

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КСИЛОТРОФНЫХ МАКРОМИЦЕТОВ

SOME FEATURES OF THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF XYLOTROPHIC MACROMYCETES

**G. Huseynova
A. Hasanova
F. Suleyman
P. Hashimova**

Summary. In the studies carried out, the assessment of the proteolytic enzyme system of xylotrophic macromycetes of the forests of the Greater Caucasus in Azerbaijan was given. It was revealed that the proteolytic enzyme system of xylotrophic macromycetes includes proteases that differ in activity, molecular weight and type. Despite the variation in the synthesis of the enzyme in these fungi depending on the carbon sources, its synthesis proceeds constitutively.

Keywords: xylotrophic macromycetes, proteolytic enzymes, synthesis.

Гусейнова Гюльнар Иса гызы

Докторант, Институт Микробиологии НАН
Азербайджана, г. Баку
gulnar_muel@mail.ru

Гасанова Арзу Расул гызы

К.б.н., старший преподаватель, Сумгаитский
Государственный Университет, Азербайджанская
Республика, г. Сумгаит
arzu.h85@mail.ru

Сулейман Фарида Махир гызы

Докторант, Институт Микробиологии НАН
Азербайджана, г. Баку
s.feride.96@gmail.com

Гашимова Парвин Мирдадат гызы

Докторант, Институт Микробиологии НАН
Азербайджана, г. Баку
peri.omar87@gmail.com

Аннотация. В проведенных исследованиях дана оценка протеолитической ферментной системы ксилотрофных макромицетов лесов территории Большого Кавказа в Азербайджане. Выявлено, что протеолитическая ферментная система ксилотрофных макромицетов включает протеазы, различающиеся по активности, молекулярной массе и типу. Несмотря на варьирование синтеза фермента у этих грибов в зависимости от источников углерода, его синтез протекает конститутивно.

Ключевые слова: ксилотрофные макромицеты, протеолитические ферменты, синтез.

Известно, что ксилотрофные грибы играют важную роль в структуре растительных биоценозов. Так, эти грибы, имеющие сильную и многообразную ферментную систему, участвуют в деградации сложных полимеров, таких как целлюлоза, лигнин, пектин, гемицеллюлоза и белок, составляющих основу клеточной стенки растений [11]. В связи с этим ксилотрофные грибы привлекают внимание исследователей либо как возможный участник биоконверсии растительных субстратов, либо как продуцент того или иного фермента.

Биодеградация растительных субстратов в естественных условиях представляет собой многоступенчатый и полиферментный процесс, в котором участвуют как гидролазы, так и оксиредуктазы [7, 9]. В результате последовательного действия различных ферментов, выделяемых грибами вне клетки, молекулы субстратов разрушаются и образуются легко усваиваемые и низ-

комолекулярные олигомеры и мономеры, которые используются грибами для регулирования своего энергетического баланса.

На сегодняшний день исследования ксилотрофных грибов сосредоточены на изучении их целлюлолитической и лигнолитической активности [8, 10, 14, 15], но изучению других ферментов, в том числе протеаз, катализирующих гидролиз белков [2, 12], уделено недостаточное внимание.

Поэтому целью данной статьи является изучение условий, влияющих на синтез протеаз ксилотрофных макромицетов и их внеклеточную секрецию.

Eng. Life Sci. 2018, 18, 768–778
ignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation

