

О.Н. ЖУК, канд. биол. наук,
доцент кафедры биотехнологии,
заведующий научно–исследовательской лабораторией
прикладной и фундаментальной биотехнологии¹

И.А. ИЛЮЧИК
старший преподаватель¹

А.Д. КУЛЬГАВЕНЯ
студент¹

В.Н. НИКАНДРОВ, доктор биол. наук, профессор,
профессор кафедры биотехнологии¹
¹Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 12 октября 2017г.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА МАРГАНЦА (II) НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГРИБА ВЕШЕНКА ОБЫКНОВЕННАЯ (*PLEUROTUS OSTREATUS*) ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Аннотация. В условиях периодической культуры на жидкой питательной среде добавление в последнюю хлорида марганца (II) в концентрациях 0,025–10,0 мг/л ведет к изменениям расщепления четырех белков–субстратов (гемоглобина, казеина, желатина, фибриногена) «нейтральными» протеиназами мицелия и культуральной жидкости *P. ostreatus*. Характер воздействия фактора на расщепление отдельных белков позволяет думать об образовании грибом нескольких «нейтральных» протеиназ. Сопоставление характера сдвигов протеолитической активности с уровнем общего белка в мицелии и в культуральной жидкости дает основания допускать, что уменьшение активности протеиназ сопряжено с уменьшением их продукции. Однако прояснение этого момента требует проведения дополнительных исследований.

Введение. Препараты протеолитических энзимов используются в различных отраслях промышленности и хозяйственной деятельности уже более столетия. На протяжении последних 50–60 лет ведутся интенсивные поиски разнообразных по физико–химическим свойствам и субстратной специфичности протеиназ растительного и микробного происхождения с целью замещения энзимов тканей и органов животных.

Среди источников протеолитических энзимов достаточно видное место занимают различные группы грибов, включая базидиальные, поскольку многие грибы, как правило, синтезируют целый набор весьма активных протеиназ. Особенно важно использование в качестве источника протеиназ съедобных видов грибов, поскольку это сразу же снимает вопрос о совместимости белков–энзимов для организма человека и животных. Одним из хорошо известных и достаточно давно используемых в пищевых целях является вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*). Освоение глубинного культивирования этого гриба открыло перспективы получения ряда его метаболитов, включая белки и энзимы, в достаточно больших масштабах.

О протеолитических энзимах вешенки в литературе имеется весьма ограниченное количество публикаций. 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 [1]. Из культуральной жидкости при культивировании вешенки в жидкой питательной среде выделена экстрацеллюлярная сериновая протеиназа с оптимумом pH в щелочной зоне [2].

Что же касается условий биосинтеза протеиназ мицелием *Pleurotus ostreatus*, то известно, что при культивировании на среде Чапека температурный оптимум продукции протеолитической активности составляет 70 °С, а ее pH оптимум – 7,0 [3].

Вместе с тем, фактически отсутствуют какие–либо материалы о влиянии различных факторов на протеолитическую активность гриба в условиях глубинного культивирования.

Цель настоящей работы – раскрыть особенности влияния одного из истинных биоэлементов – ионов Mn^{2+} на протеолитическую активность глубинной культуры гриба вешенка обыкновенная.

Материалы и методы. В работе использовали бактоагар (Melford, USA), (казеин по Гаммерстену (Россия), гемоглобин быка (Sigma, USA), фибриноген человека (Sigma, USA), желатин (Fluka, Germany). Остальные реактивы были квалификации «хч» производства стран СНГ.

Исследования выполнены на «диком» штамме *Pleurotus ostreatus*, выделенном сотрудником кафедры биотехнологии доцентом Е.О. Юрченко в 2014 г. из плодовых тел, растущих на культурном тополе (*Populus sp.*) в г. Минске. В качестве питательной среды использовали отвар картофеля с добавлением сахарозы [4]. В среду дополнительно вносили раствор хлорида марганца до конечной концентрации 0,025, 0,1, 0,5, 2,5 и 10 мг/л.

