

УДК 577.151.45:582.284.3

А.Д. КУЛЬГАВЕНЯ

аспірант¹

E-mail: aleksandra.kulgavenya.96@mail.ru

В.Н. НИКАНДРОВ, д-р биол. наук, профессор,

профессор кафедры биотехнологии¹

¹Полесский государственный университет,

г. Пинск, Республика Беларусь

E-mail: nikandrov.vitaly@gmail.com

Статья поступила 1 апреля 2020г.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИЦЕЛИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ ГРИБА ВЕШЕНКА ОБЫКНОВЕННАЯ (*PLEUROTUS OSTREATUS*) ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Протеиназы гомогената мицелия вешенки расщепляли желатин при pH 2,8–11,0 (максимум при 5,0–8,5 и 10,6), казеин – при pH 2,8–9,0 (максимум при 2,8, 4,0–5,0 и 6,2–8,2) и гемоглобин – при pH 2,8–11,0 (максимум при 4,6–5,6 и 7,0–8,2). При концентрации группоспецифических ингибиторов 10⁻³ М 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.

Желатинолитическая активность экстрацеллюлярных протеиназ проявилась при pH 3–11 (максимум при 5,8–10,6), их казеинолитическая активность – лишь при pH 7,6–8,2, а гемоглинолитическая активность – в диапазоне pH 7,6–10,0 (максимум при 8,6–9,4). Однако, судя по концентрации белка, активность экстрацеллюлярных протеиназ превосходит таковую внутриклеточных энзимов в ряде случаев на целый порядок. Судя по результатам ингибиторного анализа, желатинолитическая и казеинолитическая активность культуральной жидкости обусловлена, в основном, сериновыми протеиназами.

Вместе с тем, желатинолитическая активность внутриклеточных протеиназ при pH 9,2 и экстрацеллюлярных протеиназ при pH 7,6 была слабо чувствительна к использованным в данном исследовании группоспецифическим ингибиторам. Это позволяет предположить существование протеиназ иного типа.

Ключевые слова: протеиназы, мицелиальная культура, экстрацеллюлярные протеиназы, белки субстраты, pH-зависимость протеолиза, группоспецифические ингибиторы протеиназ

KULGAVENYA Alexandra D.

Graduate Student¹

NIKANDROV Vitaliy N., Doctor of Biol. Sc. Habil., Professor,

Professor of the Department of Biotechnology¹

¹Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF FUNGUS *PLEUROTUS OSTREATUS* MYCELIAL CULTURE IN DEEP-LIQUID CULTIVATION

It was stated that proteinases of Pleurotus mycelium homogenate cleaved gelatin at pH 2.8–11.0 (proteolysis maximums at 5.0–8.5 and 10.6), casein at pH 2.8–9.0 (maximums at 2.8, 4.0–5.0, and 6.2–8.2), and hemoglobin at pH 2.8–11.0 (maximums at 4.6–5.6 and 7.0–8.2). At 10⁻³ M concentration of group-specific inhibitors, gelatinolytic activity was moderately (38–61%) suppressed by diisopropylfluorophos-

phate and metal-binding reagents. The activity of 'alkaline' gelatinases was completely suppressed by diisopropylfluorophosphate, *p*-chloromercuribenzoate, and *o*-phenanthroline. Caseinolytic activity at pH 2.8 and 5.2 was completely inhibited by pepstatin and at pH 5.2 – by EDTA. At pH 7.6 the caseinolytic activity was completely suppressed by diisopropylfluorophosphate and *p*-chloromercuribenzoate.

Gelatinolytic activity of extracellular proteinases appeared at pH 3–11 (proteolysis maximum at 5.8–10.6), their caseinolytic activity – only at pH 7.6–8.2, and hemoglobinolytic activity – in the range of pH 7.6–10.0 (maximum at 8.6–9.4). However, judging by the protein concentration, the activity of extracellular proteinases exceeds that of intracellular enzymes in some cases by an order of magnitude. According to the results of the inhibitory analysis, gelatinolytic and caseinolytic activities of the culture fluid are provided mainly by serine proteinases.

However, gelatinolytic activity of intracellular proteinases at pH 9.2 and extracellular proteinases at pH 7.6 was weakly sensitive to the class-specific inhibitors used in this study. This suggests the existence of some other type of proteinases.

Keywords: proteases, mycelial culture, extracellular proteases, protein substrates, pH-dependence of proteolysis, class-specific protease inhibitors

Введение. В последние десятилетия выявлен существенный дефицит белка в рационе питания населения. Нужно отметить также, что на кормовые, семенные и непищевые цели может направляться до 28% белка, потенциально пригодного в пищу человека. Кроме того, стоимость высококачественных животных белков непрерывно растет [1].

Нельзя не принять во внимание, что для огромного количества населения доступность животного белка резко ограничена (страны Африки, Южной Америки, Индия) и преобладающую часть их рациона составляют растительные белки. Дефицит белка четко проявил себя 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. Ликвидировать дефицит белка, лишь расширяя посевные площади или увеличивая поголовье скота, стало невозможно, что выдвигает проблему поиска альтернативных источников белка [2].

Подсчитано, что к 2050 году мировому сообществу потребуется 1.250 миллионов тонн мяса и молочных продуктов в год. Одним из альтернативных источников являются грибы, содержащие 30–50% белков с аминокислотным составом, сопоставимым с рекомендациями ФАО (ФАО). Более того, грибы достаточно богаты витаминами, в первую очередь группы В, и целым рядом других биологически активных субстанций [3].

Следует отметить, что глубинное культивирование съедобных базидиальных грибов насчитывает уже более 70 лет. К числу объ-

ектов культивирования того времени относятся и вешенка обыкновенная – *Pleurotus ostreatus*, хотя она и уступала некоторым другим грибам по содержанию белка в биомассе [4].

