

Национальная академия микологии
ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

СОВРЕМЕННАЯ МИКОЛОГИЯ В РОССИИ

4

ТОМ

ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ НА СОСТАВ УГЛЕВОДОВ В ЦИТОЗОЛЕ *TRAMETES MAXIMA*

Кляйн О.И.¹, Куликова, Н.А.^{1,2}, Ландесман Е.О.¹, Королева О.В.¹

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва

²МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, кафедра земледелия и агроэкологии, г. Москва

Введение. В настоящее время возрастает интерес к использованию *Trametes* в качестве биоиндикаторов состояния лесных экосистем, поэтому актуальным является изучение особенностей функционирования грибов «белой гнили» в природных условиях. Неотъемлемым компонентом всех природных сред являются гуминовые вещества (ГВ) – геополимеры переменного состава, обладающие физиологической активностью. Установлено, что благодаря лигнин-модифицирующей системе грибы «белой гнили» активно участвуют в процессах биodeградации ГВ и могут использовать их в качестве источника углерода [1], однако неизученным остается вопрос о влиянии ГВ на метаболизм грибов. Целью работы было исследование влияния ГВ на состава углеводов в цитозоле *Trametes maxima* 0275.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся штамм *Trametes maxima* 0275 из коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Жидкофазное ротационное культивирование гриба проводили на полной среде, обычно используемой для культивирования гриба, и минимальной, моделирующей условия недостатка легкодоступного источника углерода. Состав полной среды (г/л): глюкоза – 10,0; пептон – 3,0; KH_2PO_4 – 0,6; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; K_2HPO_4 – 0,4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0005; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,25; CuSO_4 – 0,25. Минимальная среда имела аналогичный состав, но не содержала глюкозы. Внесение ГВ в среды осуществляли на 7-е сут культивирования.

Концентрация ГВ 50 мг/л. Отбор мицелия для определения углеводов проводили через 3, 6, 12 и 24 ч после внесения ГВ.

Экстракцию углеводов из мицелия проводили согласно [2] с последующей очисткой экстракта она комбинированной колонке с ионообменными смолами Dowex-1 (ацетатная форма) и Dowex 50W (H^+). Состав углеводов определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ), получая из лиофильно высушенного экстракта триметилсилильные производные сахаров [3].

В качестве внутреннего стандарта использовали α -метил-D-маннозид (Merck, США). Хроматографирование проводили на газожидкостном хроматографе Кристалл 5000.1 (Хроматек, Россия) на капиллярной колонке ZB-5 30 м-0,32 мм-0,25 мкм (Phenomenex, США) при градиентном нагревании от 130 до 270°C со скоростью 5–6 °C/мин. В качестве стандартов использовали глюкозу, маннит, арабит, инозит, трегалозу (Sigma, США).

Результаты и обсуждение. Было установлено, что углеводы в цитозоле *T. maxima* представлены, главным образом, трегалозой и глюкозой, которые составляли 90% от общего содержания углеводов. В следовых количествах присутствовали также маннит, арабит и глицерин. При росте гриба на минимальной среде происходило постепенное снижение содержания трегалозы с 80 до 50%, сопровождающееся ростом концентрации глюкозы с 9 до 43% (рис. 1).

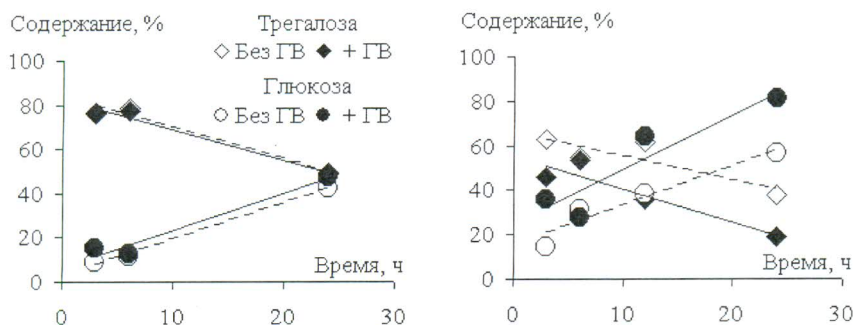


Рисунок 1. Влияние ГВ на содержание трегалозы и глюкозы в цитозоле *T. maxima*.

Можно предположить, что в данных условиях образование глюкозы происходило за счет расщепления трегалозы. Внесение ГВ в условиях минимальной среды незначительно влияло на содержание трегалозы и приводило, в зависимости от времени экспонирования, к увеличению концентрации глюкозы в 1,1–1,6 раза. Можно предположить, что в данных условиях

T. maxima использовал ГВ в качестве источника углерода, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными [1].

На полной среде наблюдали аналогичную тенденцию: в процессе роста культуры происходило снижение содержания трегалозы и возрастание глюкозы. Внесение ГВ, как и на минимальной среде, со-

ЦИТОЗОЛЕ

О.В. Королева О.В.¹
 ИА РАН, г. Москва
 биологии, г. Москва

ор мицелия для
 ерез 3, 6, 12 и 24 ч

ия проводили со-
 экстракта она ком-
 енными смолами
 50W (H⁺). Состав
 жидкостной хро-
 фильно высушен-
 производные са-

та использовали
 . Хроматографи-
 ном хроматогра-
 ия) на капилляр-
 км (Phenomenex,
 от 130 до 270°C со
 андартов исполь-
 нозит, трегалозу

установлено, что
 представлены, глав-
 которые состав-
 одов. В следовых
 аннит, арабит и
 имальной среде
 содержания тре-
 еся ростом кон-

.

