

UDC 579

АМИЛАЗА ИЗ ГРИБА ЕЖОВИКА ГРЕБЕНЧАТОГО *Hericium erinaceum*

© 2013 г. Ф. Ду*, Н. Х. Ван*, Т. Б. Нанг**

*Государственная лаборатория агробιοтехнологии кафедры микробиологии,
Китайский сельскохозяйственный университет, Пекин 100193, Китай

e-mail: hxwang@cau.edu.cn

**Медицинский факультет, Китайский университет Гонконга, Шатин, Новые Территории, Гонконг, Китай

e-mail: b021770@mailserv.cuhk.edu.hk

Поступила в редакцию 29.03.2012 г.

Из плодовых тел гриба ежевика гребенчатого *Hericium erinaceum* выделена и очищена амилаза, сходная по молекулярной массе и N-концевой последовательности аминокислот с ферментом из *Bacteroides thetaiotaomicron*. Схема очистки включала экстракцию фермента из плодовых тел дистиллированной водой, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, SP-сефарозе и FPLC на Superdex 75. Амилаза *H. erinaceum* сорбировалась на ДЭАЭ-целлюлозе в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 7.4, элюировалась 0.2 М NaCl в том же буфере, на SP-сефарозе в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 4.5, элюировалась 0.3 М NaCl в том же буфере. Собранные активные фракции подвергали очистке на FPLC на колонке с Superdex 75. На основании ДДС-ПААГ-электрофореза собранные фракции содержали гомогенный белок с молекулярной массой 55 кДа. Амилаза из *H. erinaceum* имела оптимум pH 4.6, температурный оптимум 40°C. Активность фермента увеличивалась в присутствии ионов Mn²⁺ и Fe³⁺, ингибировалась ионами Hg²⁺.

DOI: 10.7868/S0555109913010042

Hericium erinaceum хорошо известен, как съедобный и лекарственный гриб в восточных странах. В последнее время проведены исследования его антимикробных и противораковых свойств. Показано, что полисахариды гриба обладают противоопухолевой активностью и в комбинации с доксорубицином являются эффективными при лечении лекарственно-устойчивой гепатоцеллюлярной карциномы человека [1]. В 2010 г. в работе [2] было показано, что полисахариды из *H. erinaceum* способны увеличивать активность антиоксидантных ферментов, матричной металлопротеиназы-1, тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 и уровня коллагенового белка в коже пожилых крыс. Водный экстракт *H. erinaceum* способствовал индукции экспрессии генов в макрофагах путем активации фактора транскрипции NF-κB [3]. Он также способствовал проявлению естественной цитолитической активности клеток-убийц через индукцию интерлейкина-12 в спленоцитах, а также в других иммуномедиаторах или клеточных компонентах [4]. В 1994 г. Кавасаги с соавт. [5] выделили из *H. erinaceum* лектин HEL (54 кДа), специфичный к сиаловой кислоте, который включал субъединицы с молекулярной массой 15 и 16 кДа. В 2010 г. Ли с соавт. выделили из *H. erinaceum* лектин (51 кДа), который был стабильным в диапазоне pH 1.9–12 и при температуре до 70°C [6]. Лектин обладал митогенной

активностью по отношению к спленоцитам, антипролиферативным действием по отношению к раку молочной железы и клеткам гепатомы, ингибирующей активностью по отношению к обратной транскрипции ВИЧ-1 [6]. Из этого же источника были выделены лакказы с новой N-концевой последовательностью и молекулярной массой 63 кДа [7], дитерпеноиды эринацины H, I и Q еринакол [8].

В настоящее время в литературе нет данных о выделении амилазы (EC 3.2.1.1) из *H. erinaceum*. В 2008 г. Куфориджи и Фасиди [9] обнаружили амилазную активность в спорофорах и в склероциях *Pleurotus tuber-regium*, но попытки выделить фермент не было сделано.

Цель работы – выделение амилазы из гриба ежевика гребенчатого *H. erinaceum*, изучение ее свойств, сравнение N-концевой последовательности аминокислот с другими микробными α-амилазами.

