



ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ БАЗИДИОМИЦЕТОВ И ИХ АКТИВНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К РАЗЛИЧНЫМ БЕЛКОВЫМ СУБСТРАТАМ

Шпирная И.А., Цветков В.О., Мещерякова Е.С., Валиахметова К.И., Ибрагимов Р.И.

Башкирский государственный университет, г. Уфа, *i-shia@yandex.ru*

Резюме

В плодовых телах ряда дикорастущих базидиальных грибов определен уровень активности экстрактивных протеолитических ферментов. Показано, что протеазы базидиомицетов активно гидролизуют синтетический субстрат и различные белковые субстраты (желатин, казеин, яичный альбумин). Определена температура и pH среды, при которых ферменты обладают наибольшей активностью.

Ключевые слова: базидиомицеты, протеолитические ферменты, белковый субстрат, термостабильность, pH-оптимум.

В современных биотехнологических производствах в качестве сырья для получения ферментных препаратов широко используются культуры микроорганизмов, в частности, бактерий и микроскопических грибов. Однако, при использовании микробных культур в качестве продуцентов различных соединений, возникает ряд проблем, таких как риск развития различного рода заболеваний у работников производства, а также определенные технические сложности в процессе культивирования. Использованию высших грибов в качестве источника для получения биологически активных соединений уделяется значительно меньше внимания. Между тем, базидиальные грибы являются продуцентами целого ряда биологически активных молекул: белков (ферментов), липидов, полисахаридов, органических кислот, витаминов и, соответственно, могут служить источником для промышленного получения перспективных препаратов пищевого (кормового), медицинского назначения. Преимуществами этих грибов при промышленном культивировании являются отсутствие спороношения в культуре, что уменьшает опасность профессиональных заболеваний в условиях производства, и возможность использования ряда грибов в качестве пищевых ингредиентов [Псурцева и др., 2007; Петров и др., 2008]. Имеющиеся в настоящее время многочисленные данные о способности высших базидиомицетов синтезировать широкий спектр ценных биологически активных веществ (БАВ) свидетельствуют о важности и перспективности

проведения дальнейших поисковых исследований в рамках этой группы грибов [Chang, 1999; Wasser, Weis, 1999; Кудрявцева и др., 2008].

Грибы обладают разнообразным ферментным составом, это свойство делает их привлекательными для использования в качестве сырья для промышленности. Ферменты грибного происхождения характеризуются большим разнообразием, широкой субстратной специфичностью, устойчивостью в экстремальных условиях [Беккер, 1988; Данилак и др., 1989; Дунаевский и др., 2006]. В этом плане, исследование активности, физико-химическая и биологическая характеристика ферментов у различных представителей высших грибов является актуальной задачей. Целью данной работы было измерение уровня активности протеолитических ферментов в экстрактах плодовых тел базидиомицетов, и характеристика грибных протеиназ.

Методика

Объектом исследования служили плодовые тела базидиомицетов: опенка осеннего (*Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm); масленка обыкновенного (*Suillus luteus* (L.: Fr.) Roussel); подберезовика обыкновенного (*Leccinum scabrum* (Bull.) Gray); рыжика настоящего (*Lactarius deliciosus* (L.) Gray); трутовика серно-желтого (*Laetiporus sulphureus* (Fr.) Bond. et Sing). Плодовые тела собирали в сентябре-октябре в Иглинском районе Республики Башкортостан. Отбирали образцы плодовых тел грибов, принадлежащих к различным семействам,

находящиеся в фазе роста, средних размеров, без червоточин, плотной консистенции, образцы замораживали сразу после сбора.

Для получения экстрактов с ферментативной активностью навеску замороженных плодовых тел растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком, экстрагировали дистиллированной водой (1:1). Выдерживали 1,5 часа при 4⁰С, фильтровали и дважды, последовательно центрифугировали при 10000 об/мин на центрифуге MPW-310 (Польша) в течение 10 мин, далее использовали супернатант.

