

Биолог. журн. Армении, 4 (55), 2003

УДК 582.287:615.771.7

## ИССЛЕДОВАНИЕ КАЗЕИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИЦЕЛИЯ НЕКОТОРЫХ БАЗИДИАЛЬНЫХ МАКРОМИЦЕТОВ

Н.Г. ГАРИБЯН

*Ереванский государственный университет, кафедра ботаники, 375025*

Caseinolytic activity (CLA) of 17 basidiomycete mushroom cultures was carried out by coagulation and peptonization tests on the de-fatted milk. In tested concentrations cultural liquid (CL) and mycelial extract (ME) possessed different degrees of activity. The tested ME samples possessed weaker activity compared to CL samples. Significant CLA of the selected species (*Suillus luteus*, *Flammulina velutipes*, *Lepista personata*, *Pleurotus ostreatus*) make them suitable for further screening to obtain new mushroom-based enzymatic bioproducts, which could be used in food and medical industry.

*Базидиальные макромицеты — казеинолитическая активность — экстракт мицелия — культуральная жидкость*

Одной из проблем современной биотехнологии является поиск новых источников биоактивных метаболитов и ферментов среди биологических организмов. В этом отношении грибы, в частности макромицеты (базидиальные и сумчатые), представляют особый интерес [1, 5, 6, 12].

Грибы синтезируют различные группы ферментов, однако наибольший интерес представляют ферментные системы базидиомицетов, катализирующие превращение полисахаридов, белков и лигнина (целлюлазы, оксидоредуктазы, гидролазы, протеиназы, пектиназы, липазы и др.) [5].

Проблема исследования грибных протеиназ является сравнительно новой. Установлено, что базидиальные макромицеты синтезируют аспартильные, сериновые, тиоловые и металлопротеиназы, которые в различных соотношениях встречаются у грибов из других систематических групп. Исследование их взаимосвязей и физико-химических свойств установило близость грибных протеиназ с растительными и бактериальными. Однако протеолитической (молокосвертывающей, казеинолитической, тромболитической, фибринолитической) активностью обладают в основном аспартильные протеиназы [7, 10].

Богатым набором внеклеточных протеаз обладают представители афиллофоральных (сем. *Polyporaceae*) и агарикальных (сем. *Tricholomataceae* и *Corgiņaseae*). Протеолитические ферменты некоторых базидиальных макромицетов обладают выраженной молокосвертывающей и казеинолитической активностью (МСА, КЛА) [6, 9, 11].

Имеются сведения о практическом применении этого свойства грибов. Так, *Kuehneromyces mutabilis* с древних времен используется народами Кавказа вместо пепсина в сыроварении, а *Panus conchatus* в качестве заменителя сычужного фермента успешно применяется в молочном производстве при выработке сыров. Полученный из сыроежки *Russula decolorans* фермент руссулин также нашел широкое применение при изготовлении сыров, заменив дефицитный биопрепарат реннин или получаемый из желудков телят сычужный фермент. Отобраны штаммы сапротрофного дереворазрушающего гриба *Irpex lacteus*, образующего протеиназы молокосвертывающего действия, способные заменить сычужный фермент [2, 3, 5].

Целью наших исследований является скрининг казеинолитической активности мицелия некоторых базидиальных макромицетов и оценка их практического значения.

**Материал и методика.** Тканевые культуры исследованных 17 видов/штаммов базидиальных макромицетов (*Collybia acervata* 2Ca, *Coprinus disseminatus* 30Cd, *C. micaceus* 10Cn, *Coriolus versicolor* 1Cv, *Flammulina velutipes* H12Fv, *Lentinus tigrinus* 2Lt, *Lepista personata* 2Lp, *Marasmius oreades* 5Mo, *Huopholoma fasciculare* IV15uHf, *Pholiota destruens* 2Phd, *Pleurotus ostreatus* 19Po, *Polyporus squamosus* 3Ps, *P. varius* 20Pv, *Schizophyllum commune* 1Sch, *Stropharia coronilla* 40Sc, *Suillus luteus* S12 и *Volvariella bombycina* E1Vb) выделяли из плодовых тел, собранных из лесов Центральной части Вирайотских гор Северной Армении.

В опытах по исследованию казеинолитической активности (КЛА) макромицетов использовали культуральную жидкость (КЖ) и экстракт мицелия (ЭМ), полученные после поверхностного выращивания мицелия исследованных видов на жидкой среде сусло в течение 21 сут. Образцы КЖ получались после фильтрации биомассы, которую затем экстрагировали этанолом. Для опытов сухой экстракт разбавляли дистиллированной водой в соотношении 100:1 (мг/мл).

КЛА грибных образцов оценивали по скорости протекания реакций свертывания молока (образование сгустка) и/или пептонизации (молоко становилось прозрачным) [8]. КЖ тестировали в количестве 5 мл, а ЭМ - по 0.2 и 0.8 мл. Контролем служили молоко (К') и молоко—сусло (К). Готовые пробирки инкубировали в термостате в течение пяти суток при 24°.

Повторность опыта двухкратная.