Глубинное культивирование вешенки обыкновенной проводили в стеклянных колбах емкостью 500 мл при температуре 27 °С в течение 14 сут на качалке модели WiseShakeSHO – 2D, режим перемешивания – 70 об/мин.

По окончании инкубации отбирали по 1 мл культуральной жидкости, 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. Супернатант использовали для дальнейших исследований.

Протеолитическую активность определяли по расщеплению белков–субстратов в тонком слое агарового геля как подробно описано ранее [5]. В качестве растворителя при приготовлении белок–агаровых пластин использовали 0,15 М раствор NaCl pH 7,4. Количество белка определяли колориметрическим методом [6].

Результаты статистически обработаны с вычислением критерия достоверности Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. В условиях стационарной глубинной культуры *P. ostreatus* через 14 сут уровень биомассы гриба составил $3,98 \pm 0,04$ г сухой массы.

Добавление хлорида марганца в питательную среду вызвало уменьшение концентрации общего белка в мицелии гриба. Особенно заметно это проявилось при концентрации эффектора 0,025 и 0,100 мг/л, когда уменьшение составило 41 и 56% соответственно (таблица 1, рис. 1).

Менее значительное снижение концентрации общего белка в мицелии (на 36%) выявлено при концентрации хлорида марганца 2,500 мг/л.

Концентрационная зависимость уровня общего белка в культуральной жидкости при добавлении хлорида марганца имела более сложный характер.

Так, добавление хлорида марганца в питательную среду в минимальной концентрации обусловило снижение содержания общего белка на 26% в сравнении с контролем. В концентрации 0,100 мг/л хлорид марганца вызвал рост этого показателя в культуральной жидкости на 40%, тогда как добавление соли в концентрациях 2,500 и 10,000 мг/л сопровождалось падением уровня общего белка в культуральной жидкости на 64 и 37% соответственно (таблица 1, рис. 1).

Таблица 1– Влияние ионов марганца на уровень белка в мицелии и культуральной жидкостью *P. ostreatus* (n = 9)

Концентрация ионов марганца, мг/л	Концентрация белка в	
	мицелии, мкг/г	культуральной жидкости, мкг/мл
Контроль (без добавок)	105,7 ± 15,9	18,5 ± 0,5
0,025	62,4 ± 4,1*	13,6 ± 0,1*
0,100	46,9 ± 3,9*	25,9 ± 0,4*
0,500	92,7 ± 9,7	17,4 ± 0,2
2,500	67,6 ± 3,6*	6,7 ± 2,1*
10,000	92,9 ± 8,1	11,6 ± 0,2*

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

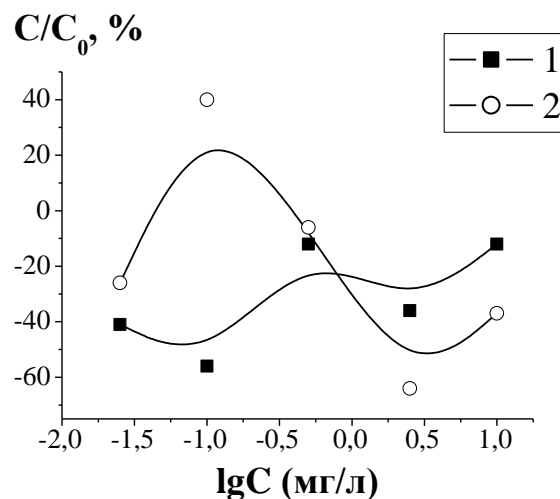


Рисунок 1 – Изменения уровня общего белка (% к контролю, принятому за 100%) в мицелии (1) и культуральной жидкости (2) вешенки обыкновенной через 14 суток культивирования при добавлении в питательную среду хлорида марганца

По интенсивности расщепления супернатантами гомогенатов мицелия вешенки при pH 7,4 в 0,15 М растворе NaCl используемые белки–субстраты можно расположить следующим образом: желатин > казеин > фибриноген > гемоглобин.

При этом интенсивность расщепления гемоглобина уступала таковой фибриногена в 3,2 раза, а желатина – в 4,9 раза (таблица 2).