Грибной белок *Pekilo*, получаемый ферментацией мицелиальным грибом *Paecilomyces varioti* углеводов мелассы, молочной сыворотки, отходов фруктов, гидролизатов древесины или сельскохозяйственно-го сырья имеет хороший аминокислотный состав и богат витаминами. *Pekilo*-протеин – хороший источник белка в кормлении свиней, телят, бройлеров, кур-несушек и производится при непрерывном культивировании [5].

В Британии компания *Ranks Hovis McDouall* и корпорация *ICI* поставляют на рынок грибной белок (мусорпротеин), получаемый при выращивании гриба *Fusarium* на простых углеводах. Он производится для употребления в пищу людей также при непрерывной ферментации. Микопроtein хорошо переваривается [6, 7].

В нашей стране 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 [8, 9]. По объему производства плодовых тел этот гриб занимает третье место в мире.

Интенсификация технологии получения мицелия, обогащенного белками, настоя-

тельно диктует необходимость уяснения биологии этого продуцента и, в частности, систем регуляции метаболизма и жизнедеятельности.

Одним из генеральных механизмов такой регуляции является протеолиз. О протеолитической системе вешенки данные мировой литературы весьма ограничены.

Из плодовых тел этого гриба выделены три протеиназы, проявляющие казеинолитическую активность при pH 5,6, при этом одна из них – сериновая протеиназа с функционально значимыми HS-группами, а две другие – Zn-содержащие металлоэнзимы [10]. Из культуральной жидкости при культивировании вешенки в жидкой питательной среде выделена экстрацеллюлярная сериновая субтилизин-подобная протеиназа, расщепляющая синтетические субстраты нитроанилидного, сложноэфирного плана и азоколлаген с оптимумом pH в щелочной зоне [11]. Была установлена и казеинолитическая активность протеиназ культуральной жидкости гриба с pH-оптимумом при 7,0 [12]. Еще более мало числены сведения о протеолитической системе мицелия.

Ранее нами было описано расщепление при pH 7,4 протеиназами культуральной жидкости и мицелия *Pleurotus ostreatus* не только казеина, но и гемоглобина, желатина и фибриногена. Причем интенсивность расщепления перечисленных белков протеиназами мицелия образовывала следующий ряд:

желатин > казеин > фибриноген > гемоглобин;

тогда как при действии экстрацеллюлярных протеиназ эта последовательность выглядела следующим образом:

казеин > желатин \approx фибриноген > гемоглобин [13].

Были также получены предварительные данные о влиянии pH на расщепление желатина и казеина гомогенатами мицелия и культуральной жидкостью [14].

Однако все эти результаты носят фрагментарный характер и не составляют целостной картины особенностей внутриклеточного и экстрацеллюлярного протеиназного аппарата мицелиальной культуры *P. ostreatus*.

Цель настоящей статьи – раскрыть особенности влияния группоспецифических ингибиторов и pH на расщепление белков субстратов протеиназами глубинной культуры гриба вешенка обыкновенная.

Материалы и методы. В работе использовали бактоагар (Melford, USA), казеин по

Гаммерстену (Россия), гемоглобин быка, диизопропилфторфосфат и пепстатин А (Sigma, USA), желатин (Fluka, Germany), 1,10-фенантролин и ЭДТА (Alfa Aesar, Germany), *p*-хлормеркурибензоат (Carl Roth, Germany), 8-гидроксихинолин (Chem-impex, Germany). Остальные реактивы были квалификации «хч» производства стран СНГ.

Исследования выполнены на «диком» штамме *Pleurotus ostreatus*, выделенном кандидатом биологических наук доцентом кафедры биотехнологии Е.О. Юрченко в 2014г. из плодовых тел, растущих на культурном тополе (*Populus* sp.) в г. Минске.

Как описано нами ранее, глубинное культивирование вешенки проводили в стеклянных колбах емкостью 500 мл при температуре 27 °С в течение 14 сут на качалке модели WiseShakeSHO-2D и режиме перемешивания 70 об/мин. [15]. В качестве питательной среды использовали отвар картофеля с добавлением сахарозы [16].

По окончании инкубации отбирали по 1 мл культуральной жидкости, а биомассу гриба из каждого образца отмывали, максимально просушивали на фильтровальной бумаге, навески по 0,5 г помещали в пробирки типа эппендорфа.

Культуральную жидкость использовали без дополнительного разведения. Навеску мицелия вешенки гомогенизировали на холоду в течение 2 мин в бидистиллированной воде, центрифугировали в течение 10 мин при 4 °С и 8000 об/мин. Осветленный гомогенат использовали для дальнейших исследований.

Протеолитическую активность определяли по расщеплению белков-субстратов в тонком слое агарового геля как подробно описано ранее [17]. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали 0,15 М раствор NaCl pH 7,4. Для исследования pH-зависимости к исследуемым образцам добавляли 0,2 М ацетатный буфер pH 2,8–6,0, 0,05 М трис-HCl буфер pH 7,2–8,0 и 0,1 М боратный буфер pH 8,2–11,0.

Растворы ингибиторов вносили в конечной концентрации 10^{-3} М, диизопропилфторфосфат и 8-гидроксихинолин растворяли в этаноле. Количество белка определяли колориметрическим методом [18].

Все исследования проведены не менее чем четырехкратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программ *Statistica 6.0* по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение.

pH-зависимость. Судя по полученным результатам, протеиназы мицелия способны расщеплять все три белка-субстрата в широком диапазоне pH.

