

УДК 582.287.238:577.175.1

## **О ПРОТЕИНАЗАХ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PLEUROTUS OSTREATUS*)**

**А.Д. Кульгавеня, И.А. Ильючик, В.Н. Никандров**

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*

В настоящее время выявлен существенный дефицит белка в рационе питания населения, а стоимость высококачественных животных белков непрерывно растет [1]. Дефицит белка четко проявился и в кормлении сельскохозяйственных животных. По данным экспертов проекта «Протеин России» недостаток кормовых белков составляет 770 тыс. тонн, а общий дефицит белков в России – 2 млн. тонн/год. Это обуславливает проблему поиска альтернативных источников белка [2].

Одним из альтернативных источников белка являются грибы, содержащие 30–50% белков с аминокислотным составом сопоставимым с рекомендациями ФАО (FAO). Более того, грибы достаточно богаты витаминами, в первую очередь группы В и целым рядом других биологически активных субстанций [3].

В Беларуси для употребления в пищу культивируют вешенку обыкновенную – *Pleurotus ostreatus*. Она отличается быстрым ростом и высоким выходом плодовых тел, обладает хорошими пищевыми качествами, содержит большое количество сбалансированного по аминокислотному составу белка, богата целым рядом ценных биологически активных веществ [4, 5].

Интенсификация технологии глубинного культивирования мицелия гриба диктует необходимость детального уяснения механизмов регуляции метаболизма как основы жизнедеятельности. Одним из генеральных механизмов регуляции является протеолиз.

Более того, грибы обладают разнообразным набором энзимов, включая протеиназы. Это делает их привлекательными в качестве сырья для получения препаратов протеиназ, потребность в которых испытывает ряд отраслей промышленности, сельского хозяйства и медицины.

Среди агарикоидных грибов *P. ostreatus* отличается наибольшей протеолитической активностью [6]. Она продуцирует несколько внеклеточных протеаз, которые, как полагают, участвуют, в частности, в регуляции лигнинолитической активности этого гриба.

В настоящем сообщении нами представлена краткая справка о состоянии исследований набора протеиназ указанного гриба.

Гомогенные образцы сериновой протеиназы (*ProA*, ЕС 3.4.22.9) и двух металлоэндопептидаз (*ProB*, ЕС 3.4.99.32 и *ProC*, ЕС 3.4.24.4) выделены из плодовых тел *P. ostreatus* [7, 8]. *ProA* оказалась сериновой протеиназой с мол. массой 30 кДа, обладающей также амидолитической и эстеролитической активностями и катализирующей расщепление преимущественно пептидных связей с участием карбоксильных групп гидрофобных аминокислотных остатков в окисленной В-цепи бычьего инсулина. *ProB* представляет собой цинк-содержащий энзим с мол. массой 18 кДа, не содержащий лизина. Он полностью инактивируется ЭДТА и 1,10-фенантролином, а лишённую  $Zn^{2+}$  *ProB* можно реактивировать  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ . Специфическое расщепление связи  $Pro_{29}-Lys_{30}$  в окисленной В-цепи инсулина быка, преимущественное образование лизилпептидов из белков при протеолизе и высокая чувствительность к энзиму полилизина предполагают, что *ProB* специфически расщепляет пептидные связи, включающие  $\alpha$ -аминогруппу остатков лизина. *ProC* – металлоэндопептидаза с мол. массой 42,5 кДа.  $Zn^{2+}$  из ионов двухвалентных металлов был наиболее эффективен для реактивации протеиназы, инактивированной ЭДТА [9].

Из плодовых тел указанного гриба выделен энзим мол. массой 97 кДа по данным гель-хроматографии и 48,5 кДа по данным SDS-электрофореза в полиакриламидном геле, т.е. это димер. Гидролиз энзимом Leu-pNA был чувствителен к йодацетату, *p*-хлормеркурибензоату, N-этилмалеимиду и  $HgCl_2$ . Это свидетельствует о его принадлежности к цистеиновым пептидгидролазам [10].

Выделена из культуральной жидкости (питательная среда – картофельно-декстрозный бульон с дрожжевым экстрактом) и описана внеклеточная протеаза *PoSI*. Это – мономерный гликопротеин мол. массой 75 кДа, рI 4,5 и рН-оптимумом в щелочной среде. Судя по ингибиторному анализу, *PoSI* является сериновой протеазой. Энзим расщеплял ряд нитроанилидных и эфирных субстратов (SucAAPFpNA, SucAAPLpNA, TAME, BTEE), а также азоколлаген. Исследования показали, что *PoSI* является субтилизин-подобной пептидгидролазой. Предполагают, что она играет ключевую роль в регуляции активности лакказы *P. ostreatus* путем деградации и /или активации различных изоформ [11].