МЕТОДИКА

Микроорганизмы и реактивы. Свежие гриба ежевика гребенчатого *H. erinaceum* (600 г) были приобретены в торговой сети г. Пекина (Китай). Для очистки фермента использовали ДЭАЭ-целлюлозу фирмы “Sigma” (США), Superdex 75 HR 10/30 и систему АКТА Purifier фирмы “GE Health-

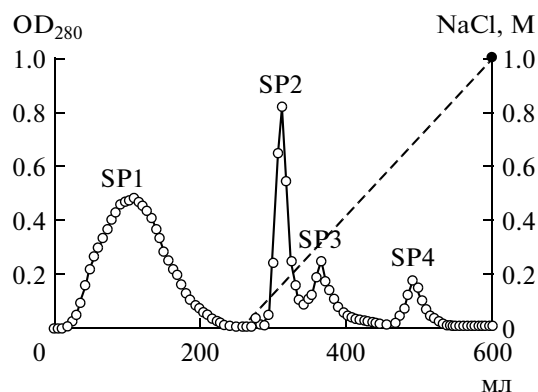


Рис. 1. Ионообменная хроматография на SP-сефарозе фракции D3, полученной после элюции с ДЭАЭ-целлюлозы 10 мМ трис-НСl буфером (рН 7.4), содержащим 0.2 М NaCl. Пунктирная линия – линейный градиент концентрации NaCl (0–1.0 М).

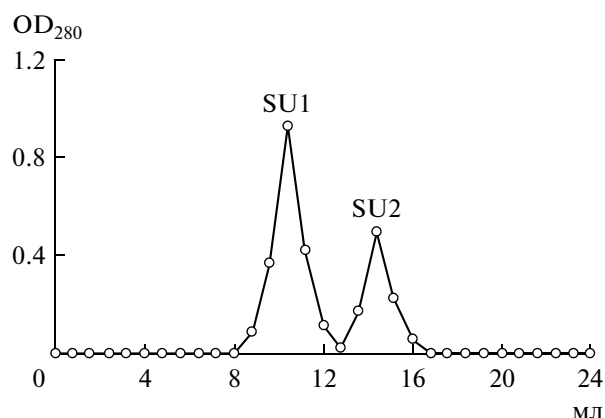


Рис. 2. FPLC фракции SP2 на колонке Superdex 75.

care” (США). Все остальные химические вещества, используемые в работе, были аналитической чистоты.

Выделение амилазы из *H. erinaceum*. Свежий гриб *H. erinaceum* (600 г) гомогенизировали в дистиллированной воде (2 мл/г) в блендере Варинга (США) при максимальной скорости в течение 2 мин. Гомогенат центрифугировали при 12000 g 20 мин, к супернатанту добавляли трис-НСl буфер, рН 7.4, до концентрации 10 мМ. Полученный раствор наносили на колонку (2.5 × 20 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, предварительно уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили тем же буфером для удаления не связавшихся с ионообменником фракций (D1), адсорбированные белки элюировали последовательно 0.1, 0.2 и 1.0 М NaCl в 10 мМ трис-НСl буфере, рН 7.4. В результате получены фракции D2, D3 и D4. Фракцию D3 диализовали против 10 мМ NH₄-ацетатного буфера, рН 4.5, в течение ночи перед проведением ионообменной хроматографии на SP-сефарозе (колонка 1.5 × 20 см) в том же буфере (рис. 1). После выхода неадсорбированного белка (фракция SP1) проводили элюцию линейным градиентом концентрации (0–1 М) NaCl в 10 мМ NH₄-ацетатном буфере, рН 4.5.

Фракция SP2 была элюирована 0.3 М NaCl, собрана и лиофилизована, затем подвергнута FPLC на колонке Superdex 75 HR10/30 (рис. 2) в 0.2 М NH₄HCO₃ буфере, рН 8.5. Скорость потока составляла 0.4 мл/мин, объем фракций 0.8 мл. Первый пик (фракция SU1) представлял очищенную амилазу.

Определение молекулярной массы амилазы. Электрофорез очищенного белка в ПААГ с Na-ДДС проводили по методу Лемли [10]. Гели окрашивали смесью: 0.1%-ный Кумасси голубой в растворе 30%-ного (об.) метанола и 10%-ной (об.) уксусной кислоты. Отмывку проводили в раство-

ре, содержащем 30% (об.) метанола и 10% (об.) уксусной кислоты. Определение молекулярной массы осуществляется методом гель-фильтрации (FPLC) на колонке Superdex 75 HR10/30. В работе использовались стандарты белков с известной молекулярной массой: бычий сывороточный альбумин (67 кДа), яичный альбумин (43 кДа), рибонуклеаза (13 кДа), аprotинин (6.5 кДа) и витамин B₁₂ (1.355 кДа).