Таблица 1. Протеолитическая активность грибов

Использованные грибы	Активность (ед./мл)				
	Срок культивирования (дни)				
	2	4	6	8	10
<i>Bjerkandera adusta</i>	0,46	0,62	0,68	0,70	0,60
<i>Cerrena unicolor</i>	0,35	0,50	0,56	0,59	0,56
<i>Fomes fomentarius</i>	0,42	0,60	0,67	0,65	0,60
<i>Fomitopsis pinicola</i>	0,41	0,64	0,69	0,70	0,69
<i>Ganoderma applanatum</i>	0,23	0,38	0,52	0,64	0,61
<i>Laetiporus sulphureus</i>	0,32	0,57	0,74	0,73	0,60
<i>Ganoderma lucidum</i>	0,30	0,48	0,66	0,72	0,58
<i>Inonotus hisbidus</i>	0,52	0,65	0,70	0,70	0,62
<i>Trametes gibbosa</i>	0,29	0,41	0,52	0,60	0,61
<i>Fomitopsis pinicola</i>	0,37	0,53	0,60	0,61	0,56
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,17	0,31	0,46	0,56	0,57

ignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation

ignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation

ignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation

ignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation

ignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation

ignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation

ignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation

ignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation

Материалы и методы

В ходе работы было использовано 11 видов кислотолюбных макромицетов, выделенных в чистую культуру [3] из плодовых тел грибов, отобранных в 2015–2021 гг. в лесах территории Большого Кавказа в Азербайджане и идентифицированных в соответствии с применяемыми для этой цели определителями [1]. Рабочие культуры хранили при 4 °С в пробирках с агаризованным солодовым сусло.

Выращивание грибов, изучение влияния питательных веществ на синтез и секрецию протеаз, определение активности протеаз [4] и содержания белка [6], а также частичную характеристику протеаз проводили по известным методам, используемым в работе различных авторов [2, 12].

При изучении влияния ингибиторов для цистеиновых протеаз использовался йодацетамид (ЙАА), для металлопротеаз — этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЕДТА), для сериновых протеаз — фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), хлорметилкетон тиозил-L-фенилаланин (ХМКТФ) и хлорметилкетон тиозил-L-лизин (ХМКТЛ).

Полученные результаты и их обсуждение

Результаты исследования внеклеточной протеолитической активности использованных грибов приведены в таблице 1. Как видно, все использованные грибы обладают протеолитической активностью. Для определения этой активности использовали синтетические субстраты (производные трипсина и субтилизина, а также азоказеин и желатин) для двух групп сериновых протеаз.

Среди грибов, у которых изучалась протеолитическая активность, можно выделить грибы, которые секретируют по крайней мере одну или несколько наиболее распространенных групп протеаз, различающихся по активности и молекулярной массе. Так, у грибов *F. pinicola*, *P. ostreatus* и *L. hisbidus* была идентифицирована одна группа протеаз (62 кДа), у *B. adusta*, *G. applanatum* и *T. gibbosa* — две группы протеаз (85–93 кДа и выше

Таблица 2. Влияние ингибиторов на активность экзопроtease ксилотрофных грибов

Ингибиторы	Концентрация, mM	Остаточная активность, %				
		<i>B.adusta</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>G.lucidum</i>	<i>L.sulphureus</i>	<i>T.gibbosa</i>
ЕДТА	10	14	80	43	47	72
ФМСФ	1	81	60	60	58	50
ХМКТФ	3	86	100	98	75	98
ХМКТЛ	2,5	93	94	96	83	97

95 кДа). Три группы протеаз обнаружены только у гриба *G.lucidum*, где молекулярная масса первой группы составляет 50 кДа, второй — 70 кДа, третьей — 95 кДа.

Следует отметить, что, в отличие от конкретных используемых синтетических субстратов, которые позволяют точно определять тип протеаз, определение активности непосредственно в гелях позволяет определять общую протеолитическую активность, способную гидролизовать белковые субстраты. Поэтому определение класса протеаз проводили с использованием белковых субстратов в присутствии ингибиторов (таблица 2). Как видно, в исследуемых грибах обнаружены как серин, так и металло-протеазы, но их пропорции могут варьироваться в зависимости от продуцента. Так, металлопротеиназы гриба *B. adusta* и сериновые протеазы гриба *T. gibbosa* имеют относительное преимущество.

Синтез того или иного фермента зависит от генотипа продуцента [5], но его реализация существенно зависит от условий выращивания и состава среды.