Таблица 2– Влияние хлорида марганца (II) на расщепление белков–субстратов супернатантом гомогенатов мицелия *P. ostreatus* (n = 12)

Концентрация Mn ²⁺ , мг/л	Площадь зон лизиса, мм ²			
	гемоглобина	казеина	желатина	фибриногена
Контроль (без добавок)	43,9 ± 2,6	178,3 ± 13,2	216,3 ± 7,3	139,1 ± 8,4
0,025	37,2 ± 6,2*	148,0 ± 7,1*	215,0 ± 9,9	128,2 ± 12,7
0,100	46,9 ± 3,0	150,9 ± 11,7*	230,1 ± 7,8	108,8 ± 11,9*
0,500	51,8 ± 2,4*	142,5 ± 9,2*	225,4 ± 7,8	97,1 ± 7,8*
2,500	30,8 ± 5,3*	122,9 ± 12,6*	181,1 ± 8,0*	112,2 ± 8,1*
10,000	45,8 ± 3,0	128,4 ± 14,5*	171,7 ± 10,7*	124,4 ± 10,3

Примечание – * – изменения статистически достоверны при P ≤ 0,05

Добавление в питательную среду хлорида марганца по–разному отразилось на расщеплении белков–субстратов протеиназами супернатантов гомогенатов мицелия гриба. В целом, лишь при максимальных концентрациях эффектора расщепление желатина подавлялось на 16 и 21%. Гидролиз казеина изменялся более заметно: во всем диапазоне концентраций отмечено угнетение расщепления этого белка на ≥ 15%. Максимальный эффект выявлен при концентрациях соли марганца 0,500, 2,500 и 10,000 мг/л:

Снижение казеинолитической активности составило 20, 31 и 28% соответственно (таблица 2, рис. 2).

Подавление фибринолитической активности протеиназ супернатантов гомогенатов мицелия гриба было наиболее демонстративным при концентрациях хлорида марганца 0,100, 0,500 и 2,500 мг/л и достигало 22, 30 и 19% соответственно, тогда как при максимальной концентрации не превышало 11% (таблица 2, рис. 2).

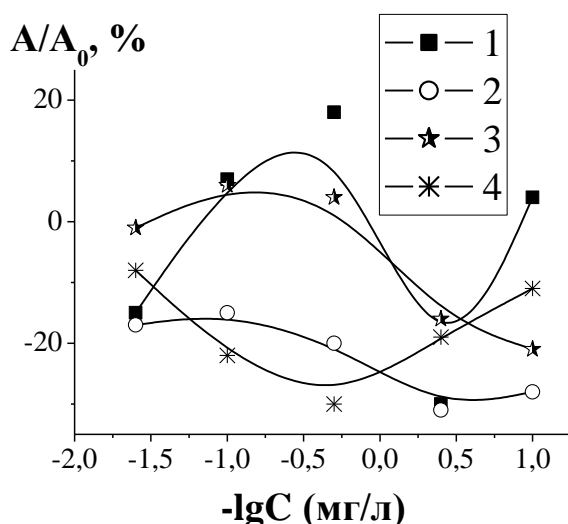


Рисунок 2 – Влияние добавления в питательную среду хлорида марганца на расщепление (% к контролю, принятому за 100%) гемоглобина (1), казеина (2), желатина (3), фибриногена (4) протеиназами супернатантов гомогенатов мицелия вешенки обыкновенной через 14 сут культивирования

В отличие от внутриклеточных протеиназ, расщепление белков–субстратов протеиназами культуральной жидкости вешенки при pH 7,4 в 0,15 М растворе NaCl по интенсивности можно расположить следующим образом:

казеин > желатин ≈ фибриноген > гемоглобин.

В этом случае различия в интенсивности расщепления гемоглобина и наиболее легко гидролизующего казеина не превышали 1,8 раза, а между остальными тремя белками были минимальны (таблица 3).

Добавление хлорида марганца практически не отразилось на уровне казеинолитической активности культуральной жидкости – изменения не превышали 8%.