Так, желатинолитическая активность проявлялась в диапазоне pH 2,8 – 11,0 (рисунок 1а). Причем наиболее интенсивное расщепление желатина наблюдалось, начиная с pH 4,4, и к величине pH 5,6 достигало максимума. При дальнейшем увеличении pH до 8,5 колебания желатинолиза не превышали $\pm 25\%$. Затем наблюдались некоторый спад

желатинолитической активности, достаточно резкое увеличение ее при pH 9,02, повторное снижение, а при pH 10,6 – возрастание желатинолитической активности практически до уровня таковой в диапазоне pH 5,0–8,5.

pH-зависимость расщепления казеина характеризовалась тремя четко обозначившимися зонами наибольшей интенсивности данного процесса: pH 2,8, 4,0–5,0 и 6,0–8,2. При этом казеинолитическая активность также проявлялась вплоть до pH 9,0, хотя и в значительно меньшей степени, чем в упомянутых трех зонах (рисунок 1а).

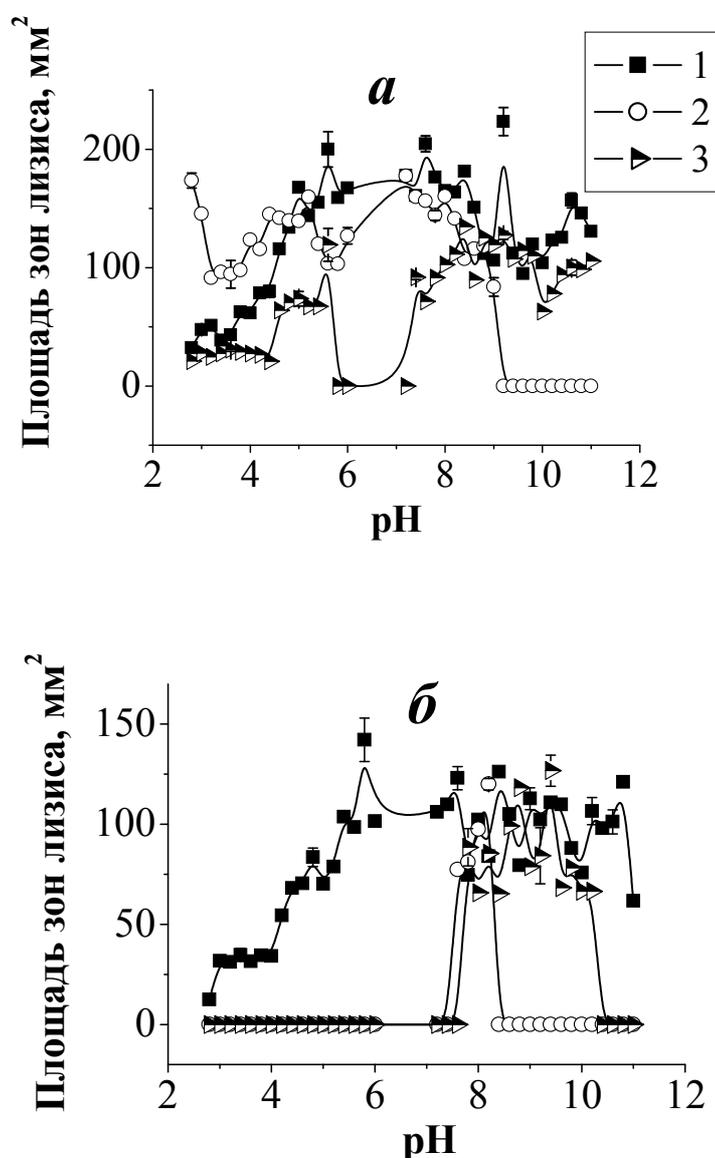


Рисунок 1. – pH-зависимость расщепления желатина (1), казеина (2) и гемоглобина (3) гомогенатами мицелия (а) или культуральной жидкостью (б) культуры вешенки обыкновенной

Протеиназы мицелия вешенки очень слабо расщепляли гемоглобин при рН 2,8–4,2. Однако уже при рН 4,6–5,6 гемоглинолитическая активность резко возрастала с последующим снижением при рН 5,8. При дальнейшем увеличении рН, начиная с 7,0, вновь возрастала, достигая максимума при рН 8,4 – $134,5 \pm 8,2 \text{ мм}^2$, причем в диапазоне рН 8,0–9,5 колебания гемоглинолитической активности составили $\pm 50\%$. Снижение ее до $62,8 \pm 4,0 \text{ мм}^2$ выявлено при рН 10,0, но при дальнейшем увеличении рН гемоглинолитическая активность возрастала и при рН 11,0 ее уровень составлял $105,5 \pm 16,5 \text{ мм}^2$, не достигая, однако, максимальных значений в слабощелочной среде.

Иная картина наблюдалась при исследовании культуральной жидкости. Желатинолитическая активность ее также проявилась в широком диапазоне рН 3–11. Максимального уровня она достигала при рН 5,8, а в диапазоне рН 6,5–10,5 ее колебания соответствовали $\pm 25\%$ (рисунок 1б).

Расщепление же казеина экстрацеллюлярными протеиназами было выявлено лишь в щелочной среде, в узком диапазоне рН, начиная с 7,6, и достигало максимальной величины при рН 8,2. В более щелочной среде протеиназы культуральной жидкости этот белок не расщепляли.

Близкая картина наблюдалась и для лизиса гемоглобина. В диапазоне рН 2,8–7,4 лизис гемоглобина вообще не определялся. И только начиная с рН 7,5, гемоглинолитическая активность проявлялась в диапазоне рН 7,6–10,0, достигая максимума при рН 8,6–9,4. В более щелочной среде такая активность культуральной жидкости не зафиксирована (рисунок 1б).

Нужно также отметить, что содержание общего белка в гомогенате мицелия и в культуральной жидкости составляло $1,02 \pm 0,01$ и $0,18 \pm 0,01 \text{ мг/мл}$ соответственно.