Активность ингибиторов протеиназ определяли спектрофотометрически, по гидролизу синтетического субстрата БАПНА (N, α -бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилид HCl) [Erlanger et al., 1961], за миллиединицу активности принимали такое количество фермента, которое образует 1 μ M п-нитроанилида за 1 мин. Также определяли протеолитическую активность по интенсивности гидролиза белков (желатины, казеина, яичного альбумина) иммобилизованных в геле агарозы [Шпирная и др., 2009]. При этом, активность фермента рассчитывали, измеряя размер участка геля с гидролизованным субстратом вокруг лунки. За 1 миллиединицу активности (мЕ) фермента принимали такое количество фермента, которое гидролизовало субстрат на участке геля размером 1 мм².

Эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях.

В качестве величины погрешности использовали доверительный интервал выборочного среднего.

Результаты и обсуждение

Из культур базидиомицетов выделено, очищено и охарактеризовано более сотни ферментных препаратов, но поиск новых видов грибов – продуцентов разнообразных ферментов, остается актуальным [Псурцева и др., 2007]. Протеолитические ферменты грибов привлекают внимание исследователей по ряду причин, среди которых наиболее значимы участие во многих процессах (протеолиз), большое разнообразие, широкая субстратная специфичность, устойчивость к экстремальным воздействиям (Даниляк, 1989; Кудрявцева, 2008).

Для исследований были отобраны образцы плодовых тел грибов, относящихся к классу базидиомицетов, широко распространенных на территории Республики Башкортостан.

На рисунке 1 представлены значения активности грибных протеаз, гидролизующих синтетический субстрат (БАПНА). Как видно, исследуемые виды грибов обладают различными значениями БАПНА-азной активности. Высокая активность ферментов (60-78 мЕ/мл) характерна для говорушки, подберезовика, трутовика. Уровень активности протеиназ у мухомора, сыроежки, рыжика существенно ниже и не превышает 15 мЕ/мл.

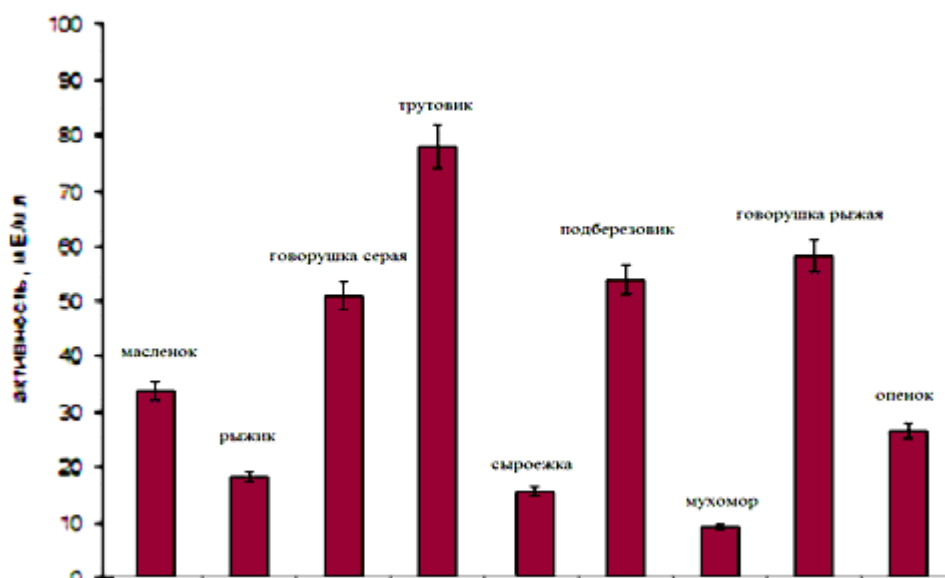


Рис.1. Активность протеолитических ферментов в плодовых телах различных базидиальных грибов (субстрат БАПНА)

Наряду с синтетическим субстратом, ферменты грибов способны гидролизовать и природные субстраты протеиназ - полипептиды. При этом, уровень активности ферментов зависит как от вида гриба, так и от типа гидролизуемой полипептидной молекулы (табл.1.). Как видно, протеолитические ферменты грибов проявляют широкую субстратную специфичность и катализируют гидролиз желатина, казеина и яичного белка. Наибольшая протеолитическая активность среди исследованных образцов выявляется у трутовика серно-желтого, ферменты которого наиболее активно гидролизуют желатин. В целом, можно отметить, что ферменты всех исследуемых образцов наибольшую активность проявляют к

желатине, значительно меньшую - к казеину и альбумину.