Таблица 3 – Влияние ионов марганца на расщепление белков–субстратов культуральной жидкостью *P. ostreatus* (n = 12)

Концентрация Mn ²⁺ , мг/л	Площадь зон лизиса, мм ²			
	гемоглобина	казеина	желатина	фибриногена
Контроль (без добавок)	56,7 ± 2,8	100,2 ± 9,5	90,2 ± 4,0	87,4 ± 4,1
0,025	46,6 ± 2,3*	95,8 ± 7,1	91,3 ± 5,2	95,8 ± 5,3
0,100	44,8 ± 2,1*	99,2 ± 6,0	92,7 ± 4,4	104,4 ± 7,1*
0,500	48,7 ± 2,3*	92,3 ± 6,8	91,3 ± 5,9	100,6 ± 2,7*
2,500	57,6 ± 2,3	97,1 ± 9,1	99,5 ± 4,1	91,4 ± 4,9
10,000	57,8 ± 2,9	94,7 ± 9,5	109,8 ± 5,0*	100,6 ± 4,0*

Примечание: * – изменения статистически достоверны при P ≤ 0,05

Угнетение фибринолитической активности было несколько более заметным и при добавлении эффиктора в концентрациях 0,100, 0,500 и 10.000 мг/л составило 19, 15 и 15% соответственно (таблица 3, рис. 3). Сколь–нибудь существенное подавление гемоглоблинолитической активности культуральной жидкости – 14–21% было выявлено при добавлении соли марганца в диапазоне концентраций 0,025–0,500 мг/мл.

В этом плане изменения желатинолитической активности носили иной характер: при добавлении хлорида марганца в питательную среду в максимальной концентрации расщепление желатина усиливалось в 1,22 раза.

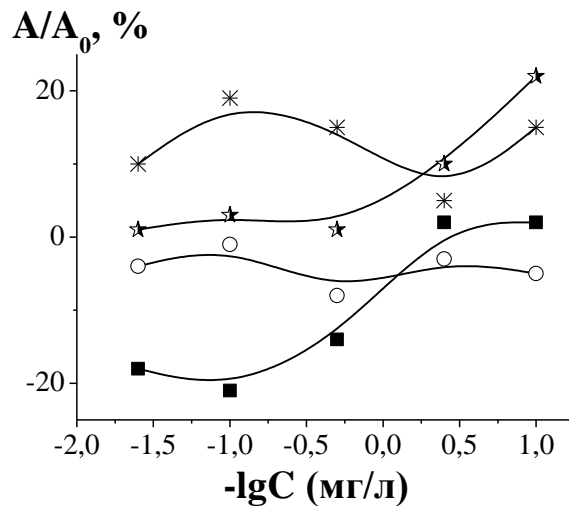


Рисунок 3 – Влияние добавления в питательную среду хлорида марганца на расщепление белков–субстратов) протеиназами культуральной жидкости вешенки обыкновенной через 14 сут культивирования.

Обозначения те же, что в рис. 2

Выявленные изменения протеолитической активности в мицелии и культуральной жидкости вешенки при культивировании на питательной среде с добавлением хлорида марганца не являются резко выраженными и не превышают 31%. Это, однако, еще не свидетельствует о том, что таковые изменения не значимы для метаболизма и жизнедеятельности гриба. Как и ранее, при исследовании эффекта хлорида марганца на расщепление белков–субстратов трипсином, α -химотрипсином и папаином [7] эффект соли марганца проявлялся на разных белках–субстратах неодинаково. Примечательно, что наиболее интенсивно расщепляемым субстратом для водорастворимых «нейтральных» протеиназ мицелия был желатин, а для энзимов культуральной жидкости – казеин. Следует отметить, что в литературе данные о влиянии Mn^{2+} на процессы протеолиза весьма немногочисленны.

Так, при культивировании водоросли *Scenedesmus ecornis* с добавлением в питательную среду хлорида марганца в высокой концентрации отмечено подавление казеинолитической активности внутриклеточных «нейтральных» протеиназ на 32–61%. Добавление же этой соли в широком диапазоне концентраций *in vitro* к супернатантам гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* сопровождалось снижением фибринолитической активности на 27–35%, тогда как изменения казеинолитической активности не превышали 12% [8,9].