Следовательно, мицелий данного гриба имеет достаточно разнообразный набор протеиназ, отличающихся широкой субстратной

специфичностью. Можно полагать, что эти энзимы способны расщеплять и ряд других белков, которые не были использованы в рамках настоящей работы. Уже анализ рН-зависимости расщепления желатина, казеина и гемоглобина позволяет думать, что в протеолитическом арсенале мицелия присутствуют протеиназы нескольких типов.

Что же касается набора экстрацеллюлярных пептидгидролаз, то он менее разнообразен. Это вполне объяснимо, ибо протеолитический ансамбль внутриклеточного плана выполняет очень многоплановые функции, включая целый ряд регуляторных. Экстрацеллюлярные же протеиназы нацелены, прежде всего, на расщепление субстратов питательной среды. Они обеспечивают поступление в мицелий аминокислот.

Однако, учитывая разницу концентрации белка в гомогенате мицелия и культуральной жидкости, активность экстрацеллюлярных протеиназ превосходит таковую мицелия гриба в ряде случаев на целый порядок. Можно полагать, что такая культуральная жидкость может быть использована, в известной степени, в качестве источника некоторых протеиназ.

В целях предварительной идентификации арсенала протеиназ был проведен ингибиторный анализ при использовании в качестве субстратов желатина и казеина при величине рН среды, в которой выявлена наиболее высокая желатинолитическая и казеинолитическая активность (таблицы 1 и 2).

Гомогенат мицелия. Ингибитор сериновых протеиназ – диизопронилфторфосфат – угнетал желатинолитическую активность мицелия при рН 5,0, 7,6, 8,0 и 8,4 на 45, 47, 38 и 52% соответственно, полностью подавляя ее при рН 10,6 (рисунок 2).

Действие *p*-хлормеркурибензоата – группоспецифического ингибитора цистеиновых протеиназ было существенным лишь при рН 7,6 и 10,6, где подавление желатинолиза составило 28 и 100% соответственно.

Таблица 1. – Расщепление белков субстратов гомогенатами мицелия культуры вешенки при различной величине рН ($n = 4$)

Растворитель	Величина зон лизиса (мм ²) при рН										
	2,8	5,0	5,2	5,6	5,8	7,6	8,0	8,2	8,4	9,2	10,6
Желатина											
Буферный раствор		167,5 ± 17,2		199,9 ± 14,9	158,9 ± 5,47	204,5 ± 6,8	164,9 ± 5,8		181,3 ± 13,7	223,3 ± 11,8	112,0 ± 5,6
+ этанол		150,0 ± 7,4		179,0 ± 5,8	223,7 ± 23,8	213,3 ± 15,1	257,1 ± 5,9		311,3 ± 13,3	222,3 ± 27,7	211,0 ± 33,4
Казеина											
Буферный раствор	175,8 ± 9,0		159,6 ± 5,9			156,3 ± 8,1		141,3 ± 4,2			
+ этанол	144,0 ± 8,3		100,4 ± 8,4			188,3 ± 13,2		188,3 ± 13,3			
Гемоглобина											
Буферный раствор				119,3 ± 13,8					134,5 ± 7,1	127,3 ± 3,4	

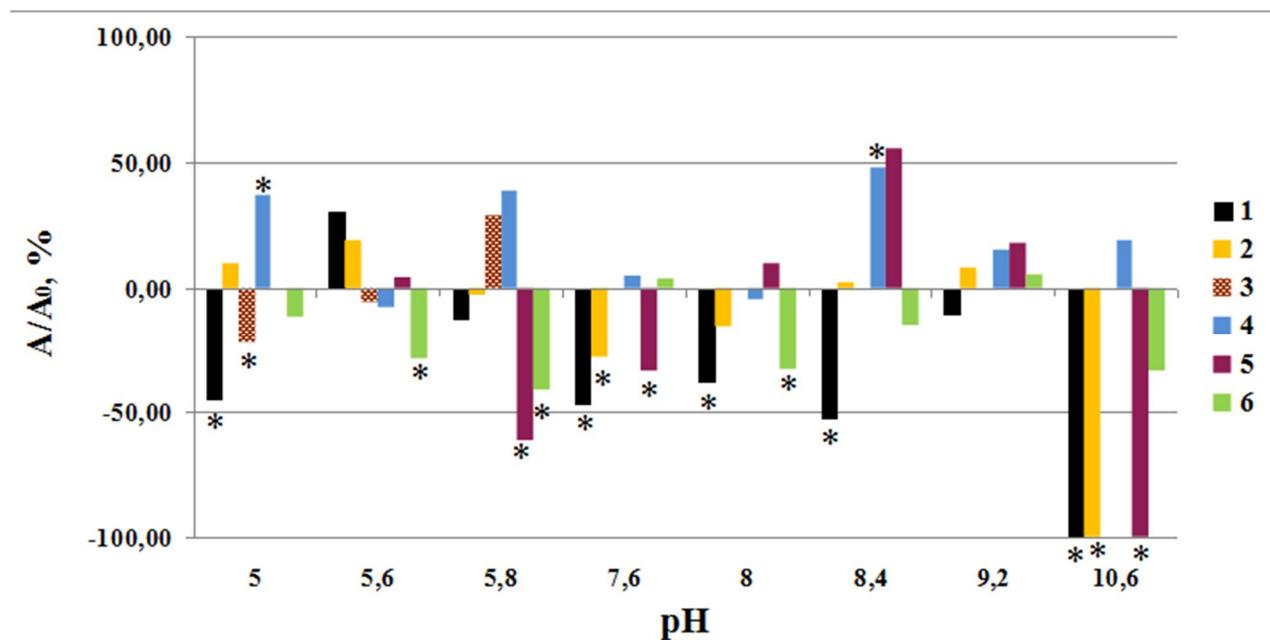


Рисунок 2. – Влияние группоспецифических ингибиторов: диизопропилфторфосфата (1), *p*-хлормеркурибензоата (2), пепстатина (3), ЭДТА (4), *o*-фенантролина (5), 8-гидроксихинолина (6) на желатинолитическую активность гомогенатов мицелия культуры вешенки обыкновенной при различной величине рН