По-видимому, для гидролиза казеина и альбумина необходимо большее разнообразие ферментов, чем для расщепления частично гидролизованной нагреванием белка коллагена - желатины. Интересно, что активность протеаз опенка осеннего и масленка обыкновенного проявляется на сходном уровне, независимо от типа белкового субстрата.

Как известно, в плодовых телах и мицелии высших базидиомицетов присутствуют ферменты всех механистических классов протеиназ: карбоксильные, сериновые, цистеиновые и металлопротеиназы [Денисова, 1984; Кудрявцева и др., 2008].

Таблица 1

Показатели протеолитической активности ферментов по отношению к различным белковым субстратам

№ п/п	Семейство	Образец	Протеолитическая активность, Е/г массы		
			желатина	казеин	альбумин
1	<i>Tricholomataceae</i>	Опенк осенний	5,97±0,53	5,65±0,53	4,19±0,53
2	<i>Suillaceae</i>	Масленок обыкновенный	6,98±0,53	7,33±0,53	4,75±0,53
3	<i>Boletaceae</i>	Подберезовик обыкновенный	12,3±0,53	5,04±0,53	5,04±0,53
4	<i>Russulaceae</i>	Рыжик настоящий	9,23±0,53	5,04±0,53	5,04±0,53
5	<i>Polyporaceae</i>	Трутовик серно-желтый	14,67±0,53	9,23±0,9	6,98±0,53

Высокий уровень протеолитической активности можно объяснить «двойной» физиологической функцией, которую выполняют эти ферменты в организме грибов. Известно, что протеиназы могут как гидролизовать полипептидные молекулы, так и катализировать синтез пептидных связей [Овчинников, 1987]. В молодых мицелиях «синтезирующая» способность ферментов может преобладать над «гидролизующей» [Даниляк и др., 1987].

Далее экстракты образцов с наибольшей активностью ферментов (трутовик и подберезовик) исследовали с целью определения оптимальных для действия ферментов температуры и рН среды.

При исследовании термостабильности ферментов реакцию гидролиза проводили в течение 30 мин при различных значениях температур в интервале 25- 80⁰С. Оказалось, что наибольшую активность протеиназы гриба проявляют в интервале температур 30-35⁰С. При температуре свыше 35⁰С происходит резкое снижение ферментативной активности (более чем в два раза). В интервале 45 – 60⁰С, протеиназы сохраняют около 50% своей первоначальной активности, инактивация ферментов наступает в интервале температур 75- 80⁰С.

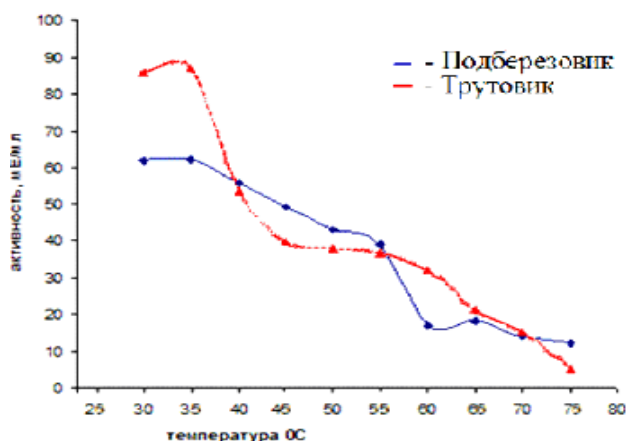


Рис. 2. Зависимость протеолитической активности ферментов грибов от температуры инкубационной среды.

