

УДК 582.287.238:577.175.1:577.29

**ВЛИЯНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И ЭКСТРАКТА МИЦЕЛИЯ
ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ**

О.Н. Жук, Д.А. Слиж, В.В. Сакович

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

Высшие базидиомицеты вызывают интерес как источники биологически активных соединений. Основной целью является создание на основе грибов и продуктов их метаболизма лекарственных препаратов, пищевых и кормовых добавок. Подтверждением служит большое число экспериментальных исследований по высшим грибам.

В научной литературе имеются убедительные доказательства благоприятного влияния брассиностероидов (БС) – фитогормонов класса стероидов на растения. Их регуляторная роль проявляется в стимуляции процессов роста, интенсивности фотосинтеза, изменения белкового метаболизма и многих других сторон обмена веществ [1]. Влияние БС на рост и развитие культуры и плодовых тел мицелиальных грибов практически не изучено, хотя в силу значительного сходства между грибами и растениями такая постановка вопроса вполне оправдана. Особый интерес с фундаментальной и практической сторон представляет изучение действия БС на рост и развитие мицелиальных грибов в глубинной культуре. Этот биотехнологический метод позволяет не только круглогодично получать мицелий культивируемого гриба, но и выделять из него и из культуральной жидкости синтезируемые мицелием вторичные биологически активные метаболиты, в том числе и протеолитические ферменты.

Целью нашего исследования являлось изучение влияния БС на протеолитическую активность культуральной жидкости и экстракта мицелия вешенки обыкновенной.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на штамме 491 *Pleurotus ostreatus*, который был выделен из плодовых тел, выросших на тополе (*Populus sp.*). Исследуемые образцы брассиностероидов были синтезированы в Лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Для получения глубинной культуры использовали фрагменты поверхностной культуры мицелия площадью 1 см² на 100 мл питательной картофельно-сахарозной среды (КСС), с добавлением 24-ЭК в концентрациях 10⁻⁷ М, 10⁻⁹ М и 10⁻¹² М. Культивирование велось в течение 14 суток в темноте при температуре 27 °С на шейкере модели WiseShakeSHO при 70 об/мин. Способность гриба влиять на кислотность питательной среды, оценивали по изменению рН культуральной жидкости. Протеолитическую активность определяли по методике, описанной в работе [2]. Все эксперименты выполняли в шести повторах.

Результаты и обсуждение. Степень влияния брассиностероида 24-ЭК в концентрациях 10⁻⁷, 10⁻⁹ и 10⁻¹² М на накопление биомассы вешенки обыкновенной при глубинном культивировании на питательной среде КСС в течение 14 суток анализировалась по массе влажного мицелия (таблица 1).

Таблица 1. – Влияние 24-ЭК на накопление влажной биомассы *P. ostreatus* (14 сутки *in vitro*)

Концентрация брассиностероида, М	Масса влажного мицелия <i>P. ostreatus</i> , г
Контроль	17,37±0,12
24-ЭК 10 ⁻⁷	39,04±0,10
24-ЭК 10 ⁻⁹	17,01±0,11
24-ЭК 10 ⁻¹²	23,98±0,10

Выявлено, что к 14 суткам масса влажного мицелия в контроле достигла 17,37±0,12 г, при наличии в питательной среде 24-ЭК в концентрациях 10⁻⁷ М и 10⁻¹² М масса мицелия составила 39,04±0,10 г и 23,98±0,10 г, соответственно. При внесении 24-ЭК 10⁻⁹ биомасса *P. ostreatus* соответствовала значениям контроля,

Таким образом, исследуемый эпикастастерон оказывает влияние на рост мицелия и это влияние является дозозависимым – максимальный эффект выявлен при концентрации 10⁻⁷ М.

Метаболическая активность вешенки обыкновенной контролировалась по изменениям рН культуральных сред в течение срока исследования – 14 суток (таблица 2). рН среды на начало эксперимента (во время внесения посевного материала) составил 5,5±0,01.

