

УДК 582.284 : 577.151.52

© О. В. Чемерис, Ю. Г. Купцова, М. И. Бойко

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДНОГО ПИТАНИЯ НА СИНТЕЗ ПРОТЕИНАЗ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ШТАММАМИ ГРИБА *IRPEX LACTEUS*

ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»

283050, г. Донецк, ул. Щорса, 46; e-mail: chemeris07@rambler.ru

**Чемерис О. В., Купцова Ю. Г., Бойко М. И.** Влияние различных источников углеродного питания на синтез протеиназ молокосвертывающего действия штаммами гриба *Irpex lacteus*. – Исследовано влияние пяти источников углеродного питания на синтез экзопротеиназ молокосвертывающего действия двумя штаммами *Irpex lacteus* 2421 и 2424. Установлено, что для штамма *I. lacteus* 2421 оптимальным источником углерода является глюкоза и фруктоза, а для штамма *I. lacteus* 2424 – глюкоза.

**Ключевые слова:** базидиомицет *Irpex lacteus*, молокосвертывающая (сычужная) активность, оптимизация состава питательной среды, углеродное питание.

### Введение

Базидиальные грибы – перспективные объекты биотехнологии. Это обусловлено их способностью синтезировать внеклеточные ферменты, характеризующиеся высокой активностью и стабильностью. По количеству и производительности энзимов их можно поставить на одну ступень с микроорганизмами, которые применяются в различных отраслях промышленности [3]. Оптимизация биотехнологических условий культивирования позволяет интенсифицировать процесс синтеза ферментов мицелиальными грибами. Наличие в среде источника питания, создание оптимальной температуры, влажности, реакции среды определяют синтетическую активность продуцентов [1, 14, 15].

Ведутся активные научные работы по поиску лучших компонентов питательных сред, которые также имеют влияние на синтез ферментов, улучшая или ухудшая, ускоряя или замедляя, или, даже, и вовсе прекращая их выработку. При выращивании штаммов гриба *Lentinus edodes* оптимальным источником углеродного питания являлась лактоза, а использование маннозы приводило к значительному снижению ферментативной активности [14]. Для культивирования штамма Б-263 М-81 *Hirschioporus laricinus* с целью получения протеиназ молокосвертывающего действия необходимо использовать глюкозу, фруктозу, крахмал ксилозу и мальтозу, а для накопления биомассы – ксилозу, фруктозу, глюкозу и мальтозу [6]. Установлено, что при изучении динамики молокосвертывающей активности некоторых штаммов гриба *Irpex lacteus* лучшим источником углеродного питания является глюкоза, а также крахмал и ксилоза [5]. Для роста гриба *Hirschioporus abietinus* наилучшими источниками углеродного питания оказались маннит, сахароза, мальтоза, сорбит, ксилоза. Слабое влияние на рост гриба оказывают инулин, галактоза, лактоза [7]. Культура *Aspergillus awamori*, которая является активным продуцентом протеолитических ферментов молокосвертывающего действия, более активно синтезирует соответствующие метаболиты при использовании в качестве источника азота казеина, а углерода – крахмала [4].

Важной задачей является подбор оптимальных источников углеродного питания для каждого из исследуемых штаммов грибов [12, 18]. Эти показатели являются строго индивидуальными и влияют не только на физиологические показатели, но и на синтез соответствующих метаболитов. В связи с этим был проведен поиск оптимального углеродного компонента питательной среды для культивирования штаммов *Irpex lacteus* 2421 и 2424 – продуцентов ферментов молокосвертывающего действия.

