

УДК 637.136 (144).5

ВПЛИВ ВИСОКИХ ТА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ВИХІД ПРОТЕЇНАЗ МОЛОКОЗСІДАЛЬНОЇ ДІЇ У ГРИБА *IRPEX LACTEUS* FR.

© 2008 р. І. А. Кузнецова

Донецький національний університет
(Донецьк, Україна)

Вивчався вплив високих та низьких температур на молокозсідальну активність штамів *Irpex lacteus*. За умов поверхневого культивування встановлено, що штам А-Дон-02 та В-04 більш чутливі до заморожування, ніж до прогрівання. Штам Р-04 був більш активним після заморожування, ніж після прогрівання. Особливості реакції штамів *Irpex lacteus* на низькі та високі температури необхідно врахувати при їх культивуванні з метою одержання ферментних препаратів.

Ключові слова: *штами Irpex lacteus* Fr., *молокозсідальна активність, температура, протеїнази*

Дефіцит сичужного ферменту в багатьох країнах світу стимулював вчених до пошуку нових його джерел. Сичужні ферментні препарати, одержані із культуральної рідини відповідних базидіоміцетів, за своєю активністю не поступаються традиційним ферментативним препаратам тваринного походження [2, 3, 8-11]. Тому пошук нових продуцентів білка та різних біологічно активних речовин серед базидіальних грибів і розробка наукових основ їхнього культивування є актуальними завданнями біотехнології. Одним із перспективних продуцентів протеїназ молокозсідальної дії є гриб *Irpex lacteus* Fr. [3, 11].

Нині відомі різні способи збільшення виходу молокозсідального ферменту: оптимізація умов та способу культивування [2], внесення до живильного середовища різних індукторів тощо [3, 8]. Так, підвищення виходу молокозсідального ферменту гриба *Hirschioporus laricinus* забезпечувалося внесенням до живильного середовища органічного індуктора - молочної сироватки [8], при культивуванні гриба *Irpex lacteus* – натурального молока [3]; для збільшення виходу лаккази гриба *Panus tigrinus* в живильне середовище вносили 2,4-диметилфенол та CuSO_4 [14].

В літературі є відомості про те, що дія низьких плюсових (+2...+5°C) і високих (+40...+45°C) температур на міцелій *Hirschioporus laricinus* протягом двох годин викликала підвищення молокозсідальної активності культуральної рідини цього гриба [8]. Слід зазначити, що це питання вивчене слабо і лише на незначній кількості штамів гриба *H. laricinus*. Тому не виключено, що короткотривала дія підвищених або понижених температур може помітно впливати на вихід протеїназ молокозсідальної дії при культивуванні гриба *I. lacteus*.

Метою дослідження було визначення короткотривалого впливу підвищених (+40...+50°C), низьких позитивних (+5°C) та від'ємних (-5°C) температур на міцелій *I. lacteus* як можливого фактора збільшення виходу екзопротеїназ молокозсідальної дії у культуральну рідину (КР).

МЕТОДИКА

Гриб *I. lacteus* вирощували за оптимальної температури та рН (штам Р-04-30°C, рН 3,5; штам Ч-03 - 28°C, рН 3,5; штам А-Дон-02 - 32°C, рН 3,12; штам В-04 - 35°C, рН 4,06) на глюкозо-пептонному живильному середовищі (ЖС) [7] в колбах Ерленмейера. Стерильне ЖС інокулювали 10-добовим міцелієм (шматочками розміром 5×5 мм) досліджуваних штамів. Гриби вирощували поверхневим способом про-

Адреса для кореспонденції: Кузнецова Ірина Анатоліївна, біофак Донецького національного університету, вул. Щорса, 46, м. Донецьк, 83050, Україна

ВПЛИВ ВИСОКИХ ТА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

тягом 10-ти (Р-04 і В-04) та 15-ти (А-Дон-02 і Ч-03) діб – час найвищої активності молокозсідальних протеїназ.