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности очищенного фермента. Анализ N-концевой последовательности выделенной амилазы проводили с помощью Edman degradation с использованием секвенатора Hewlett Packard 1000A (США), оснащенного системой жидкостной хроматографии высокого разрешения [11].

Количественное определение активности амилазы. Активность амилазы оценивалась по количеству восстанавливающих сахаров с 3.5-динитросалициловой кислотой (ДНС) [12]. Разбавленный фермент (100 мкл) инкубировали в 100 мкл ацетатного буфера, рН 4.6, при 40°C в течение 5 мин, после чего добавляли 1.0%-ный растворимый крахмал (200 мкл) предварительно нагретый до температуры 40°C. Реакцию проводили в течение 10 мин и останавливали добавлением 400 мкл 0.4 М NaOH. Затем вносили 100 мкл ДНС, смесь нагревали до 100°C 5 мин, после чего определяли оптическую плотность при длине волны 520 нм. За единицу активности фермента принимали такое количество фермента, которое образует 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин. Все реакции проведены по крайней мере трижды, рассчитаны стандартные ошибки.

Определение оптимальных рН и температуры для действия амилазы из *H. erinaceum*. Для определения оптимального рН, была подготовлена серия буферов с рН от 3.6 до 5.6 на основе 200 мМ солей уксусной кислоты. Фермент (100 мкл) ин-

кубировали при 40°C 5 мин в 100 мкл буфера, как описано выше.

Для определения оптимальной температуры, реакционную смесь инкубировали при температуре от 4 до 100°C в течение 10 мин, после чего проводили измерение активности амилазы в растворе 200 мМ уксусной кислоты, рН 4.6, по выше описанной методике.

Действие ионов металлов. Раствор фермента (10 мкл) предварительно инкубировали при 40°C в течение 2 ч с 10 мкл раствора ионов металлов в концентрациях от 1.25 до 10 мМ после чего измеряли активность амилазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение амилазы из *H. erinaceum*. Активность амилазы *H. erinaceum* была обнаружена во фракции D3, которая десорбируется с колонки с ДЭАЭ-целлюлозой 10 мМ трис-НСI буфером, рН 7.4, содержащим 0.2 М NaCl (данные не представлены). На следующем этапе очистки на SP-сефарозе фракция SP2 с активностью амилазы была отделена от фракции SP3 с гемагглютинирующей активностью (рис. 1). Фракции SP2 на хроматограмме соответствовал острый пик, который был значительно больше двух других пиков SP3 и SP4, и все же гораздо меньше, чем основной пик SP1. Фракция была разделена FPLC на Superdex 75, получены 2 пика SU1 и SU2 (рис. 2). Амилазная активность была обнаружена только во фракции SU1. Таким образом, из 600 г плодовых тел было получено 147 мг фракции D3, 23 мг фракции SP2 и 10 мг фракции SU1.

Определение молекулярной массы амилазы *H. erinaceum*. Результаты электрофоретического исследования полученной фракции SU1 в ПААГ с ДДС представлены на рис. 3. Выделенная из *H. erinaceum* амилаза проявлялась в виде одной полоски белка, соответствующей молекулярной массе 55 кДа. Молекулярную массу выделенного фермента рассчитывали в соответствии со значениями R_F , используемых метчиков с 94 до 14 кДа. Очищенный белок показал одинаковую молекулярную массу, как при геле-фильтрации на Superdex 75, так и при электрофорезе в ПААГ с Na-ДДС, что указывало на то, что это мономерный белок. Его молекулярная масса близка к молекулярной массе лектина (51 кДа), выделенного и очищенного до гомогенного состояния из того же продуцента [6]. По сравнению с другими амилазами (табл. 1), молекулярная масса фермента из *H. erinaceum* была близка выделенным из *Chrysosporium asperatum* [13] и *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS [14] и значительно выше молекулярной массы амилазы, выделенной из *Bacillus cereus* MS6 [15] и *Bacillus cereus* [16].