### Материал и методы исследования

Для исследования молокосвертывающей активности (МСА) культуральной жидкости (КЖ) штаммы *I. lacteus* 2421 и 2424 культивировали глубинным способом в статических условиях на жидкой глюкозо-пептонной питательной среде [13] следующего состава (г/л):

глюкоза – 10, пептон – 3,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5,  $KH_2PO_4$  – 0,6,  $K_2HPO_4$  – 0,4,  $CaCl_2$  – 0,05,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,001 (реактивы фирмы «Реахим», Россия). Источник углерода – глюкозу заменяли фруктозой, сахарозой, галактозой и мальтозой в количестве эквивалентном содержанию углерода глюкозы в питательной среде. Кислотность питательной среды доводили до значения pH 4,5 с помощью 10%-го раствора HCl. Культивирование штаммов осуществляли при температуре 32°C, оптимальной для роста. Определение молокосвертывающей активности культуральной жидкости проводили через каждые 5 суток, начиная с 5-х по 25-е сутки культивирования по методу Kawai и Mukai [17]. За единицу молокосвертывающей активности принимали такое количество фермента, которое створаживает 100 мл молока за 40 минут при 35°C. Полученные значения переводили в условные единицы согласно формуле [2, 11].

Содержание белка в культуральной жидкости определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО) [8], используя формулу Лайне [19]. Накопление абсолютно сухой биомассы определяли весовым методом [9]. pH культуральной жидкости измеряли с помощью анализатора ионов AI-123 (ДЕСМК, Украина).

Все исследования проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку полученных данных осуществляли дисперсионным анализом, а сравнение средних арифметических величин – по критерию Дункана [10].

### Результаты и обсуждение

В результате исследований было установлено, что штаммы *I. lacteus* 2421 и 2424 способны к синтезу экзофермента молокосвертывающего действия при культивировании на питательных средах с разными источниками углерода (рис. 1). На 5-е сутки культивирования штамма 2421 на питательных средах, содержащих в качестве источника углеродного питания фруктозу, сахарозу и мальтозу, наблюдалась высокая МСА КЖ, превышающая значения ферментативной активности КЖ при использовании глюкозы и галактозы. Значения МСА культуральной жидкости на питательной среде с фруктозой были наибольшими в период с 5-х по 15-е сутки культивирования. Причем значения молокосвертывающей активности культуральной жидкости в пределах 145-150 Е/мл находились на уровне ферментативной активности штамма 2421 на 15-е сутки культивирования на среде с глюкозой.

