

## **ИЗМЕНЕНИЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКОВ СУБСТРАТОВ СУПЕРНАТАНТАМИ ГОМОГЕНАТОВ МИЦЕЛИЯ *PLEUROTUS OSTREATUS* В ПРИСУТСТВИИ АТФ *IN VITRO***

**ИЛЬЮЧИК Ирина Анатольевна**, *ст. преподаватель*  
**НИКАНДРОВ Виталий Николаевич**, *профессор, д.б.н.*  
**ЖУК Ольга Николаевна**, *к.б.н., доцент*  
*Полесский государственный университет*

Во многих странах мира культивируются различные грибы – виды рода *Pleurotus*. Они отличаются хорошими пищевыми качествами, содержат комплекс биологически активных соединений: витаминов, белков, жиров, минералов, углеводов, антиоксидантов.

В последние годы начато изучение звеньев протеолиза этих грибов (как одного из ведущих механизмов регуляции жизнедеятельности на клеточном и молекулярном уровнях): в частности их протеиназ. Это обусловлено также прикладными аспектами использования протеолитических энзимов высших грибов. Однако сведения о протеазах *Pleurotus ostreatus* немногочисленны. Известно, что супернатанты ее жидких культур содержат внеклеточные «нейтральные» протеиназы, способные расщеплять казеин [1]. Между тем, материалы о влиянии эффекторов на уровень протеолитической активности грибов в литературе практически отсутствуют.

Ранее было установлено, что аденозинтрифосфат (АТФ) вызывает подавление активности ряда очищенных протеиназ и активаторов плазминогена [2]. Распространенность такого феномена в различных представителях живого мира пока остается практически неизученной.

В этой связи целью настоящей работы явилось выяснение влияния АТФ на протеолитическую активность супернатантов гомогенатов мицелия вешенки обыкновенной.

**Материалы и методы исследования.** «Дикий» штамм *P. ostreatus* культивировали на стерильной картофельно-сахарозной среде [3], в стеклянных колбах объемом 0,5 л, под ватно-марлевыми пробками, на качалке (70 об./мин), в темноте, при температуре 27-28 °С. На 14 сутки культивирования образцы мицелия гриба гомогенизировали в бидистиллированной воде (1:1) в течении 2 мин, гомогенаты центрифугировали 10 мин при 4 °С и 8000 об/мин.

Протеолитическую активность полученных супернатантов определяли по лизису фибриногена или желатина в тонком слое агарового геля как подробно описано ранее [4]. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали 0,15 М раствор хлорида натрия (рН 7,4), с добавлением АТФ в диапазоне концентраций –  $10^{-8}$ – $10^{-2}$  М. Объем наносимого образца на белок-агаровые пластины супернатантов мицелия *P. ostreatus* – 10 мкл. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 1 н хлорной кислотой.

Все эксперименты выполнены не менее чем четырехкратно. Полученные результаты обработаны математически и статистически с использованием программ MS Excel 2010, Statistica 6.0, Origin 6.1.

**Результаты и их обсуждение.**

Супернатанты гомогенатов мицелия *P. ostreatus* при рН 7,4 способны расщеплять оба белка-субстрата. Однако казеинолитическая активность была выше желатинолитической на 45,5% (таблица).

Таблица – Расщепление белков-субстратов супернатантами гомогенатов мицелия *P. ostreatus* в присутствии аденозинтрифосфата (n=4)

Концентрация ионов АТФ, М	Площадь лизиса белков-субстратов, мм <sup>2</sup>	
	казеина	желатина
Контроль (без добавок)	261,2 ± 4,2	179,6 ± 6,1
$10^{-2}$	257,9 ± 8,5	194,9 ± 8,0
$10^{-3}$	250,4 ± 3,4	210,5 ± 10,3*
$10^{-4}$	217,3 ± 9,8*	235,5 ± 11,4*
$10^{-5}$	235,4 ± 7,6*	207,1 ± 12,9
$10^{-6}$	194,7 ± 6,7*	181,0 ± 5,0
$10^{-7}$	206,8 ± 10,4*	190,2 ± 5,9
$10^{-8}$	196,5 ± 7,7*	183,5 ± 3,6

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

Добавление АТФ оказало различное воздействие на расщепление белков протеиназами супернатантов гомогенатов мицелия гриба.

