

**ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, МИКОЛОГИЯ  
PHYSIOLOGY AND ECOLOGY OF THE PLANT, MYCOLOGY**

УДК 582.284 : 577.112

© Ю. П. Загнитко, М. И. Бойко

**ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА  
ТРОМБОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ШТАММА В-02 *IRPEX LACTEUS* (FR.) FR. ОТ  
ЗНАЧЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И PH СРЕДЫ**

*ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»*

*283050, г. Донецк, ул. Щорса, 46; e-mail: upzagnitko@mail.ru*

*Загнитко Ю. П., Бойко М. И. Зависимость активности ферментного препарата тромболитического действия штамма В-02 *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. от значений температуры и pH среды. – Проведено исследование по изучению некоторых физико-химических свойств ферментного препарата тромболитического действия штамма В-02 *Irpex lacteus* Fr. Показано, что экзоферментный препарат тромболитического действия штамма В-02 *I. lacteus* представляет собой комплекс, состоящий из кислых и нейтральных протеиназ с температурным оптимумом действия 30-35°C.*

*Ключевые слова:* тромболитическая активность, ферментный препарат, прогревание, кислотность.

**Введение**

Темпы биотехнологического прогресса заставляют вести поиск в природе новых перспективных продуцентов биологически активных веществ. Все больше возрастает интерес к изучению условий биосинтеза протеолитических ферментов молокосвертывающего, тромболитического и фибринолитического действия. Разработка технологии выращивания перспективных продуцентов таких ферментов и их препаратов имеет огромное значение для сыроварения и медицины. В качестве продуцентов выше перечисленных ферментов в промышленности обычно используют бактерии, актиномицеты, микроскопические грибы, а в последнее время и высшие грибы. Имеется достаточное количество работ и предложений по получению заменителей сычужного фермента на основе глубинных культур микроорганизмов [2, 5, 16, 20]. Но, учитывая некоторые особенности микробных заменителей сычужного фермента, их рекомендуют использовать для получения лишь отдельных сортов сыра только для частичной замены сычужного фермента. Фундаментальные исследования в области экспериментальной микологии с использованием в качестве основных объектов микро- и макромицетов позволили причислить последние к ряду перспективных источников для получения пищевых белков и биологически активных веществ [2, 5, 16, 20] с широким спектром действия: фитотоксическим [6], фунгицидным [18], тромбо- и фибринолитическим [10], молокосвертывающим [12, 13] противоопухолевым [4, 15] и др. [3, 8, 9, 21].

Создание высокоэффективных препаратов фибрино- и тромболитического действия усложняется тем, что препараты протеиназ микроорганизмов содержат гемотоксины, а препараты, получаемые из актиномицетов не находят широкого применения из-за того, что препараты их протеиназ содержат антибиотики. Это исключает или усложняет и сильно ограничивает область применения этих препаратов. Несовершенство микробных препаратов стимулировало интерес к базидиальным грибам как продуцентам ферментов тромболитического действия.

Температура и ионная сила раствора являются одним из важнейших факторов, которые влияют на активность и стабильность молекулы белка, скорость ферментных реакций, совместимость фермента и субстрата и др. [11]. Огромное количество и разнообразие ферментных реакций, в которых проявляется влияние температуры, доказывает важность этого физического фактора.

Исходя из выше изложенного, была поставлена цель – исследовать некоторые физико-химические свойства ферментного препарата тромболитического действия штамма В-02 *Irpex lacteus* Fr.

### Материал и методы исследования

Исследовали ферментный препарат штамма В-02 *Irpex lacteus* Fr., полученный при 80%-ном насыщении серноокислым аммонием. Ранее было показано, что 0,1%-ный раствор ферментного препарата *Hapalopilus nidulans* ТЧ-02 соответствует активности стандартного раствора фибринолизина [1]. Для изучения влияния различных температур на активность ферментов тромболитического действия использовали 0,1%-ный водный раствор белков, полученных при 80%-ном насыщении культуральной жидкости штамма В-02 *I. lacteus* серноокислым аммонием. Вначале 0,1%-ный раствор фермента прогревали на протяжении 60 мин. в термостатах при следующих температурах: 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60°C, а затем определяли его тромболитическую активность согласно методике [14]. Наряду с этим проводили кратковременное прогревание ферментного раствора в течение 15 мин. при температурах: 45, 50, 55, 60, 65 и 70°C, после чего раствор быстро охлаждали до 15°C и определяли тромболитическую активность согласно методике [14].

Для определения рН оптимума реакций, которые катализируют ферменты тромболитического действия штамма В-02 *I. lacteus*, готовили 0,1%-ный раствор ферментов в цитратном буфере. Значения рН цитратного буфера составляли: 2,0; 2,4; 2,8; 3,2; 3,6; 4,0; 4,4; 4,8; 5,2; 5,6; 6,0; 6,4; 6,8; 7,2 ед.