Таблица 2. – Изменение рН среды под влиянием брассиностероидов

Образец	рН на начало эксперимента	рН на 14 сутки эксперимента
КЖ – Контроль	5,5±0,01	7,47±0,17
КЖ +24-ЭК 10 ⁻⁷ М	5,5±0,01	6,13±0,16
КЖ +24-ЭК 10 ⁻⁹ М	5,5±0,01	6,05±0,14
КЖ +24-ЭК 10 ⁻¹² М	5,5±0,01	6,36±0,13

В контрольной культуре вешенки обыкновенной к 14 суткам произошел сдвиг рН в нейтральную сторону (с $5,5 \pm 0,01$ до $7,47 \pm 0,17$). 24-ЭК во всех использованных концентрациях сдерживал изменение рН питательной среды. Причины, лежащие в основе данного факта, остаются неясными.

Протеолитическая активность метаболитов экстракта мицелия (ЭМ) имеет высокую активность по отношению к субстрату желатин (таблица 3). При добавлении 28-ГК она возрастает. Эффект имеет концентрационную зависимость – наиболее выраженный был получен при концентрации 10^{-9} М: активность возросла в 1,7 раза; при концентрации 10^{-12} М – в 1,3 раза, при концентрации 10^{-7} М – в 1,14 раза. 24-ЭК вызвал повышение желатинолитической активности только в концентрации 10^{-9} М – она увеличилась более чем в 2,3 раза.

Таблица 3. – Протеолитическая активность (ПА) протеиназ экстракта мицелия *P. ostreatus* по отношению к желатину

Источник протеиназ	Концентрация белка, мг/мл	ПА, ед/мл	Удельная ПА
Экстракт мицелия	$1,05 \pm 0,03$	84,5	101,4
ЭМ + 28ГК 10^{-7}	$1,06 \pm 0,02$	109,1	115,65
ЭМ + 28ГК 10^{-9}	$1,05 \pm 0,1$	165,9	174,2
ЭМ + 28ГК 10^{-12}	$1,04 \pm 0,07$	128,8	133,95
ЭМ + 24ЭК 10^{-7}	$1,06 \pm 0,04$	85,7	90,84
ЭМ + 24ЭК 10^{-9}	$1,04 \pm 0,02$	229,6	238,78
ЭМ + 24ГК 10^{-12}	$1,05 \pm 0,04$	92,02	96,62

При использовании 28-ГК наблюдалось увеличение выхода протеиназ в культуральную жидкость (КЖ) (таблица 4). Эффект имеет концентрационную зависимость. Наилучшие показатели были при концентрации 10^{-9} М – произошло увеличение выхода внеклеточных протеиназ в 3,15 раза, при концентрации 10^{-12} М – в 1,45 раза, при концентрации 10^{-7} М – в 1,89 раза.

24-ЭК привел к увеличению синтеза внеклеточных желатинолитических протеиназ в концентрациях 10^{-9} М и 10^{-12} М, при этом активность возросла более, чем в 1,9 раз.

Таблица 4. – Протеолитическая активность протеиназ культуральной жидкости *P. ostreatus* по отношению к желатину

Источник протеиназ	Концентрация белка, мг/мл	ПА, ед/мл	Удельная ПА
Культуральная жидкость	$0,185 \pm 0,034$	70,45	13
КЖ + 28ГК 10^{-7}	$0,191 \pm 0,02$	128,85	24,6
КЖ + 28ГК 10^{-9}	$0,187 \pm 0,023$	219,5	41
КЖ + 28ГК 10^{-12}	$0,189 \pm 0,012$	100,15	18,9
КЖ + 24ЭК 10^{-7}	$0,192 \pm 0,04$	69,85	13,4
КЖ + 24ЭК 10^{-9}	$0,187 \pm 0,022$	132,3	24,74
КЖ + 24ГК 10^{-12}	$0,184 \pm 0,13$	138,1	25,4

При использовании 28-ГК наблюдалось незначительное увеличение активности протеиназ экстракта мицелия, вызывающих лизис казеина (таблица 5). Наилучший результат был получен при концентрации 10^{-12} М: активность увеличилась в 1,13 раза. 24-ЭК также привел к некоторой активации казеинолитических протеиназ в концентрациях 10^{-7} М и 10^{-12} М: активность протеолитических ферментов увеличилась в 1,17 раза.