В експериментах оцінювали однощоденний вплив від'ємної (-5°C в морозильній камері), низької позитивної (+5°C в холодильній камері) і підвищених температур (+40 та +50°C в термостаті ТС-80М) на вихід екзопротеїназ молокозсідальної дії у штамів *I. lacteus*. Контролем були штами *I. lacteus*, які знаходились в термостатах з оптимальними температурними умовами (+28, +30, +32, +35°C).

Реєстрацію виходу екзопротеїназ молокозсідальної дії здійснювали шляхом визначення їх активності методом Каваї та Мукаї [1] з використанням формули:

$$МЗА_{КР} = \frac{40 \times 100 \times \dot{E}}{\dot{I}} \text{ (од./мл)},$$

де 40 - середній час зсідання молока (в хвиликах) при виробництві сиру; K – коефіцієнт розведення КР; P – час (в хвиликах), протягом якого із 100 мл молока при додаванні 1 мл КР утворюється щільний згусток.

Вміст білка визначали спектрофотометричним методом [5], розраховуючи його за формулою:

$$C_b = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260},$$

де C_b – концентрація білка, мг/мл; A_{280} та A_{260} – оптична густина, виміряна при довжині хвилі 280 та 260 нм відповідно [12].

Питому молокозсідальну активність (МЗА) культуральної рідини штамів *I. lacteus* визначали за формулою:

$$МЗА_{шт} = \frac{МЗА_{КР}}{C_b} \text{ (од./мг)},$$

де $МЗА_{шт}$ – молокозсідальна активність КР (од/мл); C_b – концентрація білка в 1 мл КР (мг/мл) [1].

Протеолітичну активність визначали за здатністю ферменту викликати гідроліз казеїну (субстрат) з утворенням продуктів, що не осаджуються трихлороцтовою кислотою (ТХО) та мають оптичну густина при 280 нм, що відповідає оптичній густині 1 мкг/мл тирозина. Реєстрацію результатів здійснювали за допомогою методу спектрофотометрії. Для визначення тирозинового еквівалента використовували калібрувальний графік, побудований для різних

розведень тирозину. Ферментативну активність розраховували за формулою:

$$ПА = \frac{A_{280} \times 3}{\dot{N}L \times 10} \text{ (од./мл)},$$

де $ПА$ – протеолітична активність в одиницях на 1мл КР; A_{280} – оптична густина, виміряна на спектрофотометрі при 280 нм; 3 – загальний об'єм реакційної суміші після додавання ТХО до КР; TE – тирозиновий еквівалент, знайдений за допомогою калібрувальної кривої; 10 – час гідролізу субстрату, в хвиликах [6].

Дослід проводили у триразовій повторності. Статистичну обробку здійснювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу. Порівняння із контролем проводили за методом Даннета [13].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Короткотривале прогрівання міцелію при 40°C вірогідно не впливало на МЗА штамів Р-04 та В-04 і знизило МЗА штамів Ч-03 та А-02 на 8% (таблиця). Прогрівання міцелію *I. lacteus* при 50°C призвело до зниження МЗА досліджених культур в 2-4 рази порівняно із контрольним варіантом.

Після годинного прогрівання міцелію при 40°C загальний вміст білка в КР штамів Р-04, Ч-03 та В-04 зменшився на 20-34%, а в КР штама А-Дон-02 підвищився більш, ніж у два рази. Зниження концентрації білка в КР, можливо, пов'язане із його частковим гідролізом, а підвищення - з виходом із клітин міцелію екзобілкових іншої функціональної специфічності. За годину нагрівання при температурі 50°C концентрація білка в КР штамів Ч-03, А-Дон-02 та В-04 достовірно підвищувалась, а у штаму Р-04 - знижувалась в 1,4 рази. Після впливу температури 40°C питома МЗА у штамів Р-04, В-04 і Ч-03 дещо зростала. Це пов'язане зі зменшенням концентрації білка у відповідних культуральних рідинах після прогрівання. Штам А-Дон-02 реагував на дію температури 40°C зниженням питомої МЗА. Після дії температури 50°C питома МЗА знижувалась у варіантах з усіма чотирма досліджуваними штамами (таблиця).

