

# КУЛЬТУРЫ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *IRPEx LACTEUS* FR. КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ФЕРМЕНТОВ СЫЧУЖНОГО ДЕЙСТВИЯ

С.М. Бойко, И.Н. Иванов

Донецкий национальный университет, г. Донецк, Украина

E-mail: bsm73@ukr.net

Современное использование высших базидиальных грибов включает производство аминокислот, сыров, ферментов, ферментированной пищи, ароматизаторов, лекарств, гербицидов, органических кислот, пестицидов, противораковых средств, белка, витаминов, и биоразрушение отходов.

Высокий уровень инструментального оснащения способствовал формированию и развитию экспериментальной микологии с использованием в качестве основных объектов микромицетов, а в последние годы и макромицетов (Даниляк, Семичаевский, Дудченко и др, 1989).

Биосинтез протеиназ базидиальными макромицетами является недостаточно изученной областью микологии. Ряд физиологических и биологических особенностей данной группы организмов обуславливает скрининг протеиназ пищевого и медицинского назначения, а именно: наличие большого числа съедобных грибов, способность расти в условиях поверхностного и глубинного культивирования, отсутствие спороношений в стадии вегетативного роста, что уменьшает опасность профессионального заболевания людей.

Острый дефицит ферментов сычужного действия стимулирует исследования по поиску новых продуцентов протеиназ среди животных, растений, микроорганизмов и грибов.

На современном этапе существуют различные способы производства и получения ферментов сычужного действия. Сычужный препарат животного происхождения получают из желудка молочных жвачных животных, из альтернативных источников можно отметить использование желудка морского тюленя (Kazi, Norman, 1985), а также внутренностей карповых рыб (Стекольников, Рыльцев, Кутукова, 1994). Сычужные препараты были получены из *Mucor pusillus*, *Mucor michei*, *Rhizopus rugmanes*, *Rhizomucor pussillus* (Антипова, Жеребцов, 1984). Как показывают литературные данные, степень изученности микромицетов как продуцентов заменителя дефицитного фермента реннина, значительно превосходит степень изученности высших базидиальных грибов.

Высшие базидиомицеты, как показали исследования, способны синтезировать ферменты, активность которых ни в чем не уступает "сычужным" ферментам, полученным из микромицетов и животных, а даже и превышает их (Бойко, Негруцкий, Мирошниченко и др., 1985).

Ферменты молокосвертывающего действия из *Irpex lacteus* признаны наиболее близкими к животному реннину по характеру действия (Kobayashi H., Kusakabe, 1985).

Целью нашей работы было изучение биологических особенностей штаммов гриба *Irpex lacteus* Fr. для обоснования перспективности использования его в качестве продуцента протеиназ молокосвертывающего действия.

Первоначальными объектами служила 21 культура гриба *I. lacteus*, что произрастали на территории Донецкой области. В ходе предварительных исследований была отобрана культура БН-3 *I. lacteus* как наиболее перспективная в плане синтеза протеиназ молокосвертывающего действия (хранится в специализированной коллекции культур Института ботаники им. Холодного НАН Украины, г. Киев).

Изучение молокосвертывающей активности (МСА) в культуральном фильтрате (КФ) и ферментного препарата осуществляли с помощью метода Каваи и Мукаи. Метод основан на определении времени, за которое происходит свертывание молока. Субстратом служило свежее натуральное молоко с добавлением 1 мл 15 % раствора  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  на каждые 100 мл молока. Кислотность субстрата доводили до 6,00 - 6,05 при помощи 10 %-го раствора  $\text{HCl}$ .

Для данного штамма подобраны оптимальные условия культивирования (температура - 37°C, pH – 3,50) при которых общая молокосвертывающая активность культурального фильтрата составляла 600 ед/мл, а удельная 186 ед/мг. Исследование условий культивирования позволило установить, что в погруженной культуре штамм БН-3 более активно синтезировал данные протеиназы, чем при поверхностном культивировании. Общая молокосвертывающая активность возростала до 965 ед/мл. Параллельное исследование казеиназной активности показало значение 0,62 ед/мл.

Для проведения более тщательных исследований фермента, нам необходимо было его очистить. Мы использовали метод фракционирования белков из культурального фильтрата сернокислым аммонием. Применяя метод диализа и последующую лиофильную сушку получили 40%, 60%, 80% и 100% фракции белков в сухом виде. Тестирование полученных фракций белков на молокосвертывающую активность позволило установить, что максимальный уровень активности наблюдался у фракции белков которая осаждалась при 80% насыщении культурального фильтрата сернокислым аммонием. Общая молокосвертывающая активность составила 1200000ед/г препарата, а удельная 1463 ед/мг белка.

Качественный аминокислотный состав фракции белков, полученной при 80 % насыщении культуральной жидкости сернокислым аммонием проводили с помощью метода распределительной хроматографии. В качестве контроля служил свиной ферментный препарат применяемый в промышленных условиях. Ферментные препараты как грибного так и животного происхождения показали наличие следующих аминокислот: цистин, лизин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аланин, пролин, тирозин, валин, фенилаланин, лейцин. В больших концентрациях находились аспарагиновая и глутаминовая кислоты, пролин, лейцин. Это является подтверждением того, что полученный препарат грибного происхождения, как и животный, относится к кислым протеиназам.

На основе проделанной работы штамм БН-3 *Irpex lacteus* можно рекомендовать как перспективный биотехнологический объект с целью получения протеиназ молокосвертывающего действия.