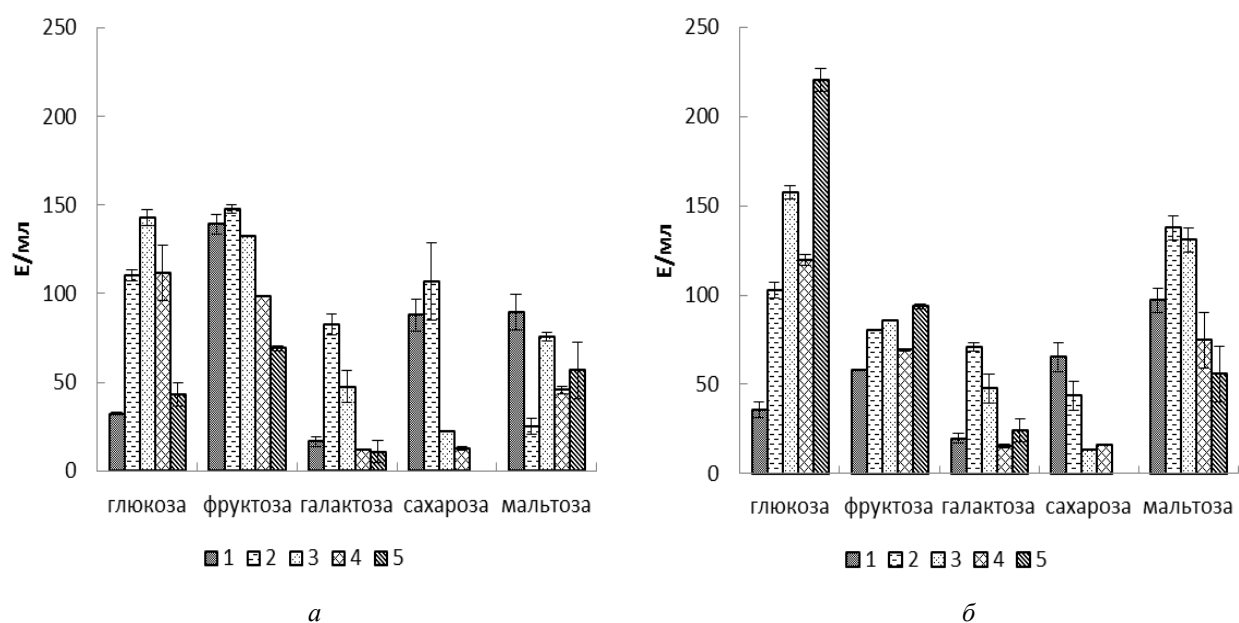


Рис. 1. Молокосвертывающая активность культуральной жидкости штаммов *Irepex lacteus* 2421 (а) и 2424 (б) при культивировании на питательных средах с разными источниками углерода: 1 – 5 сутки, 2 – 10 сутки, 3 – 15 сутки, 4 – 20 сутки, 5 – 25 сутки

Молокосвертывающая активность штамма *I. lacteus* 2421 при культивировании на питательных средах, содержащих в качестве источника углерода галактозу, мальтозу и сахарозу, была ниже по сравнению с глюкозой и фруктозой. Так, при использовании галактозы и сахарозы максимальная МСА культуральной жидкости штамма 2421 отмечена на 10-е сутки. Значения ферментативной активности КЖ составляли 82 и 107 Е/мл соответственно. В случае использования мальтозы максимальные значения МСА КЖ зарегистрированы на 5-е и 15-е сутки культивирования. Молокосвертывающая активность культуральной жидкости штамма *I. lacteus* 2421 на 20-е и 25-е сутки значительно снижалась по всем вариантам питательных сред.

При культивировании штамма *I. lacteus* 2424 на питательной среде с глюкозой отмечена максимальная молокосвертывающая активность культуральной жидкости – 160 Е/мл на 15-е сутки и 225 Е/мл на 25-е сутки (см. рис. 1, б). При культивировании штамма *I. lacteus* 2424 на питательных средах с галактозой и сахарозой молокосвертывающая активность культуральной жидкости была минимальна. Причем со временем культивирования ферментативная активность КЖ значительно снижалась. Полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии галактозы и мальтозы на синтез экзоферментов молокосвертывающего действия штаммом *I. lacteus* 2424.

При культивировании штамма *I. lacteus* 2424 на питательной среде, содержащей мальтозу, молокосвертывающая активность культуральной жидкости на 10-е сутки находилась на уровне 137 Е/мл и была стабильной до 15-х суток. Полученные данные превышают значения молокосвертывающей активности культуральной жидкости на 10-е сутки культивирования штамма 2424 на питательной среде с глюкозой в качестве источника углеродного питания. Это может указывать на возможность использования мальтозы в качестве альтернативного источника углеродного питания для культивирования данного штамма. Однако необходимо оптимизировать состав компонентов питательной среды по отношению С : N и микроэлементам.

На рис. 2 представлено изменение содержания белка в культуральной жидкости исследуемых штаммов *I. lacteus* при культивировании на питательных средах с разными источниками углерода.