Для очистки ферментов из культуральной жидкости, полученной после семисуточного погружённого культивирования гриба, были использованы следующие методы: диализ, гель-фильтрация, ионообменная хроматография, нативный электрофорез. Определение активности внеклеточных протеиназ проводилось спектрофотометрически по степени гидролиза синтетических пара-нитроанилидных субстратов N-бензоил-L-аргинил-паранитроанилид (ВАРА) и пироглутамил-аланил-аланил-лейцил-паранитроанилид (Glp-AAL-pNa).

В культуральной жидкости были обнаружены трипсин-подобная протеолитическая активность - 520 ед./г сух. мицелия*мин (по ВАРА) и субтилизин-подобная протеолитическая активность - 540 ед./г сух. мицелия*мин (по Glp-AAL-pNa). Трипсин-подобная

источника угле-
 опубликованны-

логичную тен-
 происходило
 зрастание глю-
 ьной среде, со-

проводилось повышением концентрации глюкозы в цитозоле в 1,4–2,5 раза и сопровождалось снижением концентрации трегалозы. Однако, в отличие от культивирования на минимальной среде, внесение ГВ приводило к выраженному снижению концентрации трегалозы.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что внесение ГВ в питательную среду приводит к увеличению концентрации глюкозы в цитозоле *T. maxima*. Результаты хорошо согласуются с установленным ранее усилением дыхания *T. maxima* под действием ГВ [1] и свидетельствуют о возможном усилении гликолиза.

Список литературы

1. Klein OI, Isakova EP, Deryabina YI et. all. Humic substances enhance growth and respiration in the Basidiomycetes *trametes maxima* under carbon limited conditions. *J Chem Ecol.* 2014; 40(6): 643-52
2. Somogui M. Determination of blood sugar. *J Biol Chem.* 1945; 160: 69
3. Бробст К.М. Газожидкостная хроматография три-метилсилильных производных. Под. ред. Ф.Я. Хорлина. М.: Мир. 1975: 9-13

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований 14-34-50568.

СЕКРЕТИРУЕМЫЕ ПЕПТИДАЗЫ И ИНГИБИТОРЫ ПЕПТИДАЗ ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *FUSARIUM ANGUIOIDES*

Лавренова В.Н.

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Грибы секретируют во внешнюю среду гидролитические ферменты, при этом спектр внеклеточных ферментов зависит от экологических особенностей грибов. Паразитические виды грибов секретируют соединения, необходимые для проникновения в ткани хозяина, в частности, для фитопатогенных видов характерна секреция трипсин-подобных пептидаз. Цель данной работы заключалась в изучении, выделении и очистке внеклеточных пептидаз из культуральной жидкости гриба *Fusarium anguioides* (штамм 80310) и оценки его трофического статуса.

Для очистки ферментов из культуральной жидкости, полученной после семисуточного погружённого культивирования гриба, были использованы следующие методы: диализ, гель-фильтрация, ионообменная хроматография, нативный электрофорез. Определение активности внеклеточных протеиназ проводилось спектрофотометрически по степени гидролиза синтетических пара-нитроанилидных субстратов N-бензоил-L-аргинил-паранитроанилид (ВАРА) и пироглутамил-аланил-аланил-лейцил-паранитроанилид (Glp-AAL-pNa).

В культуральной жидкости были обнаружены трипсин-подобная протеолитическая активность - 520 ед./г сух. мицелия*мин (по ВАРА) и субтилизин-подобная протеолитическая активность - 540 ед./г сух. мицелия*мин (по Glp-AAL-pNa). Трипсин-подобная

пептидаза проявляла максимальную активность при pH 8-9 и температуре 40 °С. Субтилизин-подобная пептидаза имела максимум активности при pH 9–9,5 и температуре 45 °С. Очистка позволила повысить удельные активности трипсин-подобной пептидазы в ≈ 70 раз, субтилизин-подобной пептидазы – в ≈ 200 раз. Исследуемые пептидазы были разделены методом ионообменной хроматографии. Молекулярные массы ферментов, определённые методом гель-фильтрации, составили 22 кДа для трипсин-подобной и 316 кДа для субтилизин-подобной пептидазы. В культуральной жидкости были также обнаружены ингибиторы трипсин-подобных и цистеиновых пептидаз.

Секреция грибом *F. anguioides* трипсин-подобных пептидаз, являющихся маркерами фитопатогенности, подтверждает паразитический характер взаимодействия исследуемого гриба с хозяином. Вместе с тем, высокая активность субтилизин-подобной пептидазы, более характерная для сапротрофных грибов, косвенно свидетельствует о способности *F. anguioides* переходить к сапротрофному способу питания и развиваться в погибших клетках растения. Обнаруженные в культуральной жидкости ингибиторы могут использоваться грибом для защиты пищевых ресурсов от бактерий и других грибов, а также в процессе патогенеза, ингибируя ферменты растения-хозяина.