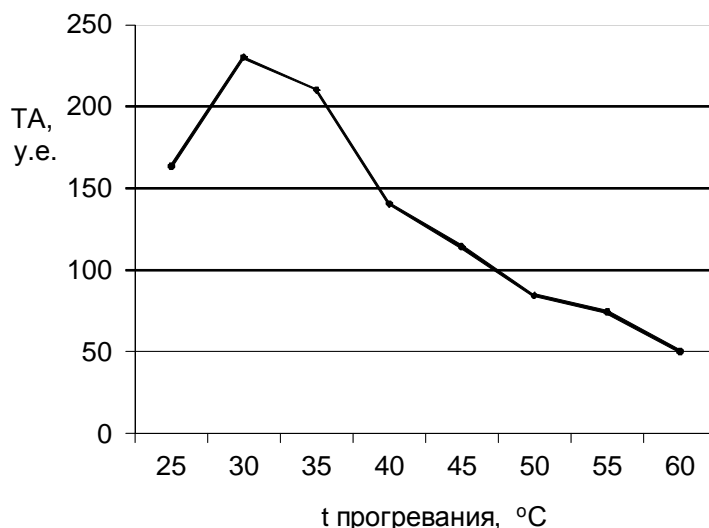
### Результаты и обсуждение

Изучение термостабильности ферментного препарата штамма В-02 *I. lacteus* показало (рис. 1), что при прогревании раствора белка на протяжении 60 мин. максимальный уровень тромболитической активности установлен при температуре 30°C (230 у.е.). При температурах 25, 35 та 40°C также отмечены довольно высокие показатели тромболитической активности (163,3, 210 и 140,5 у.е. соответственно), а в интервале температур 45–60°C наблюдалось достоверное ( $p \leq 0,05$ ) снижение уровня активности энзимов (от 114,3 до 50,4 у.е.).

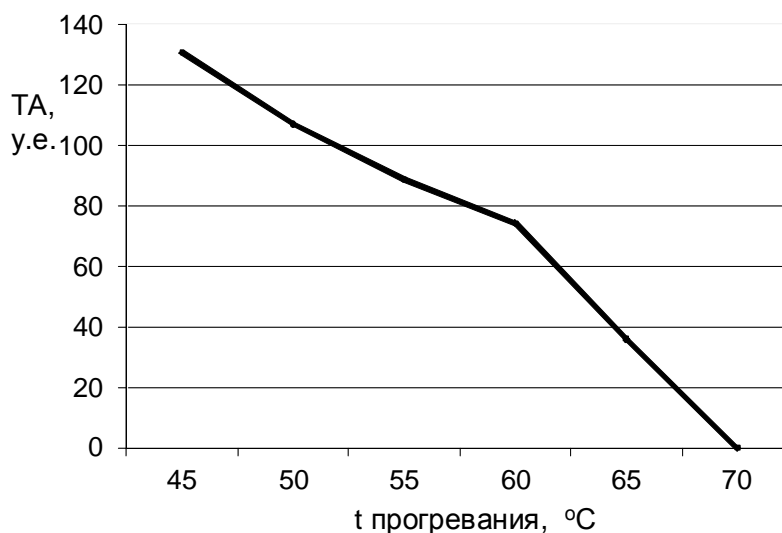
Прогревание 0,1%-ного раствора ферментных белков на протяжении 15 мин. показало стабилизирующее действие кратковременного прогревания при высоких температурах на уровень активности ферментов тромболитического действия (рис. 2). Так, в интервале температур 45–60°C установлены достоверно более высокие показатели тромболитической активности, чем при таких же температурах при прогревании на протяжении 60 мин. При температуре 65°C отмечен низкий уровень активности исследуемых ферментов (36 у.е.), а температура 70°C вызвала полную инактивацию энзимов тромболитического действия.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ферментный белок тромболитического действия из культуральной жидкости штамма В-02 *I. lacteus* Fr. термически нестабилен, но кратковременное прогревание (15 мин.) при высоких температурах вызывает некоторую стабилизацию белковых молекул, что, возможно, связано с образованием фермент-субстратного комплекса, который способствует устойчивости белковых молекул к температуре [11].

Разные ферменты показывают максимальную активность при различных значениях рН. При повышении или понижении уровня рН показатели активности могут снижаться. Так, рН оптимум стабильности ферментов может не совпадать с рН оптимумом активности [17]. Грибные протеиназы делят по их отношению к кислотности среды на нейтральные (рН 6,0–7,5), щелочные (рН 8,0–11,0) и кислые (рН 2,5–5,0) [7, 19]. Наличие оптимума рН можно объяснить тем, что неблагоприятная кислотность среды может привести к инактивации ферментов, так как ионная сила раствора влияет на сродство фермента к субстрату и стабильность белковой молекулы [17].



