,7 %).

Таблица - Расщепление белков-субстратов супернатантом гомогенатов мицелия и культуральной жидкостью *P. ostreatus* в присутствии ионов Mn^{2+} *in vivo*

Концентрация $MnCl_2$, мг/л	Площадь расщепления белков-субстратов супернатантом гомогенатов мицелия вешенки, мм ²		Площадь расщепления белков-субстратов культуральной жидкостью, мм ²	
	гемоглобина	желатина	гемоглобина	желатина
контроль (без добавок)	45,3 ± 0,9	208,9 ± 8,7	57,6 ± 2,3	77,6 ± 4,5
0,025	26,2 ± 2,9*	199,6 ± 9,1	54,2 ± 1,5	69,0 ± 1,8
0,1	38,9 ± 2,4*	235,4 ± 5,8*	54,1 ± 0,9	104,9 ± 4,4*
0,5	44,9 ± 3,9	254,4 ± 7,6*	56,4 ± 0,2	105,8 ± 1,2*
2,5	21,4 ± 1,1*	173,6 ± 5,6*	60,9 ± 2,9	74,3 ± 6,1
10,0	50,1 ± 2,9	154,0 ± 19,4*	57,4 ± 3,0	83,6 ± 4,5

Примечание: * – изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$

Добавление ионов Mn^{2+} в исходную среду при культивировании вешенки в концентрациях 0,025 мг/л и 2,5 мг/л приводило к снижению интенсивности протеолиза желатина на 11 % и 4,1 % по сравнению с контролем соответственно. Добавление ионов Mn^{2+} в исходную среду в концентрациях 0,1 мг/л, 0,5 мг/л и 10,0 мг/л стимулировало протеолиз желатина по сравнению с контролем на 35,4 %, 36,5 % и 7,9 % соответственно.

Выводы. Добавление в культуральную среду различных концентраций ионов Mn^{2+} при глубинном культивировании *P. ostreatus* существенно влияет на интенсивность расщепления белков-субстратов, как гемоглобина, так и желатина, культуральной жидкостью и супернатантами гомогенатов мицелия вешенки. Протеолиз гемоглобина активнее проявлялся при использовании культуральной среды, а желатина – гомогенатов мицелия вешенки. Зависимость расщепления белков-субстратов от концентрации марганца требует дальнейших исследований.

Список использованных источников

1. Бойко, М.И., Стадничук, В.М. Древоразрушающие грибы активные продуценты протеиназ молоко-свертывающего и тромболитического действия / М.И. Бойко, В.М. Стадничук // Успехи медицинской микологии. – 2001. – Т. 1. – С. 237–238.
2. Бисько, Н.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка/ Н.А. Бисько, И.А. Дудка. – К.: Наук.думка, 1987. – 148 с.
3. Vrsanska, M. Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes / M. Vrsanska et al. // *Molecules*. – 2016. – Vol. 21. – P. 1553.
4. Никандров, В.Н. Методы исследования протеолиза. Глава 5 / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Современные проблемы биохимии. Методы исследований*. – Минск: Выш. шк. – 2013. – С. 132–157.