

**Касумова С.Ю.,
Намазов Н.Р.,
Гасанов Х.А.,
Мурадов П.З.**

ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ У ХИЩНЫХ ГРИБОВ

Аннотация. Исследована способность 110 штаммов хищных грибов из родов *Arthrobotrys*, *Nematophagus*, *Candelabrella*, *Golovinia*, *Dactylella*, *Dactylariopsis*, *Dactylaria* к биосинтезу протеолитических ферментов. Наибольшее образование фибринолитических ферментов наблюдалось у представителей рода *Arthrobotrys*. Молокосвертывающая активность у представителей родов *Dactylariopsis*, *Dactylaria*, желатиназная - у р. *Arthrobotrys* и р. *Candelabrella*. Отобраны 2 штамма - *A.longa* и *A.compacta* как наиболее перспективные продуценты исследуемых ферментов.

Ключевые слова: хищные грибы, рост, биосинтез, протеаза

Хищные нематофаговые грибы, использующие в качестве источников питания органические вещества животного происхождения, занимают особое место в почвенном биоценозе [2].

Процесс хищного питания, осуществляющийся путем улавливания грибом нематоды с последующим умерщвлением и использованием содержимого жертвы, указывает на наличие у этих грибов специализированных ферментных систем и, в первую очередь, протеолитических. Предположение о наличии ферментов, участвующих в утилизации белкового субстрата в ходе хищного питания, было высказано рядом исследователей [1; 2].

Однако отсутствие экспериментальных данных, подтверждающих это предположение, делает целесообразным научный поиск и проведение более широких исследований по изучению роли протеолитических ферментов в процессе взаимоотношения гриба и нематоды.

В этой связи исследование протеолитической активности и регулирование биосинтеза протеаз позволит понять биологические особенности и расширить сферу практического использования нематофаговых грибов.

Целью настоящей работы явилось изучение протеолитической ферментативной активности хищных грибов.

Объектом исследования служили 110 штаммов хищных грибов, принадлежащих к родам *Arthrobotrys*, *Nematophagus*, *Candelabrella*, *Golovinia*, *Dactylella*, *Dactylariopsis*, *Dactylaria*. Изучаемые культуры грибов выращивали в стационарных условиях в колбах Эрленмейера с объемом среды 50 мл. Температура культивирования 25-28⁰ С. В качестве питательной среды использовали составленную нами среду следующего состава (г/л): сахароза - 20, глицерин - 10мл, молочная кислота - 0,5мл, лактат Na - 0,35мл. Культуральную жидкость отделяли фильтрованием, под вакуумом, через плотный фильтр. Количество биомассы определяли весовым методом, рН культуральной жидкости – потенциометрически.

Фибринолитическую активность определяли методом фибриновых пластинок (по методу Аструпа и Мюллерца). Фибриновые пластинки с испытуемыми образцами выдерживали 24 часа при 37⁰С [3].

Тромболитическую активность оценивали по скорости лизиса искусственно полу-

ченных тромбов крови и плазмы человека. За лизисом тромбов наблюдали в течение 24 часа [4].

Казеинолитическую активность (по методу Сгоуриса) определяли на спектрофотометре СФ-4А при длине волны 280 нм, используя в качестве субстрата казеинат натрия [3].

О степени молокосвертывающей активности судили по степени створаживания молока [5].

Желатиназную активность определяли по степени разжижения столбика желатина в пробирке [5].

Первый этап исследований был направлен на отбор среди 110 штаммов хищных грибов видов, обладающих высокой протеолитической активностью. Отбор исследуемых штаммов проводился на различных белковых субстратах: казеине, обезжиренном молоке, желатине, фибриногене. Исследование казеинолитической активности показало, что на казеиновом субстрате она низка, а у некоторых видов отсутствует. Казеин, обычно используемый в качестве субстрата для проявления активности нейтральных и щелочных протеиназ, оказался непригодным для изучения казеинолитической активности исследуемых грибов. Поэтому в дальнейших исследованиях был взят другой субстрат – казеинат натрия, позволивший вести поиск ферментативной активности в кислой среде. Полученные данные позволили судить об относительно низкой казеинолитической активности хищных грибов. Как видно из таблицы 1, культуральная жидкость большинства штаммов обладала молокосвертывающим действием. Среди грибов наиболее активными оказались два штамма – представители рода *Dactylaria*. Умеренной активностью обладали представители родов *Arthrobotrys* и *Candelabrella*.

