

Биология

УДК 582.284:577.156:573.6

М.А. ДАВТЯН, Э.А. МАНТАШЯН, Л.А. АНАНЯН

БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПРОТЕАЗ БАЗИДИОМИЦЕТАМИ В УСЛОВИЯХ
ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Показана возможность биосинтеза экзогенных протеаз грибами *Flammulina velutipes* и *Panus tigrinus* путем подбора соответствующих питательных сред, являющихся отходами пищевой и сельскохозяйственной промышленности. Испытанные питательные среды и добавленные надлежащие количества минеральных компонентов обеспечивают оптимальный биосинтез протеаз. Как протеазы, так и внутриклеточные свободные аминокислоты, не вовлекающиеся в биосинтез протеаз, выделяются в культуральную жидкость.

Мицелий высших съедобных базидиомицетов обладает исключительно высокой способностью изменять свой обмен, в том числе и синтез внеклеточных белков в зависимости от состава питательных сред и других условий глубинного культивирования.

Ведущую роль в синтезе внеклеточных ферментов играет присутствие в питательной среде специфического субстрата-индуктора, позволяющего повысить биосинтез последних в десятки раз. Экспериментально доказано, что образование индуцированных ферментов не связано с селекцией, прекращается при удалении из среды специфического индуктора и представляет собой синтез белка *de novo* [1]. Так, при добавлении к среде Чапека, на которой кислая протеаза не образуется, казеина (0,2%) синтез фермента повышался в 2,5 раза; при замене NaNO_3 в той же питательной среде на казеин активность фермента возрастала в 5 раз; при добавлении комплекса казеин+пептон – в 7 раз [2, 3]. Положительное влияние органических источников азота на образование протеиназ у *Asp. terricola* [4] проявлялось только в отсутствие минеральных соединений азота, на основании чего авторы заключают, что в качестве оптимальных источников азота целесообразно использовать белки, в первую очередь – казеин.

Отмечается также значительное усиление биосинтеза протеаз при использовании соевой муки, крахмала, пшеничных отрубей, свекловичного жома, водных экстрактов из солодовых ростков и др. [1]. Важнейшими азотистыми соединениями, влияющими на биосинтез протеаз, являются аминокислоты, в особенности, глутамин, глутаминовая кислота и ГАМК. Активная жизнедеятельность аспергиллов полностью совпадает не только с мак-

симальным содержанием внутриклеточных аминокислот, но и с процессом интенсивного биосинтеза кислой протеиназы [2].

При изучении закономерностей образования внеклеточной протеиназы было показано, что синтез фермента регулируется по типу "индукции конечным продуктом". Сильнее других аминокислот индуцирует синтез протеиназы глутаминовая кислота [3, 5, 6]. Сведения о влиянии углеводов на образование протеаз микроорганизмами довольно противоречивы. Так, по данным японских авторов, глюкоза не оказывает ингибирующего действия на биосинтез протеолитических ферментов [7]. Более того, она является наилучшим источником углерода для синтеза кислой протеиназы *Asp. niger*, в то время как ингибирование биосинтеза индуцированных ферментов микроорганизмов глюкозой по принципу "глюкозного эффекта" является доказанным фактом в 90 случаях из 100 [8].

Базидиомицеты синтезируют все 4 известных типа протеаз, из которых наиболее изученными являются аспартильные (кислые), обладающие высокой молокосвертывающей активностью, способностью предотвращать помутнение пива при охлаждении, видоизменять свойства клейковины муки с целью получения мягкого, пластичного бисквитного теста [9, 10]. Выделена и описана сериновая протеиназа из рода *Coprinus* [11]. Штаммы *Fl. velutipes*, некоторые виды *Coprinus*, *Tricholoma*, *Pleurotus* активно продуцируют экзопротеазы с фибрино- и тромболитическим эффектом, причем большинство этих ферментов отличается высокой специфичностью по отношению к фибрину. Сами культуры высших базидиомицетов обладают рядом преимуществ по сравнению с продуцентом других систематических групп, а именно, они не патогенны и не образуют спор на стадии вегетативного мицелия. При глубинном культивировании это обстоятельство гарантирует экологическую чистоту, а культуральный мицелий может быть использован в качестве пищевого и кормового продукта [6, 12].

Материал и методика. В качестве объектов исследования использовали чистые культуры высших съедобных базидиомицетов *Flammulina velutipes* и *Panus tigrinus*. Для указанных культур характерны быстрый рост в условиях глубинного выращивания, значительное накопление биомассы и белка, а также присущий грибам аромат. На синтетических питательных средах они легко усваивают аммонийные соли, органические источники азота. Культуральный мицелий, выращенный, в частности, на мелассе, молочной сыворотке, картофельной мезге, кукурузном экстракте, безвреден, нетоксичен, обладает сбалансированным аминокислотным составом и содержит до 37–40% сырого протеина.