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

Таблица 2. – Расщепление белков субстратов культуральной жидкостью культуры вешенки при различной величине рН ($n = 4$)

Растворитель	Величина зон лизиса (мм ²) при рН				
	5,8	7,6	8,2	8,4	9,4
Желатина					
Буферный раствор + этанол	142,1± 10,8	123,0± 5,8		126,2± 9,2	
	78,9± 9,2	86,9± 12,2		115,8± 14,6	
Казеина					
Буферный раствор + этанол			120,0± 2,4		
			89,7± 3,4		
Гемоглобина					
Буферный раствор					126,8± 12,2

Добавление к реакционной системе в диапазоне рН 5,0–5,8 группоспецифического ингибитора аспартильных протеиназ – пепстатина сопровождалось сдвигами желатинолитической активности только в пределах 22%.

Реагенты, связывающие катионы металлов, оказали разное действие в зависимости от их структуры и свойств и, как следствие, от свойств образующихся координационных комплексов. Так, ЭДТА, взаимодействующий преимущественно с двухвалентными катионами, умеренно угнетал желатинолиз при рН 5,0 и 8,4 – на 35 и 45% соответственно. о-фенантролин подавлял желатинолитическую активность при рН 5,8, 7,6 и 10,6 на 61, 33 и 100% соответственно. Ингибирующее действие 8-гидроксихинолина было отчетливо

при рН 5,6, 8,0 и 10,6 – эффект составил 38, 33 и 34%.

В отличие от этого выраженное ингибирующее действие диизопропилфторфосфата на казеинолитическую активность выявлено лишь при рН 7,6, оно достигало 100% (рисунок 3)

Точно такой же эффект при этом рН характерен и для действия *p*-хлормеркурибензоата, тогда как при рН 8,2 он не превысил 38%.

Пепстатин полностью подавлял казеинолиз при рН 2,8 и 5,2. ЭДТА также полностью угнетал расщепление этого белка при рН 5,2, но умеренно стимулировал этот процесс при рН 2,8 и 7,6 – на 30 и 42% соответственно.

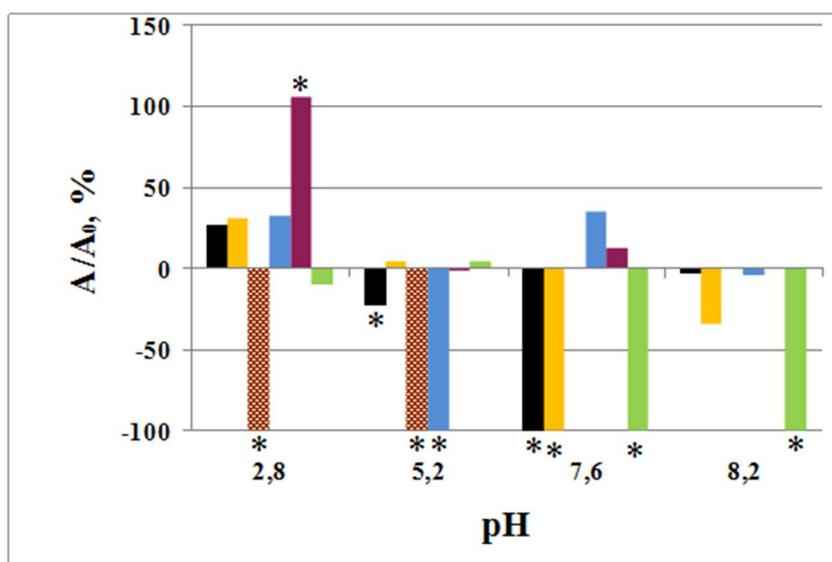


Рисунок 3. – Влияние группоспецифических ингибиторов на казеинолитическую активность гомогенатов мицелля культуры вешенки обыкновенной

Примечание – обозначения те же, что в рисунке 2

Последнее может быть вызвано связыванием катионов металлов, ингибирующих казеинопептические энзимы. Это согласуется с тем, что в кислой среде *o*-фенантролин активировал казеинолиз в 2 раза. Добавление 8-гидроксихинолина сопровождалось полным подавлением активности казеинопептических протеиназ при pH 8,2 (рисунок 3).

При анализе изложенных данных, в первую очередь, примечательно полное подавление желатинопептической активности диизопропилфторфосфатом, *p*-хлормеркурибензоатом и *o*-фенантролином при pH 10,6. По-видимому, желатинопептическая активность щелочных протеиназ реализуется сериновыми протеиназами, наделенными HS-группами и ионами металлов с переменной валентностью, значимыми для функционально активной конформации.

Желатинолиз в кислой среде (pH 5,0) лишь в малой степени обусловлен активностью «кислых» протеиназ типа аспартильных.

Судя по отсутствию полного ингибирования желатинопептической активности диизопропилфторфосфатом при pH 5,0–8,4 (угнетение составило 40–60%), она лишь отчасти сопряжена с действием сериновых протеиназ.

Примечательно, что желатинопептическая активность экстракта мицелия при pH 9,2 практически индифферентна ко всем использованным группоспецифическим ингибиторам. Это логически ставит вопрос о природе подобных желатиназ.