Фибриногенолитическая протеаза (*PoFE*) была очищена из полученного в глубинной культуре мицелия *P. ostreatus* (синтетическая питательная среда, с глюкозой и экстрактом дрожжей). *PoFE* эффективно гидролизовала фибриноген, предпочитательно переваривая  $\alpha$ A-цепь и  $\beta$ B-цепь. Активность этой протеиназы возрастала в присутствии  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  и сильно и подавлялась ЭДТА. Она имела высокую специфичность по хромогенному субстрату S-2586 для химотрипсина. Считают, что этот энзим – химотрипсин-подобная металлопротеиназа [12].

Позднее из глубинной культуры гриба (синтетическая питательная среда, с глюкозой и соевым молоком) был выделен еще один фибриногенолитический энзим, способный гидролизовать фибриноген, расщепляя  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи, а затем –  $\gamma$ -цепи фибриногена, а также активировать плазминоген в плазмин [7].

Изложенное демонстрирует наличие в литературе весьма немногочисленных публикаций о протеолитическом потенциале *P. ostreatus*, тем более, что набор протеиназ существенно зависит от состава питательной среды и условий культивирования.

Нами впервые установлено, что мицелий и культуральная жидкость *P. ostreatus* при культивировании на питательной среде отвар «картофеля+сахароза» обладают протеолитической активностью при pH 7,4 по отношению к гемоглобину, желатину, казеину и фибриногену. Протеолитическая активность мицелия уменьшалась в ряду: желатин > казеин > фибриноген > гемоглобин [13]. А протеолитическая активность культуральной жидкости вешенки – в ряду: желатин > казеин > гемоглобин > фибриноген. Протеолиз желатина, казеина и фибриногена интенсивнее реализовался мицелием гриба, а культуральной жидкостью интенсивнее расщеплялся только гемоглобин [13].

При этом желатинолитическая активность проявлялась в широком диапазоне pH и была наиболее высока в диапазоне pH 5,8–8,0 с дополнительными максимумами при pH 9,0 и 10,5. Казеинолитическая активность протеиназ мицелия имела иную pH-зависимость: выявлены три зоны pH, в которых эта активность достигала максимума – 2,8–3,0, 4,5–5,0 и 7,0–8,0. Вместе с тем при увеличении pH выше 8,0 значительного роста казеинолитической активности не обнаружено. Что касается протеиназ культуральной жидкости, то pH-зависимость желатинолитической активности была близка таковой гомогенатов мицелия гриба [14, 15].

Ингибиторный анализ показал, что желатинолитическая активность умеренно (на 38–61%) угнеталась диизопропилфосфатом и реагентами, связывающими металлы. Активность «щелочных» желатиназ полностью подавлялась диизопропилфторфосфатом, *p*-хлормеркурибензоатом и *o*-фенантролином. Казеинолитическая активность при pH 2,8 и 5,2 полностью угнеталась пепстатином, а при pH 5,2 – и ЭДТА. При pH 7,6 казеинолитическая активность полностью подавлялась диизопропилфосфатом и *p*-хлормеркурибензоатом. Судя по ингибиторному анализу, желатинолитическая и казеинолитическая активность культуральной жидкости обусловлена, в основном, сериновыми протеиназами [15].

Вместе с тем было обнаружено, что желатинолитическая активность протеиназ мицелия вешенки с pH-оптимумом при 9,2 и протеиназ культуральной жидкости с pH-оптимумом при 7,6 была слабо чувствительна ко всем использованным нами в исследовании группоспецифическим ингибиторам [15]. Это позволяет предположить наличие во всем многообразии протеиназ данного гриба протеиназ иного типа, природа которых нуждается в дальнейших исследованиях.

Ранее нами и при изучении очищенных коммерческих образцов белков-ингибиторов протеиназ: ингибитора трипсина из соевых бобов (SBTI), овомукоида и овоингибитора также были описаны проявления необычных свойств протеолитической активности образцов указанных белков-ингибиторов. Кроме того, в некоторых случаях был обнаружен еще один необычный эффект – активация протеолиза в присутствии фенилметилсульфонилфторида [16, 17].