Дія низької позитивної температури (+5°C) на міцелій штамів Ч-03 та В-04 вірогідно не змінила активності молокозсідальних протеїназ, а у штамів Р-04 та А-Дон-02 призвела до зниження МЗА на 16-26% порівняно з контролем.

КУЗНЕЦОВА

Ферментативна активність та концентрація білка в культуральній рідині штамів *Irpex lacteus* після короткотривалої дії високих та низьких температур

Штами	Прогрівання протягом 1 год при		Температурний оптимум	Охолодження протягом 1 год при	
	+50 ⁰ С	+40 ⁰ С	+28...+35 ⁰ С (контроль)	+5 ⁰ С	-5 ⁰ С
МЗА, од./мл					
Р-04	78,65±2,25	166,97±0,00	167,86±0,96	141,54±2,25	188,08±0,58
Ч-03	33,49±2,47	108,08±1,25	122,07±3,24	127,14±0,02	121,82±1,14
А-Дон-02	41,57±1,65	103,99±0,93	125,99±2,25	93,69±2,45	43,78±0,85
В-04	89,92±3,67	160,96±0,00	160,96±0,00	160,29±1,11	110,60±0,06
Концентрація білка в КР, мг/мл					
Р-04	1,16±0,05	1,24±0,02	1,67±0,01	1,17±0,00	2,00±0,00
Ч-03	6,89±0,12	1,66±0,02	2,07±0,02	0,38±0,00	1,64±0,04
А-Дон-02	3,51±0,01	6,60±0,00	3,17±0,04	4,17±0,03	5,50±0,00
В-04	5,55±0,00	2,43±0,03	3,67±0,14	3,83±0,05	3,00±0,00
Питома МЗА, од./мг білка					
Р-04	67,78±0,80	134,66±0,25	100,51±1,10	120,72±1,25	94,04±6,32
Ч-03	4,87±0,25	65,11±1,10	58,97±0,12	334,58±2,35	74,28±0,08
А-Дон-02	11,81±0,01	15,76±0,45	39,74±0,11	22,47±0,00	7,96±0,06
В-04	16,20±0,01	66,24±0,08	43,86±0,56	41,85±0,25	36,87±0,08
Протеолітична активність, од./мл					
Р-04	0,22±0,01	0,16±0,02	0,16±0,02	0,17±0,00	0,16±0,02
Ч-03	0,29±0,02	0,15±0,01	0,14±0,01	0,13±0,01	0,15±0,01
А-Дон-02	0,32±0,04	0,24±0,01	0,21±0,01	0,22±0,01	0,29±0,01
В-04	0,24±0,01	0,18±0,01	0,19±0,03	0,19±0,00	0,19±0,00

Заморожування міцелію (-5⁰С) штаму Р-04 протягом години викликало достовірне підвищення вмісту білка на 19%, а МЗА – на 12% і вірогідно не змінювало активності молокозсідальних протеїназ штаму Ч-03. Після впливу температури -5⁰С на культуральну рідину штамів В-04 та А-Дон-02 молокозсідальна активність знижувалася в 1,5-2,8 раза порівняно з контролем. Короткотривалий вплив низької позитивної температури (+5⁰С) на міцелій культур В-04 не викликав збільшення концентрації білка і питомої МЗА. В культуральній рідині штамів Р-04 та Ч-03 концентрація білка в процесі охолодження (+5⁰С) знижувалася, а питома МЗА достовірно підвищувалася. Вміст білка в КР штаму А-Дон-02 після охолодження (+5⁰С) та проморожування (-5⁰С) міцелію підвищився, а питома МЗА знижувалася. Після проморожування та відтаювання культуральної рідини штаму Р-04 її питома МЗА вірогідно не змінювалась, однак рівень білка підвищився. Таке підвищення концентрації білка в КР та зниження її питомої МЗА ще раз може свідчити про те, що відбулося виділення в КР білків з іншими функціями. В КР штамів Ч-03 та В-04 рівень білка після заморожування зменшився, однак в першому випадку його молокозсідальні властивості зросли, в другому – зменшилися.