В этом плане следует отметить, что и ранее при изучении протеолитической активности коммерческих образцов белков-ингибиторов протеиназ были получены результаты, не укладывающиеся в принятые представления об известных группах этих энзимов. Так, было показано, что фибринолитическая активность ингибитора трипсина из соевых бобов (SBTI) полностью блокировалась *p*-хлормеркурибензоатом, ЭДТА, этанолом и частично (на 44%) – стрептокиназой. Сходные изменения наблюдались со стороны фибринолитической активности овомукоида (OM), но ингибирование было неполным, а эффект стрептокиназы отсутствовал. В отличие от SBTI и OM, протеолитическая

активность овоингибитора (OI) по фибриногену и протамин-сульфату резко возрастала в присутствии стрептокиназы, а также при добавках этанола. Этанол-индуцированная фибринолитическая активность оказалась нечувствительна к фенолметилсульфонилфториду, но полностью подавлялась *o*-фенантролином. Индуцированная же стрептокиназой активность угнеталась при добавках *p*-хлормеркурибензоата, ЭДТА, этанола. Однако протеолиз, инактивированный при добавках последнего, полностью восстанавливался в присутствии фенолметилсульфонилфторида. Более того, индуцируемая добавкой стрептокиназы протеолитическая активность OI не расщепляла хромогенный субстрат S-2251 (*H-D-Val-Leu-Lys-pNa*) специфичный для плазмина [19].

Что касается казеинопептической активности, то есть все основания считать казеинолиз в кислой среде (pH 2,8 и 5,2) связанным с деятельностью «кислых» аспартильных протеиназ, по-видимому, содержащих функционально значимые ионы металлов. Однако, судя по различиям в изменениях активности при добавлении ЭДТА и *o*-фенантролина, протеиназы с оптимумами pH 2,8 и 5,2 содержат разные металлы.

Казеинопептическая активность экстрактов мицелия при pH 7,6 обусловлена протеиназами, имеющими HS-группы и ионов металлов с переменной валентностью, значимыми для функционально активной конформации.

Культуральная жидкость. В отличие от гомогенатов мицелия, желатинопептическая активность культуральной жидкости при pH 5,8 полностью подавлялась диизопропилфторфосфатом, но не была чувствительна к этому ингибитору при pH 7,6

Ингибирующее действие эффектора в щелочной среде (pH 8,4) было близко к таковому в случае гомогената мицелия – 64%. Действие *p*-хлормеркурибензоата проявилось лишь при pH 5,8: в этом случае отмечено весьма умеренное (на 28%) угнетение желатинопептической активности. При этом значении pH желатинолиз слабо (на 20%) подавлялся в присутствии пепстатина (рисунок 4).

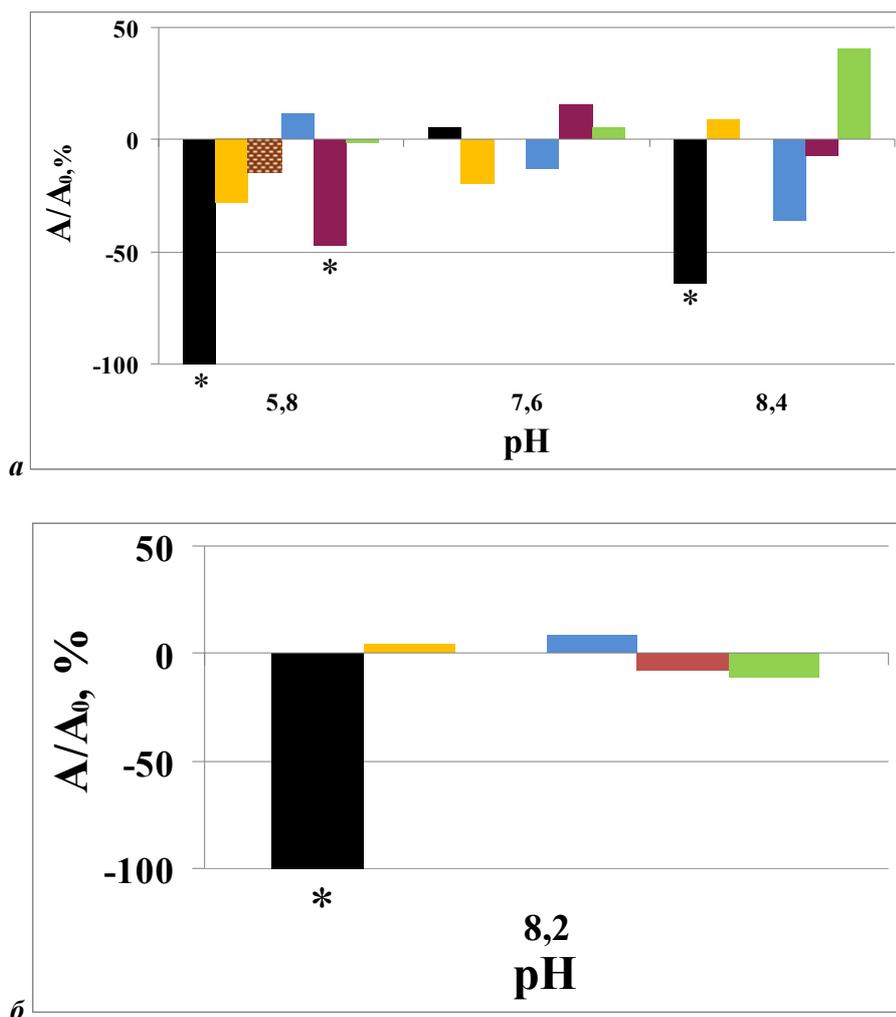


Рисунок 4. – Влияние группоспецифических ингибиторов на желатинолитическую (а) и казеинолитическую (б) активность культуральной жидкости культуры вешенки обыкновенной
 Примечание – обозначения те же, что в рисунке 2

Добавление в реакцию систему ЭДТА сопровождалось подавлением желатинолитической активности культуральной жидкости лишь при pH 8,4 – на 40%. Действие *o*-фенантролина отличалось от такового в случае гомогената мицелия: угнетение желатинолиза отмечено лишь при pH 5,8 и составило 47%. Этот эффектор не вызвал существенных изменений расщепления желатина культуральной жидкостью и при pH 7,6. Эффект 8-гидроксинолина на желатинолитическую активность протеиназ культуральной жидкости при pH 8,4 существенно отличался от такового для гомогената мицелия. Здесь наблюдался рост желатинолиза на 40%.