Таблица 1

Протеолитическая активность хищных грибов

Роды грибов	Количество видов/штаммов	Субстраты		
		Желатина (мм)	Молоко (мин)	Казеинат натрия КЕ
<i>Arthrobotrys</i>	12/85	19-22	15-35	2-1
<i>Nematophagus</i>	3/6	8-12	60-70	2-4
<i>Candelabrella</i>	S	10-20	35-50	1-2
<i>Golovinia</i>	3/8	7-11	55-75	2-5
<i>Dactylariopsis</i>	2/5	9-16	60-90	3-5
<i>Dactylella</i>	S	9-11	50-85	2-4
<i>Dactylaria</i>	S	8-10	70-95	3-4

Выявлено, что желатиназная активность присуща всем исследуемым хищным грибам. Высокая желатиназная активность выявлена у 4 штаммов рода *Arthrobotrys* и у одного штамма рода *Candelabrella*.

Имея в виду, что желатиназа и сычужный фермент относятся к пепсинам, допускается предположение о наличии в исследованных грибах протеолитических ферментов, относящихся к группе пепсинов.

Исследована способность хищных грибов к биосинтезу протеаз с фибринолитическим действием. Как показали результаты экспериментов, нематофаговые гифомицеты способны активно разжижать фибриновые пластины. Наиболее интересные данные получены у представителей рода *Arthrobotrys*.

Способность микроорганизмов образовывать протеазы с фибринолитическим действием не всегда коррелирует с их тромболитической активностью, и поэтому нередко культуральная жидкость, вызывающая растворение фибриновой пленки, не лизирует тромбы крови.

Проведенные исследования выявили значительные колебания тромболитической ак-

тивности у различных родов и видов хищных грибов. Наиболее перспективными оказались *A. longa* и *A. compacta* как обладающие высокой фибринолитической и тромболи- тическими активностями при низкой сопутствующей казеинолитической, что является существенным обстоятельством при изыскании продуцентов ферментов тромболи- тического действия для медицинских целей (таб. 2 и 3).

Таблица 2

Ферментативная активность *A. compacta*

Возраст культуры	Воздушно-сухой мицелий в мг/ 100 мл	рН	Ферментативная активность		
			тромболит. в час	молокосвертыв. в мин.	казеинолитит. на 100 мл
3	200	6,8	24	60	1
4	250	–	22	65	1
5	300	–	22	60	–
6	300	–	15	20	2
7	500	6,7	14,5	30	2
8	600	6,6	15,0	60	2
9	650	6,5	14	60	5
10	650	–	19	55	4
11	650	6,2	20	45	4

Таблица 3

Ферментативная активность *A. longa*

Возраст культуры	Воздушно-сухой мицелий в мг	рН	Ферментативная активность		
			тромболит. в час	молокосвертыв. в мин.	казеинолитит. на 100 мл
3	230	6,8	22	65	2
4	250	–	20	70	2
5	270	6,5	17	73	2
6	590	–	17,5	75	4
7	700	6,2	15,5	85	3
8	750	–	16	90	3,5
9	720	6,1	–	95	4
10	760	5,8	22	80	4
11	800	5,5	24	85	4,5

ЛИТЕРАТУРА

1. Сопрунов Ф.Ф. Хищные низшие растения Турмениистана. Автореф.дисс....к.б.н. - Ашхабад, 1951. - 24 с.
2. Мехтиева Н.А. Хищные немаатофаговые грибы-гифомицеты. - Баку: Элм, 1979. - 247 с.
3. Ландау Н.С., Егоров Н.С. Изучение образования протеаз фибринолитическим действием у *No-cardia species*, штамм 1 // Микробиология. - 1971. - Т. 40, №5. - С.829-832.
4. Имшенецкий А.А., Броцкая С.З. Селекция микроорганизмов, обладающих тромболи- тической активностью// Микробиология. - 1969. - Т.38, № 6. - С.1043-1049.
5. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. - Киев: Наукова думка, 1982. - 500 с.

S. Gasimova, N. Namazov, Ch. Hasanov, P. Muradov

ASTUDY ON THE PRODUCTION OF PROTEOLYTIC ENZYMES BY PREDACIOUS FUNGI

Abstract. The ability to synthesize proteases was studied among 110 predacious fungi belonging to the genera *Arthrobotrys*, *Nematophagus*, *Candelabrella*, *Golovinia*, *Dactylella*, *Dactylariopsis*, *Dactylaria*. Among 110 studied cultures most of strains produced proteolytic enzymes during their growth. The highest production of fibrinolytic enzymes was detected in the strains belonging to the *Arthrobotrys* genera, the ability to clot milk – *Dactylariopsis* and *Dactylaria* genera; gelatinase activity – *Arthrobotrys* and *Candelabrella* genera. *A. longa* and *A. compacta* had the highest proteolytic activity.

Key words: predacious fungi, growth, biosynthesis, proteases