Полученные нами результаты свидетельствуют о влиянии добавления соли марганца (II) в питательную среду на уровень активности «нейтральных» протеиназ культуры вешенки. Однако остается открытым вопрос о том являются ли выявленные сдвиги активности следствием изменения уровня биосинтеза протеиназ или же прямого воздействия на активность их молекул. Косвенно на основании изменений уровня общего белка можно полагать, что имеет место снижение уровня протеиназ в культуре. Но окончательное прояснение этого момента требует проведения дополнительных исследований.

Заключение. Итак, в условиях периодической культуры на жидкой питательной среде добавление в последнюю хлорида марганца (II) ведет к изменениям расщепления четырех белков–субстратов «нейтральными» протеиназами мицелия и культуральной жидкости *P. ostreatus*. Характер воздействия эффектора на расщепление отдельных белков позволяет думать об образовании грибом нескольких «нейтральных» протеиназ, что, в целом, согласуется с данными литературы. Тем не менее, окончательно вывод можно сделать только по результатам ингибиторного анализа. Далее, сопоставление характера сдвигов протеолитической активности с уровнем общего белка в мицелии и в культуральной жидкости дает основания допускать, что уменьшение активности протеиназ сопряжено, вполне возможно, с уменьшением их продукции. Однако прояснение этого момента требует проведения дополнительных исследований.

Авторы выражают благодарность Е.О. Юрченко, О.А. Боковой, В.В. Сакович за помощь в проведении настоящих исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант № Б16–039)

Список литературы

1. Dohmae, N. Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies / N. Dohmae, K. Hayashi, K. Miki, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 1995. – Vol. 59. – No. 11. – P. 2074–2080.
2. 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 // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67. – No. 6. – P. 2754–2759.
3. Shaba, A.M. Screening of *Pleurotus ostreatus* and *Gleophyllum sepiarium* strains for extracellular protease enzyme production / A.M. Shaba, J. Baba // *Biopap*. – 2012. – Vol. 5 – No. 1. – P. 187–190.
4. Чугай, А.С. Аprobация 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.
5. Никандров, В.Н. Методы исследования протеолиза / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Современные проблемы биохимии. Методы исследований*. – Минск: Выш. шк. – 2013. – С. 132–157.
6. 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 // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
7. Никандров, В.Н. Особенности влияния ионов Ni(II) и Mn(II) на расщепление белков–субстратов протеиназами / В.Н. Никандров, В.Н. Ильюкевич, Е.И. Петрова // *Актуальные проблемы экологии: материалы X междунар. научно–практ. конф., Гродно, 1–3 октября 2014 г.: в 2 ч./ ГрГУ им. Я. Купалы; редкол. В.Н. Бурдь [и др.]*. – Гродно, 2014. – Ч. 1. – С. 181–183.
8. Ильючик, И.А. Влияние ионов марганца (II) на рост и казеинолитическую активность микроводоросли *Scenedesmus esognis* / И.А. Ильючик, О.Н. Жук, В.Н. Никандров // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: междунар. научн. конф. Двенадцатый съезд Белорус. обществ. объединен. фотобиологов и биофизиков: сб. статей*. – Минск, 28–30 июня 2016 г.; редкол. И.Д. Волотовский [и др.] – Минск, Изд. центр БГУ, 2016. – Ч. 2. – С. 161–164.
9. Ильючик, И.А. Влияние ионов марганца *in vitro* на протеолитическую активность в супернатантах гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // *Менделеевские чтения 2017: сб. матер. респ. научно–практ. конф. по химии и химическому образованию, Брест, 24 февраля 2017 г./ БрГУ им. А.С.Пушкина; редкол. Н.С. Ступень [и др.]*. – Брест, 2017. – С. 61–66.

ZHUK O.N.

IL'YUCHIK I.A.

KULGAVENYA A.D.

NIKANDROV V.N.