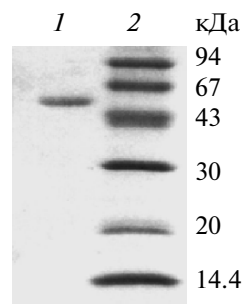


Рис. 3. ДДС-ПААГ-электрофорез выделенной амилазы из *H. erinaceum* (фракция SU1). 1 – очищенная амилаза *H. erinaceum*; 2 – белки-стандарты с разными молекулярными массами.

Анализ N-концевой последовательности амилазы из *H. erinaceum*. Определенная N-концевая аминокислотная последовательность амилазы из *H. erinaceum* (KNIGKKQIKLPYDAA) показала сходство с ферментом *Bacterioides thetaiotaomicron*, но гомологии с другими бактериальными, грибными и амилазами растений обнаружено не было [17].

Характеристики амилазы из *H. erinaceum*. *Влияние рН на активность амилазы из *H. erinaceum*.* Изучение влияния рН на активность фермента показало, что амилаза активна в диапазоне рН 3.6–5.6, активности не было обнаружено при щелочных значениях рН. Оптимальное значение рН для действия выделенного фермента было 4.6 (рис. 4а), что соответствует литературным данным, полученным для других грибов, например, таких, как *Scrytalidium thermopile* [18]. При значениях рН выше 4.6 активность постепенно снижалась, при рН 5.6 сохранялось только 34% от максимальной (рис. 4а).

*Влияние температуры на активность амилазы из *H. erinaceum*.* Ферментативная активность увеличивалась с ростом температуры от 4°C и достигала максимальной при 40°C (рис. 4б). Значительную активность 60–70% от максимальной наблюдали в интервале температур от 50–100°C (рис. 4б), что свидетельствовало об относительной термостабильности амилазы из *H. erinaceum*.

Таблица 1. Сравнение молекулярной массы амилазы из *H. erinaceum* и других микробных амилаз

Вид	Молекулярная масса, кДа	Ссылка
<i>H. erinaceum</i>	55	Настоящая работа
<i>Chrysosporium asperatum</i>	55	[13]
<i>Bacillus subtilis</i> KIBGE-HAS	56	[14]
<i>Bacillus cereus</i> MS6	27	[15]
<i>Bacillus cereus</i>	42	[16]

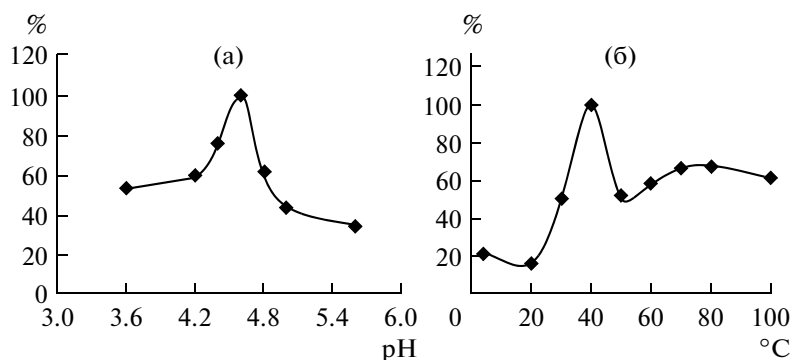


Рис. 4. Влияние pH (а) и температуры (б) на активности амилазы из *H. erinaceum*.

Ранее была изучена оптимальная температура для действия фермента других амилаз из различных грибов [19–21]. Оптимальные температуры находились в широком диапазоне в зависимости от степени адаптации штаммов к условиям окружающей среды. Активность амилазы из *Aspergillus niger* постепенно увеличивалась с повышением температуры от 20°C, достигая максимума при 60°C [19], для амилазы из *Aspergillus falvus* var. *columnaris* температурный оптимум – 35°C [20]. У термофильных видов, таких как *Thermomyces lanuginosus* [21], оптимальная температура для действия фермента была 50°C.