Для определения оптимального значения pH среды использовали разные буферные смеси (ацетатный, фосфатный и трис-НСI буфер). Исследуемые ферменты проявляют активность в основном при нейтральных и слабощелочных значениях pH (табл.2). Наибольшую активность ферменты проявляют в щелочной среде в трис-НСI буфере (pH 8,2), в ацетатном буфере при pH 5,6 протеолитическая активность практически отсутствует.

Таблица 2

Активность протеаз грибов при различных pH среды, мЕ/мл

Образец	pH 5,6	pH 7,0	pH 8,2
Трутовик серно-желтый	9,3±0,02	30,7±0,03	88,0±0,003
Подберезовик	5,3±0,01	16,6±0,02	61,5±0,007

Таким образом, в протеолитическом комплексе подберезовика и трутовика серно-желтого предположительно преобладают сериновые протеазы, pH оптимум действия которых лежит в щелочной среде [Мосолов, 1971; Матвеева, 2008].

Таким образом, в плодовых телах ряда дикорастущих базидиальных грибов определена активность протеолитических ферментов, показано, что протеазы базидиомицетов активно гидролизуют синтетические и белковые субстраты. Наиболее активно протеиназы исследуемых грибов расщепляют белок желатин. Оптимальная температура для функционирования исследуемых ферментов находится в интервале 30-35°C, оптимум pH – в слабощелочной области.

Литература

1. Беккер З.Э Физиология и биохимия грибов. – М.: изд-во Моск. ун-та. 1988. 230 с.
2. Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Тругнева И.А. Ферментные системы высших базидиальных грибов– Киев: Наукова Думка, 1989. 280 с.

3. Денисова Н.П. Природа и биологическая роль протеиназ базидиальных грибов // микология и фитопатология. 1984. Т. 18. С. 116-121.

4. Дунаевский Я.Е., Дун Чжан, Матвеева А.Р., Белякова Г.А., Белозерский М.А. Дегградация белковых субстратов ксилотрофными базидиомицетами // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 46–51.

5. Кудрявцева О. А., Дунаевский Я. Е., Камзолкина О. В., Белозерский М. А. Протеолитические ферменты грибов: особенности внеклеточных протеаз ксилотрофных базидиомицетов // Микробиология. 2008. т.77, №6. с. 725 – 737.

6. Матвеева А.Р. Секретируемые протеазы некоторых мицелиальных грибов: выделение, очистка и характеристика физико-химических и функциональных свойств // Автореферат дис. ... к.б.н.. М.: 2008. 24 с.

7. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. -М.: Наука, 1971. - 414 с.

8. Петров П.Т., Скрипко А.Д., Литвинова К.В. Новые лекарственные средства на основе

биологически активных соединений мицелиальных грибов // Успехи медицинской микологии. 2006. - Т. 7. - С. 198-199.

9. Псурцева Н.В., Кияшко А.А., Шахова Н.В. Эколого-таксономические предпосылки получения плодовых тел в культуре макромицетов, представляющих интерес для медицины // Успехи медицинской микологии. 2007. - Т. IX. — С. 254-258.

10. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение. 1987. 815 с.

11. Chang S.-T. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st

century: nongreen revolution// International Journal of Medicinal Mushrooms, 1999, V.1, P.1-7.

12. Erlanger B., Kokowski N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 95. P. 271-278.

13. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review)// International Journal of Medicinal Mushrooms, 1999, V.1, P.31-62.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ БАЗИДИОМИЦЕТОВ И ИХ АКТИВНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К РАЗЛИЧНЫМ БЕЛКОВЫМ СУБСТРАТАМ

Шпирная И.А., Цветков В.О., Мещерякова Е.С., Валиахметова К.И., Ибрагимов Р.И.

Башкирский государственный университет, г. Уфа, *i-shia@yandex.ru*

Abstract

In fruit bodies of some wild basidial fungi a level of extractive proteolytic enzymes was defined. Proteases of basidiomycetes actively hydrolyses the synthetic substrate and different protein substrates (gelatin, casein, egg albumine). A temperature and pH of the best enzymes activity were defined.

Ключевые слова: базидиомицеты, протеолитические ферменты, белковый субстрат, термостабильность, pH-оптимум.