Судя по результатам ингибиторного анализа, желатинолитическая активность экстрацеллюлярных протеиназ мицелиальной культуры вешенки при pH 5,8 всецело определяется сериновыми протеиназами, хотя при

этом определенное значение имеют ионы металлов переменной валентности. В расщеплении же желатина в щелочной среде существенную роль играют также сериновые протеиназы. Однако в этом случае некоторую роль играют и другие протеолитические энзимы, нечувствительные к использованным группоспецифическим ингибиторам. Что же касается желатинолитической активности «нейтральных» протеиназ, то в данном случае мы наблюдали картину близкую таковой для внутриклеточных протеиназ с оптимумом активности при pH 9,2 (см. выше по тексту).

Казеинолитическая активность экстрацеллюлярных протеиназ при pH 8,2, в отличие от внутриклеточных энзимов, судя по результатам, полностью определяется сериновыми протеиназами.

Заклучение. Изложенные материалы свидетельствуют о наличии в мицелии культуры вешенки развитого и разнопланового набора протеолитических энзимов, включающих сериновые, аспартильные протеиназы, и при этом в ряде случаев наделенных существенными для нативной конформации сульфгидрильными группами и ионами металлов. Менее представительный набор экстрацеллюлярных энзимов, судя по полученным данным, можно отнести к сериновым протеиназам.

Вместе с тем, обнаруживается в отдельных случаях протеолитическая активность, которую нельзя отнести по результатам ингибиторного анализа к сериновым, цистеиновым, аспартильным или металлопротеиназам. Подобные факты встречались и в ранее проведенных исследованиях на других объектах [19]. В последнее десятилетие среди протеолитических энзимов выделены группы треониновых и глутаминовых протеиназ, а также пептидаз смешанного каталитического типа [20]. Учитывая разнообразие видов живых организмов, не исключено, что в дальнейшем будут выделены и новые протеолитические энзимы, не относящиеся к перечисленным группам протеиназ.

Следует также отметить, что мицелиальная культура вешенки обыкновенной может служить богатым источником протеиназ для разных целей. Кроме того, логически поднимается вопрос о физиологической роли этого разнообразного арсенала протеолитических энзимов. Выяснение этой роли составляет объемную многоплановую самостоятельную задачу в перспективе.

Список литературы

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. Wiebe, M.G. Use of a series of chemostat cultures to isolate 'improved' variants of the Quorn mycoprotein fungus, *Fusarium graminearum* A3/5 / M. G. Wiebe, G. D. Robson, S. G. Oliver, A. P. Trinci // *Microbiology.* – 1994. – 140 (Pt 11). – P. 3015–3021.
7. Wiebe, M. G. Mycoprotein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption / M. G. Wiebe // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2002. – № 58 (4). – P.421–427.
8. Бабицкая, В. Г. *Pleurotus ostreatus* – продуцент комплекса биологически активных веществ / В. Г. Бабицкая [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32. – № 2. – С. 203–210.
9. Deepalakshmi, K. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties / K. Deepalakshmi, S. Mirunalini // *Journal of Biochemical Technology.* – 2014. – Vol. 5. – No.2. – P. 718–726.
10. Dohmae, N. Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies / N. Dohmae, K. Hayashi, K. Miki, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto // *Biosci. Biotech. Biochem.* – 1995. – Vol. 59, No 11. – P. 2074–2080.
11. Palmieri, G. Purification, characterization and functional role of novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus* / G. Palmieri, C. Bianco, G. Cennamo, P. Giardina, G. Marino, M. Monti, G. Sannia // *Appl. Environ. Microb.* – 2001. – Vol. 67, No 6. – P. 2754–2759.
12. 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.
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. Сер. Природоведения. – 2017. – № 2. – С. 62–68.