Вплив температури 40⁰С істотно не змінював загальну протеолітичну активність. Після короткотривалої дії температури 50⁰С на міцелій штамів *I. lacteus* відбулося незначне підвищення загальної протеолітичної активності. При цьому, як уже зазначалося, відбувалося суттєве зниження МЗА культуральної рідини, порівняно із контрольними варіантами. Співвідношення МЗА/ПА за оптимальної температури становило для штаму Р-04 – 1049:1, для штаму Ч-03 – 872:1, для штаму А-Дон-02 – 600:1, для штаму В-04 – 847:1. Це співвідношення для телячого сичужного ферменту становить 500-1000:1, для сичужного ферменту із *Mucor* – близько 300:1, із *Endothea parasitica* – 80:1. Дані ферментні препарати в країнах Західної Європи використовуються для виготовлення твердих сичужних сирів після відповідної модифікації технологічного процесу [12]. Високі співвідношення МЗА/ПА в штамів *I. lacteus* свідчать про перспективність цих штамів для біотехнологічних досліджень [6], але за умов оптимальних температур. У варіантах з прогріванням міцелію штамів при +50⁰С протягом години співвідношення МЗА/ПА достовірно знизилося порівняно з контрольними варіантами до 358:1 (для штаму Р-04), 116:1 (для штаму Ч-03), 130:1 (для штаму А-Дон-02), 375:1 (для штаму В-04). Це свідчить про те, що

ВПЛИВ ВИСОКИХ ТА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

такі співвідношення знаходяться на рівні сичужних ферментів із *Mucor* та *E. parasitica*, вироблених за оптимальних умов.

Охолодження і проморожування достовірно не змінювало загальну протеолітичну активність штамів.