Исследования добавления различных источников углерода в среду показали, что для проявления высокого уровня протеолитической активности используемых ксилотрофных грибов использование белковых

веществ в качестве источника углерода не носит обязательного характера. Это говорит о том, что ксилотрофные макромицеты в отношении влияния добавления в среду белковых веществ на синтез протеаз отличаются от некоторых фитопатогенных и сапротрофных представителей микромицетов [2]. Однако, использование в качестве источника углерода моносахаридов, особенно добавление в среду фруктозы, приводит к определенному увеличению внеклеточной активности протеазы, но это увеличение не проявляется как повышение активности индуктивного фермента.

Проведенные исследования показали, что pH среды является одним из факторов, существенно влияющих на активность протеаз у ксилотрофных макромицетов. Это более выражено проявляется при изучении общей внеклеточной активности по азоказеину (рис. 1). Как видно, диапазон кислотности среды 5,0–6,5 является благоприятным для активного синтеза протеаз грибами, такая зависимость характерна и для таких представителей микромицетов, как *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* и др. [13].

Таким образом, распространенные в Азербайджане ксилотрофные макромицеты могут активно синтезировать протеолитические ферменты, а их протеолитическая система включает как серин-, так и металло-протеазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарцева М.А. Определитель грибов России. Порядок афиллофоровые. СПб.: Наука, 1998, вып. 2, 391с.
2. Дунаевский Я.Е. и др. Дегградация белковых субстратов ксилотрофными базидиомицетами//Микробиология, 2006, т. 75, № 1, с. 46–51.
3. Методы экспериментальной микологии (Под. ред. Билай В.И.) //Киев: Наукова думка, 1982, 500 с.
4. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. -М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982, 240 с.
5. Мурадов П.З. Основы биологической конверсии растительных отходов. Баку: издательство "Наука", 2003, 114с. 1
6. Практикум по биохимии (Под ред. Н.П. Мешковой и С.Е. Северина.) М.: МГУ, 1979, 430 с.
7. Решетникова И.А. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами. М.: Новинтех-Пресс, 1997, 202с.
8. Andlar, M., Rezić, T., Marđetko N. et al. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation.// Eng Life Sci., 2018, 18(11), p.768–778.
9. Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi.// FEMS Microbiology Reviews, 2005, v.29, iss. 4, p.719–739
10. Behera, B.C. Sethi, B.K., Mishra R.R. et al. Microbial cellulases — Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review//J Genet Eng Biotechnol.,2017, 15(1), p.197–210.

11. Choi, J., Kim, K.T., Jeon, J. et al. Fungal plant cell wall-degrading enzyme database: a platform for comparative and evolutionary genomics in fungi and Oomycetes.// BMC Genomics, 2013, 14, S7. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-S5-S7>
12. De Souza, P.M., de Assis Bittencourt, M.L., Caprara C.C. A biotechnology perspective of fungal proteases.// Braz J Microbiol., 2015, 46(2), p.337–346
13. Dunayevsky Y.E. et al. Regulation of secretion of extracellular proteases by filamentous fungus *Botrytis cinerea*.// J.Russian Phytopathol.Soc., 2001, v.2, N1, p.39–44.
14. Gupta, V.K., Kubicek, Ch.P. Berrin J.-G. et al. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass/ V.K. Gupta,] //Trends in Biochemical Sciences, July 2016, Vol. 41, No. 7, p.633–645
15. Kantharaj, P., Boobalan, B., Sooriamuthu S. et al. Lignocellulose Degrading Enzymes from Fungi and Their Industrial Applications// Int J Cur Res Rev, 2017, v. 9, iss. 21, p.1–11

© Гусейнова Гюльнар Иса гызы (gulnar_muel@mail.ru), Гасанова Арзу Расул гызы (arzu.h85@mail.ru),
Сулейман Фарид Махир гызы (s.feride.96@gmail.com), Гашимова Парвин Мирдадат гызы (peri.omar87@gmail.com).
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



г. Баку