

УДК 577.151.45:582.284.3

**О PH-ЗАВИСИМОСТИ ПРОТЕИНАЗ ГРИБА ВЕШЕНКА ОБЫКНОВЕННАЯ
(*PLEUROTUS OSTREATUS*) ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

А.Д. Кульгавеня, магистрант, 2 курс

Научный руководитель – В.Н. Никандров, д.б.н., профессор

Полесский государственный университет

Одной из особенностей современной биотехнологии является рост масштабов наработки протеиназ для различных отраслей народного хозяйства. Получение этих энзимов из ранее используемого традиционного сырья сопряжено с высокими затратами. В этом отношении грибы имеют ряд преимуществ. В частности, вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) обладает высокой скоростью роста мицелия, способностью использовать различные углеродсодержащие соединения из отходов растительного сырья, относительной простотой технологии выращивания, а также устойчивостью к бактериальным, грибным и вирусным болезням [2, с. 4].

В целом, имеющиеся данные литературы о способности высших базидиомицетов синтезировать широкий спектр ценных биологически активных веществ свидетельствуют о целесообразности и перспективности дальнейших поисковых исследований среди представителей этой группы грибов. Грибы обладают разнообразным спектром энзимов, что делает их привлекательными для использования в качестве сырья для промышленности. Энзимы грибного происхождения характеризуются не только большим разнообразием, но и широкой субстратной специфичностью, устойчивостью в экстремальных условиях [1, с. 45].

Цель исследования – изучить pH-зависимость активности протеолитических энзимов культуральной жидкости и мицелия вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании гриба.

Материалы и методы. В работе использовали желатин (Fluka, Германия), бактоагар (Melford, США). Казеин по Гаммерстену, а также остальные реактивы квалификации «хч» были производства стран СНГ.

Исследования выполнены на мицелии и культуральной жидкости глубинной культуры «дикого» штамма *P. ostreatus*, выделенного в 2014 г. доцентом Е.О. Юрченко из плодовых тел, растущих на тополе в г. Минске. Гриб культивировали на картофельно-сахарозной среде при температуре 27 °С в течение двух недель. Образцы мицелия и культуральной жидкости отбирали на льду. Мицелий гомогенизировали в бидистиллированной воде и центрифугировали при 4 °С и 8000 об/мин в течении 10 минут.

Протеолитическую активность осветленного гомогената мицелия гриба и культуральной жидкости осуществляли на казеине и желатине в тонком слое агарового геля [4, с. 143-144]. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали 0,2 М ацетатный буфер pH 2,8–6,0, 0,05 М Tris-HCl pH 7,2–7,8, 0,1 М боратный буфер pH 7,6–11,0. Содержание белка определяли колориметрическим методом [3, с. 36]. Все эксперименты выполнены четырехкратно.

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют о способности внутриклеточных протеиназ вешенки при глубинном культивировании на указанной питательной среде расщеплять оба белка-субстрата (рис. 1 и 2).

Однако желатинолитическая активность, хотя и проявлялась в широком диапазоне pH, максимума достигала в диапазоне 5,8–8,0. Дополнительные максимумы проявились при pH 9,0 и 10,5. В кислой среде (pH 2,8–4,0) желатинолитическая активность гомогенатов мицелия уступал таковой при указанных pH практически на порядок (рис. 1).

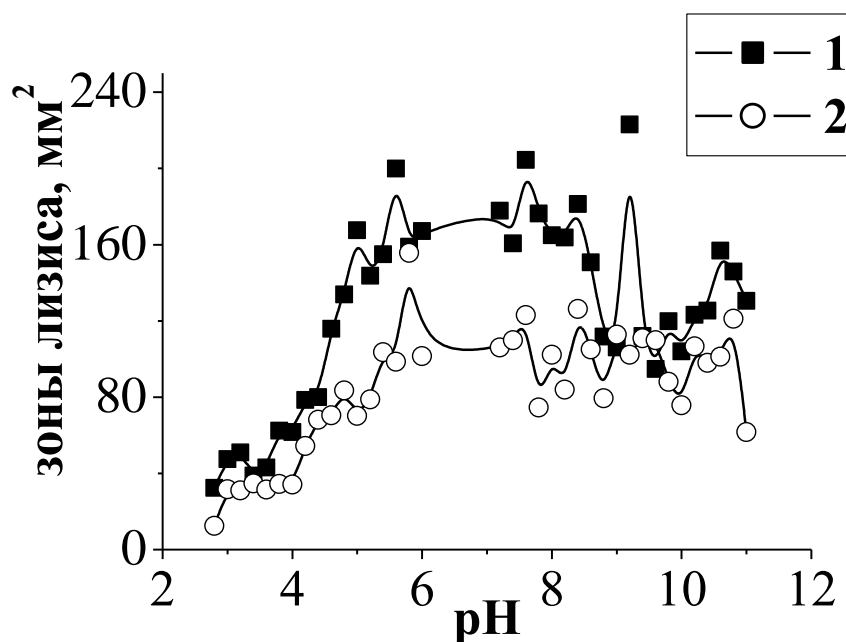


Рисунок 1 – Влияние pH реакционной системы на расщепление желатина гомогенатами мицелия (1) или культуральной жидкостью (2) *Pleurotus ostreatus* при глубинном культивировании