Следовательно, принимая во внимание разнообразие живых организмов, вероятно, существуют в сравнении с известными группами протеиназ иные пептидгидролазы, активный центр которых не подавляется обычно используемыми в экспериментах группоспецифическими ингибиторами. Это открывает перспективы дальнейших исследований структуры и функциональных особенностей подобных энзимов. Что касается мицелиальной культуры *P. ostreatus*, то совершенно ясно, что состав питательной среды будет существенно влиять на набор протеиназ, и это может быть в дальнейшем использовано для направленного изменения арсенала этих энзимов.

#### Список использованных источников

1. Кудинов, П.И. Современное состояние и структура мировых ресурсов растительного белка / П.И. Кудинов, Т.В. Щеколдина, А.С. Слизькая // Известия вузов. Пищевая технология. – 2012. – № 5–6. – С. 7–10.
2. Рождественская, Л.Н. Анализ вызовов и современных тенденций развития технологий на рынке белков / Л.Н. Рождественская, Е.С. Бычкова, А.Л. Бычков // Пищевая промышленность. – 2018. – № 5. – С. 42–47.
3. Ritala, A. Single cell protein – state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016 / A. Ritala, S.T. Häkkinen, M. Toivari, M.G. Wiebe // Frontiers in Microbiol. – 2017. – Vol. B. art. 2009. – P. 1–18.
4. Стахеев, И.В. Биотехнология малотоннажного производства микробного протеина / И.В. Стахеев, Э.И. Коломиец, Н.А. Здор // Минск: «Навука і тэхніка». – 1991. – 264 с.

5. Järvinen, R. Physiological effect of Pekilo single cell protein in pigs / R. Järvinen, R. Savonen, A. Ahlström // *Agricultural and Food Science*. – 1980. – Vol. 52. – P. 14–23.
6. Gregori, A. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. // A. Gregori, M. Svagelj, J. Pohleven // *Food Technology Biotechnology* – 2007 – Vol. 45, N. 3, P. 238-249.
7. Liu, X.L. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from culture supernatant of *Pleurotus ostreatus* / X.L. Liu [et al.] // *J Microbiol Biotechnol*. – 2014. – V. 24(2): P. 245-253.
8. Pillai, S. ATP Activation of parathyroid hormone cleavage catalyzed by cathepsin D from bovine kidney / S. Pillai, R. Botti, J. E. Zull // *J. Biol. Chem.* – 1983 – Vol. 258, P. 9724–9728.
9. Dohmae, N. Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies / N. Dohmae [et al.] // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 1995. – V. 59(11): P. 2074-2080.
10. Shin, H.H. Purification and characterization of cysteine protease from *Pleurotus ostreatus* / H.H. Shin, H.S. Choi // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 1998. – V. 62(7): P.1416-1418.
11. Palmieri, G. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus* / G. Palmieri [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2001. – V. 67(6): P.2754-2749.
12. Shen, MH. Purification, characterization, and cloning of fibrinolytic metalloprotease from *Pleurotus ostreatus* mycelia / MH. Shen [et al.] // *J Microbiol Biotechnol.* – 2007. – Aug;17(8): P. 1271-1283.
13. Жук, О. Н. Влияние хлорида марганца (II) на протеолитическую активность гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании / О. Н. Жук [и др.] // *Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук.* – 2017. – № 2. – С. 62–68.
14. Кульгавеня, А. Д. О рН-зависимости протеиназ гриба вешенка обыкновенная (*pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании // А. Д. Кульгавеня // *Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси: материалы XIII международной молодежной научно-практической конференции, Пинск, 5 апреля 2019 г.: в 3-х ч. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2019. – Ч. 3. – С. 60-62.*
15. Кульгавеня, А. Д. Протеолитическая активность мицелиальной культуры гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании / А.Д. Кульгавеня, В.Н. Никандров // *Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук* – 2020. – № 1. – С. 12-23.
16. Никандров, В. Н. Регуляторные белки: функциональные свойства молекул и механизмы их биологического действия / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Известия НАН Беларуси. Серия мед.-биол наук.* 2003. – № 3. – С. 75-89.
17. Никандров, В. Н. Протеолиз как универсальный механизм регуляции биохимических и биологических процессов. Дискуссионные аспекты / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Известия НАН Беларуси. Серия медицинских наук.* 2008. – № 1. – С. 4–22.