Использованные питательные среды, получение инокулума, условия культивирования описаны нами в предыдущем сообщении [13]. Протеолитическая активность (ПА) определялась в культуральной жидкости (КЖ) и сыром мицелиальном экстракте по скорости гидролиза гемоглобина и казеина путем измерения экстинкции растворов, содержащих неосаждаемые трихлоруксусной кислотой продукты протеолиза [14]. В качестве субстрата использовались 2%-ые растворы гемоглобина (рН 3.0) и казеина (рН 8.0). Исследуемая реакционная смесь, содержащая по 2,0 мл субстрата и ферментной пробы, инкубировалась при 37°C в течение 30 мин. В контроле к субстрату добавлялись 4,0 мл 5%-ой ТХУ, инкубировалась смесь в тех же

условиях, затем – еще 2,0мл ферментной пробы. Реакция останавливалась добавлением 4,0мл 5%-ой ТХУ. Протеолитическая активность выражалась в мкмоль тирозина, полученного под действием фермента за 1 час при 37°C и рассчитанного по калибровочной кривой.

Результаты и обсуждение. Прежде всего следует отметить, что процессы роста гриба и биосинтеза протеаз взаимосвязаны между собой (табл. 1); протеазы, особенно кислые, продуцируются растущими, жизнедеятельными клетками, находящимися в экспоненциальной фазе и в начале стационарной.

Таблица 1

Динамика роста *P. tigrinus* и синтеза внеклеточных протеаз в условиях глубинного культивирования

Время культивирования, ч.	Редуцирующие вещества, мг/100мл КЖ	Мицелий, г/л КЖ	Растворимый белок, мг/100мл КЖ	Аминый азот, мг/100мл КЖ	Протеолитическая активность, мкмоль тир/100мл КЖ	
					pH 3,0	pH 8,0
0	3075	0,05	490,0	66,0	0	0
18	3054	3,42	410,0	55,5	324,0	88,4
24	2761	6,15	360,0	50,0	400,5	47,2
49	1738	7,20	345,0	32,5	365,2	59,0
66	1472	18,60	406,0	26,2	500,6	135,0
72	74	16,33	380,0	65,0	518,4	170,8

Для синтеза внеклеточных протеаз грибами *Fl. velutipes* и *P. tigrinus* были испытаны питательные среды, на которых, по нашим данным, базидиомицеты растут с хорошим выходом биомассы и оптимальным набором внутриклеточных аминокислот [13]. Как и в предыдущей серии экспериментов [13], в качестве контроля использовалось пивное сусло, на котором одинаково хорошо растут все базидиомицеты. Для *P. tigrinus* наилучшими для синтеза кислых протеаз оказались молочная сыворотка и молочная сыворотка в сочетании с дрожжевым автолизатом (табл. 2). Для *Fl. velutipes* на испытываемых средах максимальная активность кислых протеаз найдена на среде с отваром зеленой растительной массы и молочной сывороткой. Во всех вариантах исследуемых питательных сред щелочные протеазы значительно уступают по своей активности кислым (табл. 3).

Таблица 2

Влияние состава питательных сред на синтез экзопротеаз *P. tigrinus*

Питательные среды	Мицелий, г/л КЖ	Белок, мг/100мл КЖ	Протеолитическая акт-ть, мкмоль тир/100мл КЖ	
			pH 3,0	pH 8,0
пивное сусло	8,3	350,0	130,7	116,0
молочная сыворотка*	17,0	283,0	177,1	51,8
дрожжевой автолизат*	9,8	43,0	70,0	8,4
молочная сыворотка+ дрожжевой автолизат*	22,0	400,0	307,3	72,1

* Добавлена минеральная основа.

Влияние состава питательных сред на синтез протеаз *Fl. velutipes*

Питательные среды	ПА, мкмоль тир/100мл КЖ		ПА, сырой мицелиальный экстракт	
	pH 3,0	pH 8,0	белок, мг/1г сыр.тк.	мкмоль тир/1г сыр.тк.**
пивное сусло	222,6	121,8	19,2	16,5
молочная сыворотка*	193,9	100,8	37,7	17,2
фруктовый отвар*	130,7	116,7	37,2	15,8
отвар зеленой растительной массы*	307,3	72,1	23,0	16,8
гидролизат подсолнечной лузги*	177,1	51,8	26,0	16,6

* Добавлена минеральная основа.

** Кислая протеаза.

Таблица 4

Аминокислотный состав культуральной жидкости при глубинном культивировании *Fl. velutipes* (мг/100мл КЖ)

Аминокислоты	Варианты опыта*				
	1	2	3	4	5
Цис	2,20	-	8,60	следы	следы
Лиз	0,66	0,65	1,20	0,60	-
Аспарагин	-	-	16,22	-	-
Арг	1,64	0,63	следы	2,86	следы
Асп+Сер	9,27	3,40	14,10	16,47	8,61
Гли	следы	2,63	4,74	следы	следы
Глу	5,36	4,41	38,39	11,11	4,76
Тре	-	-	6,45	-	-
Ала	3,64	12,97	19,56	6,14	2,41
Тир	5,53	0,45	2,30	4,93	3,94
ГАМК	3,01	2,54	23,31	следы	следы
Вал+Мет	2,42	8,83	6,35	4,76	2,72
Фен	2,76	-	-	3,82	1,15
Лей+Илей	2,04	2,41	следы	2,98	0,95
Про	10,25	6,25	12,75	11,50	5,75
Сумма	48,78	45,17	153,97	65,17	30,29

* 1 – пивное сусло; 2 – молочная сыворотка; 3 – фруктовый отвар; 4 – отвар зеленой растительной массы; 5 – гидролизат подсолнечной лузги.