**Результаты и обсуждение.** КЛА образцов КЖ приводятся в таблице. По скорости протекания реакции особо можно выделить *F. velutipes* с высокой степенью пептонизации и *S. luteus* с высокой степенью свертываемости. Затем, начиная с третьих суток, выраженная пептонизация проявилась у *L. personata*, а высокий уровень свертываемости наблюдался у *P. ostreatus*, *P. varius*, *C. micaceus* и *S. coronilla*. Слабая реакция свертываемости и отсутствие пептонизации отмечались у *Ph. destruens*, *P. squamosus*, *V. bombycina*. У остальных видов пептонизация и свертывание молока проявились соответственно на 4 и 5 сут эксперимента. У *C. acervata* обе реакции полностью отсутствовали.

Активность отсутствовала у всех образцов ЭМ (0.2 мл), кроме *C. micaceus*. КЛА обладали образцы ЭМ *Sch. commune* и *C. disseminatus* в количестве 0.8 мл лишь на 5-е сут опыта.

Исследованные культуры, в частности КЖ штаммов съедобных грибов *S. luteus*, *F. velutipes*, *L. personata* и *P. ostreatus*, отличались высокой КЛА и МСА, что указывает на активный синтез ими внеклеточных протеаз.

Таблица 1. Казеиолитическая активность КЖ некоторых макромицетов

N	Вид макромицетов	Сутки				
		I	II	III	IV	V
1	<i>Collybia acervata</i>	П-С-	П-С-	П-С-	П-С-	П-С-
2	<i>Coprinus disseminatus</i>	П-С+	П+С++	П+С++	П++С+++	П++С+++
3	<i>C. micaceus</i>	П+С++	П++С++	П++С+++	П++С+++	П++С+++
4	<i>Coriolus versicolor</i>	П+С+	П++С+	П++С+	П++С++	П++С++
5	<i>Flanmulina velutipes</i>	П+++С++	П+++С++	П+++С++	П+++С++	П+++С++
6	<i>Lepista personata</i>	П-С-	П++С-	П+++С-	П+++С-	П+++С-
7	<i>Lentinus tigrinus</i>	П-С-	П+С-	П++С+	П++С+	П+++С++
8	<i>Marasmius oreades</i>	П-С-	П-С+	П-С+	П++С+++	П++С+++
9	<i>Hypoholoma fasciculare</i>	П+С-	П+С+	П+С+	П+С+	П+С+
10	<i>Pholiota destruens</i>	П-С-	П-С+	П-С+	П-С+	П-С+
11	<i>Pleurotus ostreatus</i>	П+С++	П++С++	П+++С+++	П+++С+++	П+++С+++
12	<i>Polyporus squamosus</i>	П-С-	П-С+	П-С+	П-С+	П-С+
13	<i>P. varius</i>	П+С+	П++С++	П+++С+++	П+++С+++	П+++С+++
14	<i>Schizophyllum commune</i>	П+С+	П++С++	П++С++	П++С++	П++С++
15	<i>Stropharia coronilla</i>	П-С-	П+С++	П+С+++	П+С+++	П+С+++
16	<i>Suillus luteus</i>	П+С++	П+++С+++	П+++С+++	П+++С+++	П+++С+++
17	<i>Volvariella bombycina</i>	П-С-	П-С-	П-С-	П-С+	П-С+

Примечание: П — пептонизация; С — свертывание; (-) — отсутствие активности; от (+) до (+++) наличие различной степени КЛА.

Их можно рекомендовать для дальнейшего доза/эффект скрининга с целью получения новых биотехнологических продуктов грибного происхождения, имеющих практический интерес для медицины и пищевой (молочной) промышленности.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Бадалян С.М.* Проблемы медицинской микологии, 3, 1. 25-32. 2001.
2. *Бойко М.И.* Материалы II Международной конференции. Донецк. 153-157. 2002.
3. *Бойко С.М., Стадничук В.М.* Материалы I Всероссийского конгресса по медицинской микологии. М., 237-238. 2003.
4. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев. 144с. 1988.
5. *Даниляк Х.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Трутнева И.А.* Ферментные системы высших базидиомицетов. Киев. 279с. 1989.
6. *Денисова Н.П.* Микология и фитопатология, 16, 5. 458-466. 1982.
7. *Денисова Н.П.* Микология и фитопатология, 24, 6. 478-485. 1990.
8. Методы экспериментальной микологии. Под ред. Билай В.И., Киев, Наук. думка. 550с, 1982.
9. *Руденская Г.Н., Гайда А.В., Степанов В.М.* Биохимия, 45, 3. 561-568. 1980.
10. *Burton K. S., Wood D. A., Thurston C. F., Barker P. J. J.* Gen. Microbiol. 139, 6. 1379-1386. 1993.
11. *Kawai M.* J. Agr. Chem. Soc. Japan, 47, 8. 467-472. 1973.
12. *Wasser S.P., Nevo E., Sokolov D., Reshetnikov S., Timor-Timenezsky M.* IJMM, 2, 1. 1-19. 2000.

Поступила 12.XII.2003