Влияние ионов металлов на активность амилазы из *H. erinaceum*. Большинство ионов одновалентных, двух- и трехвалентных хлоридов металлов, включая K⁺, Fe²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ и Al³⁺, не оказывали влияния на активность амилазы из *H. erinaceum* (табл. 2). С другой стороны, активность ферментов ингибировалась ионами Hg²⁺ в концентрации 5.0 и 10.0 мМ, в то время как

Таблица 2. Влияние ионов металлов на активность амилазы из *H. erinaceum*

Ион	Амилазная активность, %			
	10 мМ	5 мМ	2.5 мМ	1.25 мМ
Fe ²⁺	114	131	128	103
K ⁺	115	125	123	131
Ca ²⁺	95	121	138	122
Cd ²⁺	101	111	100	134
Cu ²⁺	113	147	119	129
Hg ²⁺	14	53	102	107
Mg ²⁺	120	127	97	91
Mn ²⁺	378	294	304	248
Pb ²⁺	151	109	103	111
Al ³⁺	109	133	109	133
Fe ³⁺	126	160	125	124

ионы Mn²⁺ и Fe³⁺ в концентрации 10.0, 5.0, 2.5 и 1.25 мМ увеличивали активность амилазы. Известно, что ионы металлов влияют на различные амилазы по-разному: амилаза из *Bacillus* sp. TS-23 в значительной степени ингибировалась ионами Hg²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ и ЭДТА, ионы Ni²⁺ и Cd²⁺ оказывали меньшее воздействие [22]. Выделенная из *Bacillus amyloliquefaciens* TSWK1-1 амилаза слабо ингибировалась ионами Mg²⁺ и Cu²⁺, значительно сильнее ионами Na⁺ и Fe²⁺ [23]. Большинство амилаз являются металлоферментами, которые нуждаются в ионах Ca²⁺ для проявления активности, структурной целостности и стабильности. В 2010 г. Мукерджи и др. [17] показали, что ионы тяжелых металлов Hg²⁺, Ag⁺ и Cd²⁺ ингибируют активность фермента из *Tinospora cordifolia*, в то время как присутствие ионов Ca²⁺ увеличивало активность и термостабильность фермента.

В литературе встречается только несколько упоминаний о присутствии амилазы у таких грибов, как *Leucoagaricus gonylophorus* [24], *Lentinus edodes* [25–26], *Agrocybe cylindracea*, *Corticium rolfsii* [27], *Schizophyllum commune* [28], *H. erinaceum* [29] и *Ganoderma lucidum* [30], однако активный фермент не был выделен и очищен до гомогенного состояния. Исключение составляет только фермент *Corticium rolfsii* [27].

Выделенная в настоящей работе амилаза из *H. erinaceum* обладала меньшей молекулярной массой по сравнению с ферментом из *C. rolfsii* (69–79 кДа), более низким температурным оптимумом (60°C), однако имела такой же pH-оптимум (pH 4.5) для действия фермента и также сорбировалась при хроматографии на ионообменной колонке ДЭАЭ-целлюлозой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального гранта Китая (2010CB732202).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee J.S., Hong E.K. // Cancer Lett. 2010. V. 297. № 2. P. 144–154.