Таким чином, короткотривале прогрівання, охолодження або заморожування міцелію штамів *I. lacteus* викликало в них різну фізіолого-біохімічну реакцію. Так, штам А-Дон-02 чутливо реагував як на заморожування, так і на прогрівання, що виявлялося у зниженні МЗА культуральної рідини. Нетривале охолодження або заморожування культуральної рідини та міцелію штаму Ч-03 вірогідного впливу на активність молокозсідальних протеїназ не чинило, однак прогрівання призвело до зниження МЗА культур. Вірогідних змін в МЗА штаму В-04 як після охолодження (+5°C), так і після прогрівання (+40°C) не встановлено. Короткотривале проморожування штаму Р-04 викликало підвищення МЗА його КР. Так, лише для штаму Р-04 з метою підвищення МЗА можна застосовувати такий прийом, як короткотривале проморожування міцелію. Такі особливості штамів необхідно враховувати при доборі умов їх культивування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Белки, ферменты и стерилы базидиальных грибов. Методы исследования. – Л.: Наука, 1979. – С. 28-29.
2. Бойко М.И. Физиолого-биохимические особенности системы *Pinus sylvestris* L. – *Heterobasidium annosum* (Fr.) Bref и перспективы практического использования экзометаболических некоторых дереворазрушающих грибов. – Дис. ... докт. биол. наук. – Донецк, 1996. – 391 с.
3. Бойко С.М. Биологические особенности штаммов *Irpex lacteus* Fr. - продуцентов протеиназ молокозвертывающего действия: Дис. ... канд. биол. наук. – Донецк, 2002. – 198 с.
4. Колесникова С.С. Ферменты для коагуляции молока в сыроделии // Молочное дело. – 2006. – №8. – С. 50-52.
5. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высш. школа, 1980. – 272 с.
6. Методы экспериментальной микологии. Справочник /Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др.– Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.
7. Низковская О.П., Федорова Л.Н., Дроздова Т.Н. Протеолитическая активность базидиомицетов из порядка *Aphyllphorales*. II. Казеиназа // Микология и фитопатология. – 1979. – Т. 13, вып. 3. – С. 217-220.
8. Никитина О.А. Регуляция активности экзопро-теиназ молокозвертывающего действия штаммов *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Ryv: Дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1998. – 152 с.
9. Пат. 6228, Україна, МКИ³ 5 C12N 15/00, C12N 9/58, C12R 1:645. Штам *Hirschioporus laricinus* M-81 (Karst.) Ryv. – продуцент молокозсідального ферменту / Бойко М. І., Негруцький С. Ф., Мирошниченко Т. В., Соболев М. А., Варенко Ю. С. – Заяв. 18.05.84; Опуб. 24.12.94, Бюл. №8-І.
10. Пат. 34553, Україна, C12N 9/50, A23C 19/032. Штам соматичних культур макроміцета *Tyromices revolutus* (Bres.) Bond. et Sing. – продуцент молокозсідального ферменту / Федотов О.В., Бойко М.І., Негруцький С.Ф. – Заяв. 18.02.1998; Опубл. 15.03.2001, Бюл. №2.
11. Пат. 64154 Україна, МКИ³ C12N 9/50, A23C 19/032. - Штам соматичних культур макроміцета *Irpex lacteus* Fr. БН-3 – продуцент молокозсідального ферменту / Бойко С.М., Бойко М.І., Іванов І.М. – 2003021395, Заявл. 17.02.2003; Опубл. 16.02.2004. – Бюл. №2.
12. Практическая химия белка. Пер. с англ. /Под ред. А. Дабре. – М.: Мир, 1989. – С. 300-301.
13. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. – Донецьк: Кассіопея, 1999. – 210 с.
14. Черных А.М., Леонтьевский А.А., Головлева Л.А. Новые приемы повышения выхода лакказы гриба *Ranus tigrinus* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, №5. – С. 578-581.

Надійшла до редакції
13.09.2006 р.

КУЗНЕЦОВА

**THE INFLUENCE OF HIGH AND LOW TEMPERATURES
ON MILK COAGULATING PROTEINASES EXIT IN STRAINS
OF *IRPEX LACTEUS* FR.**

I. A. Kuznetsova

*Donetsk National University
(Donetsk, Ukraine)*

The influence of high and low temperatures on the activity of milk coagulating proteinases of *Irpex lacteus* Fr. strains was investigated. We have established the strain A-Don-02 and V-04 were more sensitive for freezing then for warming up. It was expressed in lowering milk coagulating activity of culture liquid. The strain R-04 was more active after freezing, than after warming up. The features of reaction of *Irpex lacteus* strains on high and low temperatures must be taken into account at their cultivation with the purpose of receipt of enzymic preparations.

Key words: *strains of Irpex lacteus Fr., milk coagulate activity, temperature, proteinases*

**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ И НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР
НА ВЫХОД ПРОТЕИНАЗ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
У ГРИБА *IRPEX LACTEUS* FR.**

И. А. Кузнецова

*Донецкий национальный университет
(Донецк, Украина)*

Изучалось влияние высоких и низких температур на молокосвертывающую активность штаммов *Irpex lacteus* Fr. В условиях поверхностного культивирования было установлено, что штаммы А-02 та В-04 более чувствительны к промораживанию, чем к прогреванию. Штамм Р-04 был более активным после промораживания, чем после прогревания. Особенности реакции штаммов *Irpex lacteus* на низкие и высокие температуры необходимо учитывать при их культивировании с целью получения ферментных препаратов.

Ключевые слова: *штаммы Irpex lacteus Fr., молокосвертывающая активность, температура, протеиназы*