EFFECT OF MANGANESE (II) CHLORIDE ON THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *PLEUROTUS OSTREATUS* MUSHROOM AT PERIODIC CULTURE

*Summary. In the conditions of periodic culture in the fluid medium the manganese (II) chloride (0.025–10.0 mg/l) additions in it leads to changes of four protein substrates (hemoglobin, casein, gelatin and fibrinogen) cleavage by "neutral" proteinases of *P. ostreatus* mycelium and cultural fluid. The nature of the effector action on the separate protein cleavage allows to think on several "neutral" proteinases production by a mushroom, and it will be coordinated with data of literature, in general. Nevertheless, finally the conclusion can be drawn only by results of the inhibitory analysis. Further, comparison of nature of shifts of proteolytic activity to the level of the protein in mycelium and in cultural fluid gives the grounds to assume that decrease of activity of proteinases is interfaced, quite perhaps, with decrease of their production. However the clearing of this moment demands carrying out further researches.*

References

1. Dohmae N., Hayashi K., Miki K., Tsumuraya Y., Hashimoto Y. Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, Vol. 59, no. 11, pp. 2074–2080.
2. Palmieri G., Bianco C., Cennamo G., Giardina P., Marino G., Monti M., Sanna G. Purification, characterization and functional role of novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, Vol. 67, no. 6, pp. 2754–2759.
3. 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.
4. Chugai A.S., Grishan E.S., Kolomatskaia N.S. *Aprobatsiia pitatel'nykh sred na osnove korneplodov dlia glubinnogo kul'tivirovaniia veshenki obyknovennoi*. [Nutrient media approbation based on the roots for submerged cultivation of the oyster mushroom]. *Materialy X mezhdunarodnoi molodezhnoi nauch.–prakt. konferentsii «Nauchnyi potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi»*. Pinsk, Poleskii gosudarstvennyi universitet Publ., 2016. Chast' I, pp. 520–522. (In Russian)
5. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. *Metody issledovaniia proteoliza* [Methods of proteolysis research]. *Sovremennye problemy biokhimii. Metody issledovaniia*. Minsk, Vyshefshaia shkola Publ., 2013 pp. 132–157. (In Russian)
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, Vol. 72, pp. 248–254.
7. Nikandrov V.N., Il'iukevich V.N., Petrova E.I. *Osobennosti vliianiia ionov Ni(II) i Mn(II) na rasshchepenie belkov–substratov proteinazami* [Features of the influence of Ni (II) and Mn (II) ions on the cleavage of protein–substrates by proteinases]. *Aktual'nye problemy ekologii* [Actual problems of ecology]. *Materialy X mezhdunarodnoi nauchno–prakticheskoi konferentsii, chast' 1, Grodno, 1–3 oktiabria 2014 g.* Grodno, Grodnenski gosudarstvennyi universitet Publ., 2014. pp. 181–183. (In Russian)
8. Il'iuchik I.A., Zhuk O.N., Nikandrov V.N. *Vliianie ionov margantsa (II) na rost i kazeinoliticheskuiu aktivnost' mikrovdorosli Scenedesmus ecornis* [Influence of manganese (II) ions on the growth and caseinolytic activity of microalgae *Scenedesmus ecornis*]. *Molekuliarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniia biosistem. Mezhdunarodnaia nauchnaia konferentsiia. Dvenadtsatyi s"ezd Belorusskogo obshchestvennogo ob"edineniia fotobiologov i biofizikov: sbornik statei. Chast'. 2, Minsk, 28–30 iyunia 2016 g.* – Minsk, Belorusskii gosudarstvennyi universitet Publ., 2016, pp. 161–164. (In Russian)
9. Il'iuchik I.A., Nikandrov V.N. *Vliianie ionov margantsa in vitro na proteoliticheskuiu aktivnost' v supernatantakh gomogenatov kletok Chlorella vulgaris* [The Effect of manganese ions in vitro on proteolytic activity in supernatants of *Chlorella vulgaris* cell homogenates]. *Mendeleevskie chteniia 2017. Sbornik materialov respublikanskoi nauchno–prakticheskoi konferentsii po khimii i khimicheskomu obrazovaniiu, Brest, 24 fevralia 2017 g.* Brest, Brestskii gosudarstvennyi universitet Publ., 2017, pp. 61–66. (In Russian)

Received 12 october 2017