Результаты опытов по исследованию аминокислот культуральной жидкости показали (табл. 4), что через 72 часа культивирования *Fl. velutipes* из найденных аминокислот в КЖ количественно преобладают глутаминовая кислота – 25% на среде с фруктовым отваром и 17% на отваре зеленой растительной массы, аланин – 28,7% на среде с молочной сывороткой и 12% на фруктовом отваре, аспарагиновая кислота+серин – 25% на среде с отваром зеленой растительной массы и лишь на среде с фруктовым отваром найден аспарагин – 10,5%.

Очевидно, что богатый набор аминокислот мицелия обеспечивает оптимальный биосинтез протеаз. Как протеазы, так и внутриклеточные свободные аминокислоты, не включающиеся в биосинтез протеаз, выделяются в культуральную жидкость.

Кафедра биохимии, научно-исследовательская лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии

Поступила 04.09.2002

ЛИТЕРАТУРА

1. Фениксова Р.В. Ферменты микроорганизмов. М.: Наука, 1973, с. 7–25.
2. Коновалов С.А., Дорохов В.В., Шахова Т.Е. Ферменты микроорганизмов. М.: Наука, 1973, с. 70–76.
3. Иваница В.А., Егоров Н.С., Аль-Нури М.А. – Микробиология, 1978, т. XLVII, вып. 3, с. 424.
4. Попова Н.В. Ферменты микроорганизмов. М.: Наука, 1973, с. 80–85.
5. Mc Donald J. and Chambers A.K. – Canad. J. Microbiol., 1966, v. 12, p. 1175.
6. Выборных С.Н., Лория Ж.К. и Егоров Н.С. – Микробиология, 1978, т. XLVII, вып. I, с. 32.
7. Магасаник В. Регуляторные механизмы клетки. М.: Мир, 1964, с. 358.
8. Mandelstamm I. – Biochem. J., 1961, v. 79, p. 489.
9. Федорова Л.И., Шиврина А.И. – Микология и фитопатология, 1974, № 8.
10. Попов Е.М., Кашпаров И.В., Попов Л.Е. – Успехи биологической химии, 1994, т. 34, с. 40–82.
11. Шагиян К.А., Алехина И.А., Гадель С.Г., Денисова Н.П. – ДАН Арм.ССР, 1989, т. 89, № 2, с. 88–93.
12. Денисова Н.П. – Микология и фитопатология, 1990, т. 24, в. 6.
13. Мангашян Э.А., Давтян М.А., Ананян Л.Г. – Ученые записки ЕГУ, 2000, № 2, с. 88–92.
14. Anson M.J. – Gen. Physiol., 1938, v. 22, p. 179.

Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Է.Ա. ՄԱՆԹԱՇՅԱՆ, Լ.Գ. ԱՆԱՆՅԱՆ

ԷԿՉՈՊԻՐՈՏԵԱԶՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԸ ԲԱԶԻԴԻՈՍԻՑԵՏՆԵՐՈՒՄ
ԽՈՐՔԱՅԻՆ ԱՃԵՑՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ամփոփում

Ցույց է տրված էկզոգեն պրոտեազների կենսասինթեզի հնարավորությունը *Flammulina velutipes* և *Panus tigrinus* սնկերում համապատասխան սննդամիջավայրերի ընտրությամբ, որոնք հանդիսանում են գյուղատնտեսության և սննդարդյունաբերության թափոններ: Փորձարկված սննդամիջավայրերը անհրաժեշտ հանքային բաղադրամասերի ավելացումով ապահովում են օպտիմալ պրոտեազների կենսասինթեզը: Ինչպես պրոտեազները, այնպես էլ ներքջջային ազատ ամինաթթուները, որոնք չեն ներգրավվում պրոտեազների կենսասինթեզի մեջ, արտազատվում են կուլտուրալ հեղուկ:

BIOSYNTHESIS OF EXOPROTEASES BY BASIDIOMYCETES UPON
SUBMERGED CULTIVATION

Summary

The possibility of biosynthesis of exoproteases by mushrooms *Flammulina velutipes* and *Panus tigrinus* is shown by means of selection of the appropriate nutrient medium, being the waste of a food- and agricultural industry. The tested nutrient medium, considering the addition of proper quantity of mineral components, provides optimum biosynthesis of proteases. Proteases and intracellular free amino acids, not involved in biosynthesis of proteases, are allocated in cultural liquid.