Казеинолитическая активность протеиназ мицелия имела иную рН-зависимость: здесь проявились три зоны рН, в которых эта активность была наиболее высока – 2,8–3,0, 4,5–5,0 и 7,0–8,0 (рис. 2). В то же время при рН выше 8,0 более никаких пиков казеинолитической активности не выявлено.

Что касается экстрацеллюлярных протеиназ культуральной жидкости, то рН-зависимость желатинолитической активности была близка таковой гомогенатов мицелия гриба (рис. 1), за исключением того, что каких-либо дополнительных максимумов при рН > 8,0 не обнаружено.

Следует отметить, что концентрация общего белка в гомогенате мицелия составила $1,02 \pm 0,006$ мг/мл, тогда как в культуральной жидкости была $0,18 \pm 0,005$ мг/мл. В силу этого удельная активность экстрацеллюлярных протеиназ мицелиальной культуры вешенки превосходит по желатинолитической активности не менее, чем в три раза таковых внутриклеточных энзимов, а по казеинолитической активности экстрацеллюлярные протеиназы мицелиальной культуры вешенки превосходили внутриклеточные энзимы в три с половиной раза.

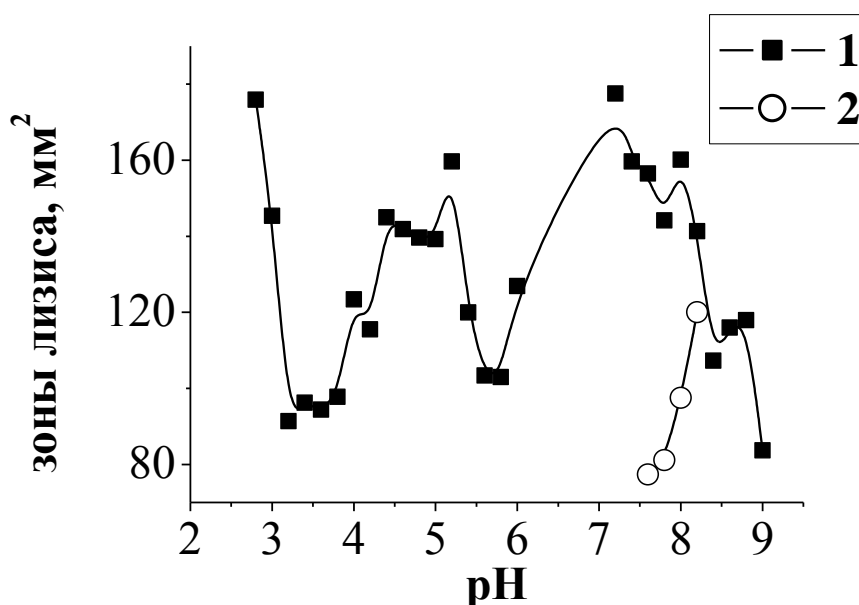


Рисунок 2 – Влияние рН реакционной системы на расщепление казеина гомогенатами мицелия (1) или культуральной жидкостью (2) *Pleurotus ostreatus* при глубинном культивировании

Заключение. Изложенные материалы дают основания полагать наличие в мицелии вешенки, а также в культуральной жидкости нескольких протеиназ, различающихся даже по расщеплению белков-субстратов. Более обстоятельное суждение будет сделано на основе эффекторного анализа. Результаты исследований также позволяют думать, что набор экстрацеллюлярных протеиназ менее разнообразен, чем внутриклеточных.

Выражаю благодарность Н.В. Журу за помощь в работе.

Список использованных источников

1. Бисько, Н.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка/ Н.А. Бисько, И.А. Дудка – К.: Наук. думка, 1987. – 148 с.
2. Бисько, Н.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Н.А. Бисько [и др.]; под ред. И.А. Дудки. – К.:Наук. думка, 1983. – 312 с.
3. Невмержицкая, Ю.Ю. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты): учеб. пособие / Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева. – Казань, 2012.– 36 с.
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.