При применении 28-ГК наблюдалось увеличение выхода в культуральную жидкость протеиназ, вызывающих лизис казеина (таблица 6). Эффект имеет концентрационную зависимость. Наибольший выход казеинолитических внеклеточных протеиназ наблюдался при концентрации 10^{-9} М: выход протеолитических ферментов увеличился в 2,78 раза. При концентрации 10^{-12} М выход протеиназ увеличился незначительно – в 1,24 раза. 24-ЭК привел к увеличению синтеза внеклеточных казеинолитических протеиназ только в концентрации 10^{-9} М, при этом активность возросла в 1,3 раза. Можно заключить, что и 28-ГК 10^{-9} М и 24-ЭК 10^{-9} М стимулируют выход протеиназ, лизирующих желатин и казеин, из экстракта мицелия в культуральную жидкость.

Таблица 5. – Протеолитическая активность протеиназ экстракта мицелия *P. ostreatus* по отношению к казеину

Источник протеиназ	Концентрация белка, мг/мл	ПА, ед/мл	Удельная ПА
Экстрактмицелия	1,05±0,03	86,6	90,93
ЭМ + 28ГК10 ⁻⁷	1,06±0,02	91,45	96,937
ЭМ + 28ГК10 ⁻⁹	1,05±0,1	83,55	87,73
ЭМ+ 28ГК10 ⁻¹²	1,04±0,07	99,2	103,168
ЭМ + 24ЭК10 ⁻⁷	1,06±0,04	105,6	111,94
ЭМ + 24ЭК10 ⁻⁹	1,04±0,02	80,25	83,46
ЭМ + 24ГК10 ⁻¹²	1,05±0,04	102,05	107,153

Таблица 4 – Протеолитическая активность протеиназ культуральной жидкости *P. ostreatus* по отношению к казеину

Источник протеиназ	Концентрация белка мг/мл	ПА, ед/мл	Удельная ПА
Культуральная жидкость	0,185±0,034	82,35	15,2
КЖ+ 28ГК10 ⁻⁷	0,191±0,02	74,85	14,15
КЖ+ 28ГК10 ⁻⁹	0,189±0,012	236,95	42,3
КЖ+ 28ГК10 ⁻¹²	0,187±0,023	101,45	18,97
КЖ+ 28ГК10 ⁻⁹	0,192±0,04	88,45	16,98
КЖ+ 24ЭК10 ⁻⁹	0,187±0,022	107,85	20,167
КЖ+ 24ГК10 ⁻¹²	0,184±0,13	83,6	15,38

Таким образом, исследуемый БС (24-ЭК) дозозависимо стимулирует нарастание массы мицелия *P. ostreatus* в глубинной культуре, снижает скорость изменения рН в нейтральную сторону по сравнению с контролем, незначительно повышает протеолитическую способность экстракта мицелия и дозозависимо способствует выходу казеинолитических и желатинолитических протеиназ из мицелия в культуральную жидкость.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант БРФФИ Б20-143.

Список использованных источников

1. Zhabinskii, V.N. Steroid plant hormones: effects outside plant kingdom / Zhabinskii V.N., Khripach N.B., Khripach V.A. // Steroids. – Volume 97, 2015. – P. 87-97.
2. Дьяконова, Г. В. Исследование некоторых физико-химических свойств молокосвертывающих ферментов вешенки обыкновенной: автореф. диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 03.01.04 ВАК РФ, биохимия. / Г.В. Дьяконова; Кубанский государственный аграрный университет. Ростов-на-Дону. – 2010. – 44 с.