**Рис. 1. Зависимость тромболитической активности от длительности прогрева и температуры раствора ферментного препарата штамма В-02 *I. lacteus*: 60 мин. прогрева**



**Рис. 2. Зависимость тромболитической активности от длительности прогрева и температуры раствора ферментного препарата штамма В-02 *I. lacteus*: 15 мин. прогрева**

При изучении влияния рН раствора на тромболитическую активность полученного ферментного препарата штамма В-02 *I. lacteus* (рис. 3) установлено 2 пика активности. Так, максимальные показатели тромболитической активности отмечены при рН 3,2–3,6 и 6,8, причем показатели тромболитической активности обоих пиков не имели достоверных различий между собой. Это свидетельствует о том, что, возможно, ферменты тромболитического действия штамма В-02 представлены комплексом, который состоит из кислых и нейтральных протеиназ. Переходные значения рН от кислого к нейтральному вызывали достоверное снижение уровня активности ферментов.

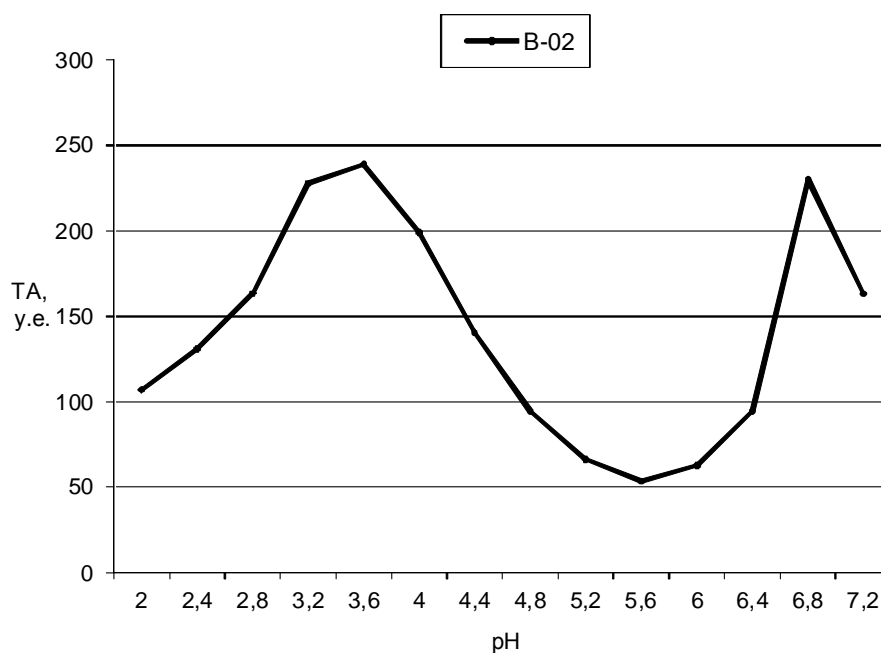


Рис. 3. Изменение ТА ферментного препарата штамма В-02 *I. lacteus* в зависимости от рН реакционной среды (цитратный буфер)

### Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экзоферментный препарат тромболитического действия штамма В-02 *I. lacteus* представляет собой комплекс, состоящий из кислых и нейтральных протеиназ с температурным оптимумом действия 30–35°C, а инактивация их осуществляется при 70°C. Эти исследования будут продолжены для более глубокого познания механизма их действия и возможности практического использования.

### Список литературы

1. Агужен Я. Г. Высшие базидиомицеты – продуценты тромболитических ферментов : Дис. ... канд. биолог. наук : 03.00.24 / Я. Г. Агужен. – Донецк, 1997. – 212 с.
2. Андрианова Т. В. Состояние и перспективы исследования фитогормонов грибов : препр. АН Украины, Ин-т ботаники / Т. В. Андрианова, В. А. Васюк, Л. И. Мусатенко. – К., 1993. – 53 с.
3. Ахмедова З. Р. Компонентный состав внеклеточных целлюлаз базидиомицетов / З. Р. Ахмедова, О. П. Белецкая, К. Д. Давранов // Микол. и фитопатол. – 1994. – Т. 28, вып. 2. – С. 39-44.
4. Бабицкая В. Г. Физиологически активные соединения и биологическое действие глубинного мицелия базидиомицета *Ganoderma lucidum* (Kurt.: Fr.) P. Karst / В. Г. Бабицкая, С. В. Хлюстов, Л. В. Пленина и др. // Биотехнология. – 2003. – № 4. – С. 35-44.
5. Бадалян С. М. Химическое и фармакологическое исследование высших грибов / С. М. Бадалян., В. А. Мнацаканян, Л. С. Арутюнян и др. // Микол. и фитопатол. – 1997. – Т. 31, № 3. – С. 61-66.
6. Белова Н. В. Природа биологической активности высших грибов / Н. В. Белова // Успехи мед. микологии : матер. I Всеросс. конгр. по мед. микологии. – М.: Нац. Академия микологии, 2003. – Т. 1. – С. 230-233.
7. Билай В. И. Основы общей микологии / В. И. Билай. – К.: Вища шк., 1980. – 360 с.
8. Бисько Н. А. Перспективы использования лекарственного гриба *Ganoderma lucidum* в лечебно-профилактических целях / Н. А. Бисько, Н. Ю. Митропольская, М. П. Гулич и др. // Успехи мед. микологии : матер. I Всеросс. конгр. по мед. микологии. – М.: Нац. Академия микологии, 2003. – Т. 1. – С. 234-235.