Казеинолитическая активность супернатантов в присутствии нуклеотида угнеталась в диапазоне концентраций  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М на 10–25% с максимумом эффекта в концентрациях  $10^{-8}$ – $10^{-6}$  М – на 21–25% (таблица, рисунок). Характер концентрационной зависимости изменения казеинолитической активности при добавлении АТФ приближался к линейной.

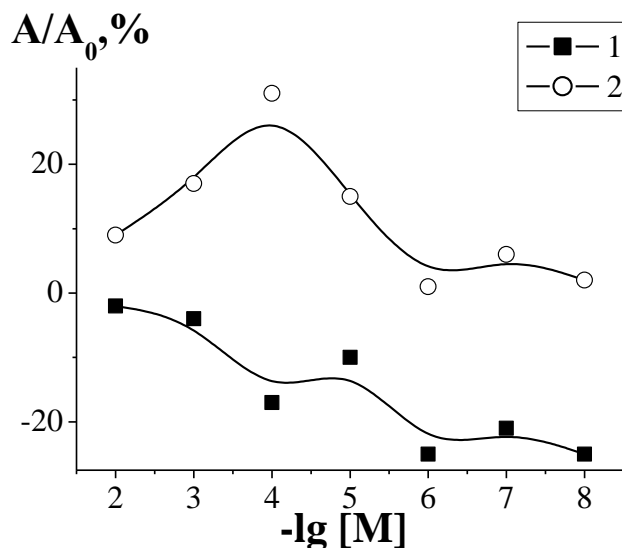
В тоже время расщепление желатина при добавлении АТФ в концентрации  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М усиливалось на 15–31% с максимумом эффекта при  $10^{-4}$  М – 31%.

Ранее было установлено, что эффект АТФ на расщепление белков различными протеиназами зависит не только от типа протеиназы, но и от белка-субстрата. Более того, оказалось, что протеолитическая активность очищенных протеиназ в ряде случаев растет при добавлении АТФ [2].

Полученные нами результаты с использованием более сложной энзиматической системы, включающей не только водорастворимые белки-энзимы, но и часть внутриклеточных мембран, являются дополнительной иллюстрацией этого явления.

Это позволяет считать, что описанный ранее феномен имеет, по-видимому, общебиологическое значение, что не исключает, однако, проведение дальнейших исследований на других биологических объектах.

**Выводы.** Итак, добавление АТФ вызвало разнонаправленные изменения расщепления белков протеиназами супернатантов гомогенатов мицелия *P. ostreatus*.



**Рисунок – Изменения интенсивности расщепления казеина (1) и желатина (2) супернатантами гомогенатов мицелия *Pleurotus ostreatus* при добавлении аденозинтрифосфата, pH 7,4**

Они, в целом, согласуются с описанными ранее на очищенных образцах протеиназ разного типа [2]. Вместе с тем, это не исключает возможность существования нескольких «нейтральных» протеиназ, имеющих разную субстратную специфичность, а также протеасомы.

Для выяснения этого обстоятельства необходимо проведение дальнейших исследований, включая ингибиторный анализ. Это составляет задачу дальнейших исследований.

#### **Список использованных источников**

1. Shaba, A.M. Screening of *Pleurotus ostreatus* and *Gleophyllum sepiarium* strains for extracellular protease enzyme production / A.M. Shaba, J. Baba // *Biopas*. – 2012. – Vol. 5, No 1. – P. 187-190.
2. Пыжова, Н.С. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена / Н.С. Пыжова, В.Н. Никандров // *Биоорг. химия*. – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 382-391.
3. Чугай А.С. Апробация питательных сред на основе корнеплодов для глубинного культивирования вешенки обыкновенной / А.С. Чугай и [др.] // *Материалы X Междунар. молод. науч.-практ. конф. «Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси», УО «Полесский государственный университет», г. Пинск, 15 апреля 2016 г.: в 2 ч. / Мин-во образования Республики Беларусь [и др.]*; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2016. – Ч. 1. – С. 520-522.
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.