14. Жук, О. Н. Особенности роста и развития культуры гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) в присутствии ионов марганца (II) / О. Н. Жук [и др.] // Вестник Полесского государственного университета. Сер. Природоведения. – 2017. – № 2. – С. 43–50.
15. Кульгавеня, А. Д. О рН-зависимости протеиназ гриба вешенка обыкновенная (*pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании / А. Д. Кульгавеня // Материалы XIII международной молодежной науч.-практ. конференции «Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси». – Пинск. – 2019. – Ч. 3. – С. 60–62.
16. Чугай, А. С. Апробация питательных сред на основе корнеплодов для глубинного культивирования вешенки обыкновенной / А. С. Чугай, Е. С. Гришан, Н. С. Коломацкая // Материалы X международной молодежной науч.-практ. конференции «Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси». – Пинск. – 2016. – Ч. I. – С. 520–522.
17. 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.
18. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
19. 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.
20. Rawlings, N. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database / N. D. Rawlings [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2018. – Vol. 46. – P. 624–632.
1. Kudinov P.I., Shchekoldina T.V., Sliz'kaya A.S. Sovremennoye sostoyaniye i struktura mirovykh resursov rastitel'nogo belka [Current status and structure of vegetable protein world resources] *Izvestiya vuzov. Pishchevaya tekhnologiya* [University News. Food technology], 2012, no. 5–6, pp. 7–10. (In Russian)
2. Rozhdestvenskaya L.N., Bychkova Ye.S., Bychkov A.L. Analiz vyzovov i sovremennykh tendentsiy razvitiya tekhnologiy na rynke belkov [Analysis of challenges and current trends in development technology in the protein market] *Pishchevaya promyshlennost'* [Food Industry], 2018, no. 5, pp. 42–47. (In Russian)
3. Ritala A., Häkkinen S.T., Toivari M., Wiebe M.G. Single cell protein – state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016: *Frontiers in Microbiol*, 2017, Vol. B. art. 2009, pp. 1–18.
4. Stakheyev I.V., Kolomiyets E.I., Zdor N.A. *Biotehnologiya malotonnazhnogo proizvodstva mikrobnogo proteina* [Biotechnology of small tonnage production of microbial protein]: Minsk: «Navuka i tekhnika» [Science and Technology], 1991, 264 p. (In Russian)
5. Järvinen R., Savonen R., Ahlström A. Physiological effect of Pekilo single cell protein in pigs: *Agricultural and Food Science*, 1980, Vol. 52, pp. 14–23.
6. Wiebe MG., Robson GD., Oliver SG., Trinci AP. Use of a series of chemostat cultures to isolate 'improved' variants of the Quorn mycoprotein fungus, *Fusarium graminearum* A3/5: *Microbiology*, 1994, 140 (Pt 11), pp. 3015–3021.
7. Wiebe MG. Mycoprotein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption : *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, no. 58 (4), pp. 421–427.
8. Babitskaya V.G., Shchebra V.V., Oleshko V.S., Osadchaya O.V. *Pleurotus ostreatus* – produtsent kompleksa biologicheskii aktivnykh veshchestv [Pleurotus ostreatus - producer of a complex of biologically active substances]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. [Applied Biochemistry and Microbiology], 1996, – T. 32, no. 2, pp. 203–210. (In Russian)
9. Deepalakshmi K., Mirunalini S. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties: *Journal of Biochemical Technology*, 2014, Vol. 5, no.2, pp. 718–726.
10. Dohmae N., Hayashi K., Miki K., Tsumuraya Y., Hashimoto Y. Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies: *Biosci. Biotech. Biochem*, 1995, Vol. 59, no 11, pp. 2074–2080.
11. Palmieri G., Bianco C., Cennamo G., Giardina P., Marino G., Monti M., Sannia G. Purification, characterization and functional

- role of novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*: Appl. Environ. Microb., 2001, Vol. 67, no 6., pp. 2754–2759.
12. Shaba A.M., Baba J. Screening of *Pleurotus ostreatus* and *Gleophyllum sepiarium* strains for extracellular protease enzyme production: Biopas, 2012, Vol. 5, no 1, pp. 187–190.
 13. Zhuk O.N., Il'yuchik I.A., Kul'gavenya A.D., Nikandrov V.N. Vliyaniye khlorida margantsa (II) na proteoliticheskuyu aktivnost' griba veshenka obyknovennaya (*Pleurotus ostreatus*) pri glubinnom kul'tivirovanii [Effect of Manganese (II) Chloride on the Proteolytic Activity of *Pleurotus Ostreatus* Mushroom at Periodic Culture]. *Vestnik Poleskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya prirodovedcheskih nauk* [Bulletin of Polesky State University. Series in Natural Sciences], 2017, no. 2, pp. 62–68. (In Russian)
 14. Zhuk O.N., Bokova O.V., Sakovich V.V., Nikandrov V.N. Osobennosti rosta i razvitiya kul'tury griba veshenka obyknovennaya (*Pleurotus ostreatus*) v prisutstvii ionov margantsa (II) [Distinguishing Feature of Growth and Development of *Pleurotus Ostreatus* Mushroom in the Presence of Margants Ions (II)]. *Vestnik Poleskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya prirodovedcheskih nauk* [Bulletin of Polesky State University. Series in Natural Sciences], 2017, no. 2, pp. 43–50. (In Russian)
 15. Kul'gavenya A.D. O rn-zavisimosti proteinaz griba veshenka obyknovennaya (*pleurotus ostreatus*) pri glubinnom kul'tivirovanii [About pH dependence of the proteases of the oyster mushroom fungus (*pleurotus ostreatus*) during deep cultivation]. *Materialy XIII mezhdunarodnoy molodezhnoy nauch.-prakt. konferentsii «Nauchnyy potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi»*, Pinsk, 2019, CH. 3, pp. 60–62. (In Russian)
 16. Chugay A.S., Grishan Ye.S., Kolomatskaya N.S. Aprobatsiya pitatel'nykh sred na osnove korneplodov dlya glubinnogo kul'tivirovaniya veshenki obyknovennoy / [Testing of nutrient media based on root crops for deep cultivation of oyster mushroom]. *Materialy X mezhdunarodnoy molodezhnoy nauch.-prakt. konferentsii «Nauchnyy potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi»*, Pinsk, 2016. – CH. I. – pp. 520–522. (In Russian)
 17. Nikandrov V.N., Pyizhova N.S. Metody issledovaniya proteoliza. Glava 5. [Methods for the study of proteolysis. Chapter 5]. *Sovremennyye problemy biohimii. Metody issledovaniy* [Modern problems of biochemistry. Research methods]. Minsk: Visheyschaya shkola, 2013, pp. 132–157. (In Russian)
 18. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: Anal. Biochem, 1976, Vol. 72, pp. 248–254.
 19. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Regulyatornyye belki: funktsional'nyye svoystva molekul i mekhanizmy ikh biologicheskogo deystviya [Regulatory proteins: functional properties of molecules and mechanisms of their biological action]: *Izvestiya NAN Belarusi. Seriya med.-biol nauk* [Proceedings of the NAS of Belarus. Biomedical Sciences Series], 2003, no. 3, pp. 75–89.
 20. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A., Finn R.D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database: Nucleic Acids Research, 2018, Vol. 46, pp. 624–632.

Received 1 April 2020