9. *Виноградова С. П.* Биосинтез гидролитических ферментов при совместном культивировании макро- и микромицетов / С. П. Виноградова, С. Н. Кушнир // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 6. – С. 652-655.
10. *Денисова Н. П.* Фибринолитическая активность культур базидиомицетов / Н. П. Денисова, И. А. Алехина // Микол. и фитопатол. – 1987. – Т. 21, вып. 5. – С. 471-477.
11. *Диксон М.* Ферменты : в 3-х т. / М. Диксон, Э. Уэбб. – М. : Мир, 1982. – 1120 с.
12. *Загнітко Ю. П.* Характер впливу чаркору – регулятора росту – на активність протейназ штамів *Irpex lacteus* Fr. / Ю. П. Загнітко, М. І. Бойко // Зб. наук. праць Луганського нац. аграрного ун-ту. – Луганськ, 2002. – № 15 (27). – С. 57-60.
13. *Загнітко Ю.П.* Характер впливу якості живильного середовища на протеолітичну активність штамів *Irpex lacteus* Fr. / Ю. П. Загнітко, Т. В. Гурідова // Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин : матер. Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Дніпропетровськ, 5–6 квітня 2005 р.). – Дніпропетровськ, 2005. – С. 23-24.
14. *Имшенецкий А. А.* Селекция микроорганизмов, обладающих тромболитической активностью / А. А. Имшенецкий, С. З. Броцкая // Микробиология. – 1969. – Т. 38, вып. 6. – С. 1043-1050.
15. *Негруцький С. Ф.* Культивування продуцента молокозгортаючого ферменту *Hirschioporus laricinus* у біореакторі / С. Ф. Негруцький, М. І. Бойко, О. В. Федотов, В. А. Полях // Тез. доп. IX з'їзду Укр. бот. тов-ва. – К., 1992. – С. 87-88.
16. *Никитина В. Е.* Стимуляторы лектиновой активности *Lentinus edodes* на синтетических агаризованных средах / В. Е. Никитина, О. М. Цивилева, Л. В. Гарибова // Биотехнология. – 2004. – № 3. – С. 49-54.
17. *Полторак О. М.* рН-оптимум стабільності ферментів / О. М. Полторак, В. Н. Ташлицький, Л. Ф. Атякшева // Методи получения, анализа и применения ферментов : тез. докл. – Рига, 1990. – С. 6.
18. *Сычев П. А.* Антагонизм съедобных ксилотрофов к *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref в культуре / П. А. Сычев, С. Н. Мелешко // Проблемы лесной фитопатологии и микологии : тез. докл. междунар. науч. конф. (г. Каунас, 17–20 сентября 1991 г.). – М. – Каунас, 1991. – С. 65.
19. *Цаплина И. А.* Синтез нейтральных протеаз микроорганизмами // биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз / И. А. Цаплина. – М. : Наука, 1979. – С. 197-243.
20. *Шаркова Т. С.* Изучение физиологии хищного гриба *Arthrobotrys longa* – продуцента лонголитина в связи с длительным хранением культуры в лабораторных условиях / Т. С. Шаркова, В. Н. Максимов // Микол. и фитопатол. – 1999. – Т. 33, вып. 5. – С. 338-345.
21. *Pelaez F.* Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation / F. Pelaez, M. J. Martinez, A. T. Martinez // Mycol. Res. – 1995. – Vol. 99. – P. 37-42.

**Zagnitko Yu. P., Boyko M. I. The dependence of the activity of the enzyme preparation of thrombolytic action of the strain B-02 *Irpex lacteus* Fr. values of temperature and pH.** – The study on some physical and chemical properties of thrombolytic enzyme preparation of the strain *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. B-02 was conducted. It was shown that the extracellular thrombolytic enzyme of the strain *I. lacteus* B-02 is a complex consisting of acidic and neutral proteases with an optimum temperature of action 30–35°C.

*Key words:* thrombolytic activity, enzyme preparation, warming, acidity, extracellular enzymes.