2. Xu H., Wu P.R., Shen Z.Y., Chen X.D. // Int. J. Biol. Macromol. 2010. V. 47. № 1. P. 33–36.
3. Son C.G., Shin J.W., Cho J.H., Cho C.K., Yun C.H., Chung W., Han S.H. // Int. Immunopharmacol. 2006. V. 6. № 8. P. 1363–1369.
4. Yim M.H., Shin J.W., Son J.Y., Oh S.M., Han S.H., Cho J.H., Cho C.K., Yoo H.S., Lee Y.W., Son C.G. // Acta. Pharmacol. Sin. 2007. V. 28. № 6. P. 901–907.
5. Kawagishi H., Mori H., Uno A., Kimura A., Chiba S. // FEBS Lett. 1994. V. 340. № 1–2. P. 56–58.
6. Li Y., Zhang G., Ng T.B., Wang H. // J. Biomed. Biotechnol. 2010. 716515.
7. Wang H.X., Ng T.B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 322. № 1. P. 17–21.
8. Kenmoku H., Shimai T., Toyomasu T., Kato N., Sassa T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V. 66. № 3. P. 571–575.
9. Kuforiji O.O., Fasidi I.O. // Bioresour. Technol. 2008. V. 99. № 10. P. 4275–4278.
10. Laemmli U.K., Favre M.J. // Mol. Biol. 1973. V. 80. № 4. P. 575–599.
11. Lam S.S., Wang H., Ng T.B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. V. 253. № 1. P. 135–142.
12. Miller G.L. // Anal. Chem. 1959. V. 1. № 31. P. 426–429.
13. Sanghvi G.V., Koyani R., Rajput K.S. // J. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 21. № 5. P. 470–476.
14. Bano S., Ul, Qader S.A., Aman A., Syed M.N., Azhar A. // AAPS Pharm. SciTech. 2011. V. 12. № 1. P. 255–261.
15. Al-ZaZae M.M.A., Neelgund S., Gurumurthy D.M., Rajeshwara D.M. // Adv. Environ. Biol. 2011. V. 5. № 5. P. 992–999.
16. Annamalai N. // Indian J. Microbiol. 2011. V. 51. № 4. P. 424–429.
17. Mukherjee A., Ghosh A.K., Sengupta S. // Carbohydr. Res. 2010. V. 345. № 18. P. 2731–2735.
18. Aquino A.C., Jorge J.A., Terenzi H.F., Polizeli M.L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 61. № 4. P. 323–328.
19. Omemu A.M. // Afr. J. Biotechnol. 2005. V. 4. № 1. P. 19–25.
20. Ellaiah P., Srinivasulu B., Adinarayana K. // Process Biochem. 2002. V. 38. № 1. P. 615–620.
21. Kunamneni A., Permaul K., Singh S. // J. Biosci. Bioeng. 2005. V. 100. № 2. P. 168–171.
22. Lin L.L., Chyau C.C., Hsu W.H. // Biotechnol. Appl. Biochem. 1998. V. 28. № 1. P. 61–68.
23. Kikani B.A., Singh S.P. // Int. J. Biol. Macromol. 2011. V. 48. № 4. P. 676–681.
24. Silva A., Bacci M.Jr., Pagnocca F.C., Bueno O.C., Hebling M.J. // Curr. Microbiol. 2006. V. 53. № 1. P. 68–71.
25. Ko H.G., Park S.H., Kim S.H., Park H.G., Park W.M. // Folia Microbiol. 2005. V. 50. № 2. P. 103–106.
27. Nagasaka Y., Kurosawa K., Yokota A., Tomita F. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 50. № 3. P. 323–330.
28. Reyes F., Lahoz R., Vazquez C. // Can. J. Microbiol. 1980. V. 26. № 9. P. 1120–1125.
29. Han J. // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 80. № 1. P. 61–66.
30. Han J.R., An C.H., Yuan J.M. // J. Appl. Microbiol. 2005. V. 99. № 4. P. 910–915.

An Amylase from Fresh Fruiting Bodies of the Monkey Head Mushroom *Herichium Erinaceum*

F. Du^a, H. X. Wang^a, and T. B. Ng^b

^a State Key Laboratory for Agrobiotechnology and Department of Microbiology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

^b Faculty of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, New Territories, Hong Kong, China

e-mail: hxwang@cau.edu.cn; b021770@mailserv.cuhk.edu.hk

Received March 29, 2012

Abstract—An amylase with a molecular mass of 55 kDa and an N-terminal sequence exhibiting similarity to enzyme from *Bacteroides thetaiotaomicron* was isolated from fruiting bodies of the monkey head mushroom *Herichium erinaceum*. The purification scheme included extraction with distilled water, ion exchange chromatography on DEAE-cellulose and SP-sepharose, and gel filtration by FPLC on Superdex 75. The amylase of *H. erinaceum* was adsorbed on DEAE-cellulose in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and eluted with 0.2 M NaCl in the same buffer. The enzyme was subsequently adsorbed on SP-Sepharese in 10 mM ammonium acetate buffer (pH 4.5) and eluted with 0.3 M NaCl in the same buffer. This fraction was subsequently subjected to gel filtration on Superdex 75. The first peak eluted had a molecular mass of 55 kDa in SDS-PAGE. The amylase of *H. erinaceum* exhibited a pH optimum of 4.6 and a temperature optimum of 40°C. The enzyme activity was enhanced by Mn²⁺ and Fe³⁺ ions, but inhibited by Hg²⁺ ions.