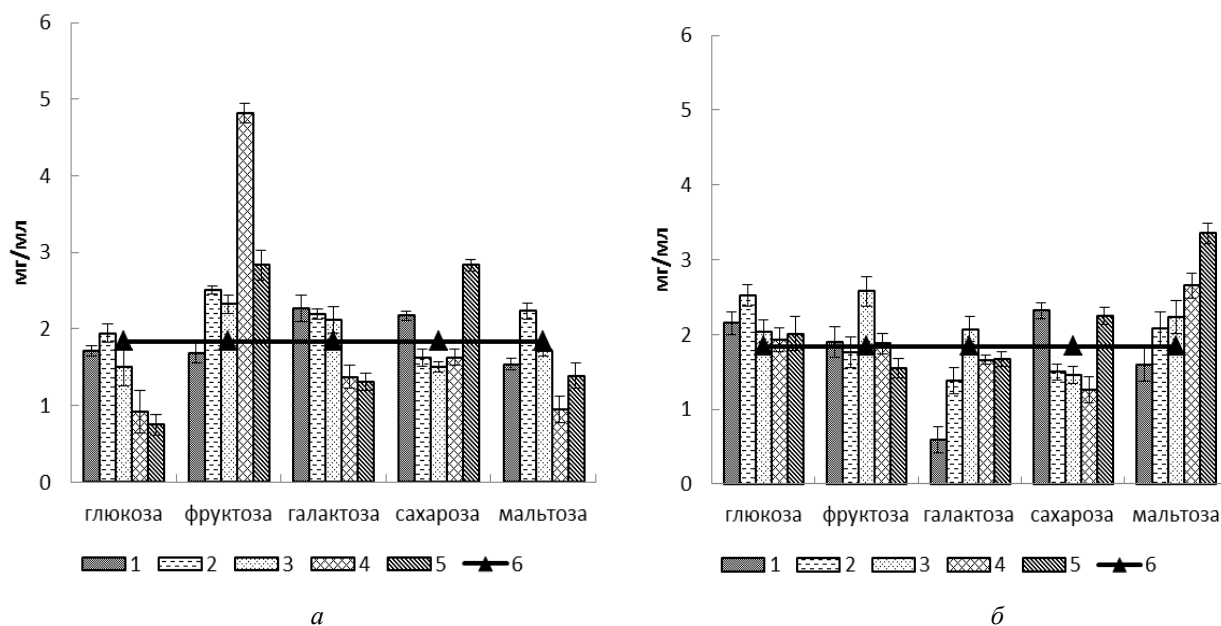


Рис. 2. Содержание белка в культуральной жидкости штаммов *Irpex lacteus* 2421 (а) и 2424 (б) при культивировании на питательных средах с разными источниками углерода: 1 – 5 сутки, 2 – 10 сутки, 3 – 15 сутки, 4 – 20 сутки, 5 – 25 сутки, 6 - контроль

Нужно отметить, что каждый штамм проявил индивидуальную изменчивость по данному показателю. Так, установлено, что при культивировании штамма *I. lacteus* 2421 на питательной среде с глюкозой содержание белка было на уровне контроля (исходное содержание белка в питательной среде 1,84 мг/мл) или ниже. В этот период отмечены максимальные значения молокосвертывающей активности культуральной жидкости. Это свидетельствует о том, что происходил одновременный синтез ферментов молокосвертывающего действия и потребление белка из питательной среды продуцентом. При использовании фруктозы в качестве источника углерода содержание экзобелка в КЖ штамма 2421 было выше контроля, что указывает на преобладание процессов биосинтеза белков над потреблением белкового азота из питательной среды.

При использовании галактозы, сахарозы и мальтозы при культивировании штамма *I. lacteus* 2421 содержание белка в культуральной жидкости постепенно снижалось, что указывает на низкую скорость биосинтетических процессов и преобладание процессов потребления. Именно для этих вариантов углеродных источников отмечено снижение молокосвертывающей активности культуральной жидкости в соответствующий период культивирования (см. рис. 1, а).

При культивировании штамма *I. lacteus* 2424 на питательной среде, содержащей глюкозу, содержание белка в культуральной жидкости находилось на уровне контроля в период максимальных значений ферментативной активности. Это также может указывать на активный синтез фермента молокосвертывающего действия. При культивировании данного штамма на питательной среде с мальтозой содержание белка в культуральной жидкости находилось на уровне контроля также в период максимальных значений молокосвертывающей активности. К 25-м суткам культивирования содержание белка в КЖ значительно возрастало, а ферментативная активность снижалась. Это указывает на то, что происходил синтез белков иной функциональной направленности.

Нужно отметить, что при культивировании штамма *I. lacteus* 2424 на питательной среде с фруктозой, галактозой и сахарозой низкое содержание белка наблюдалось в период низкой активности молокосвертывающего фермента.

На рис. 3 представлено накопление биомассы штаммами *I. lacteus* 2421 и 2424 по показателю абсолютно сухой биомассы.

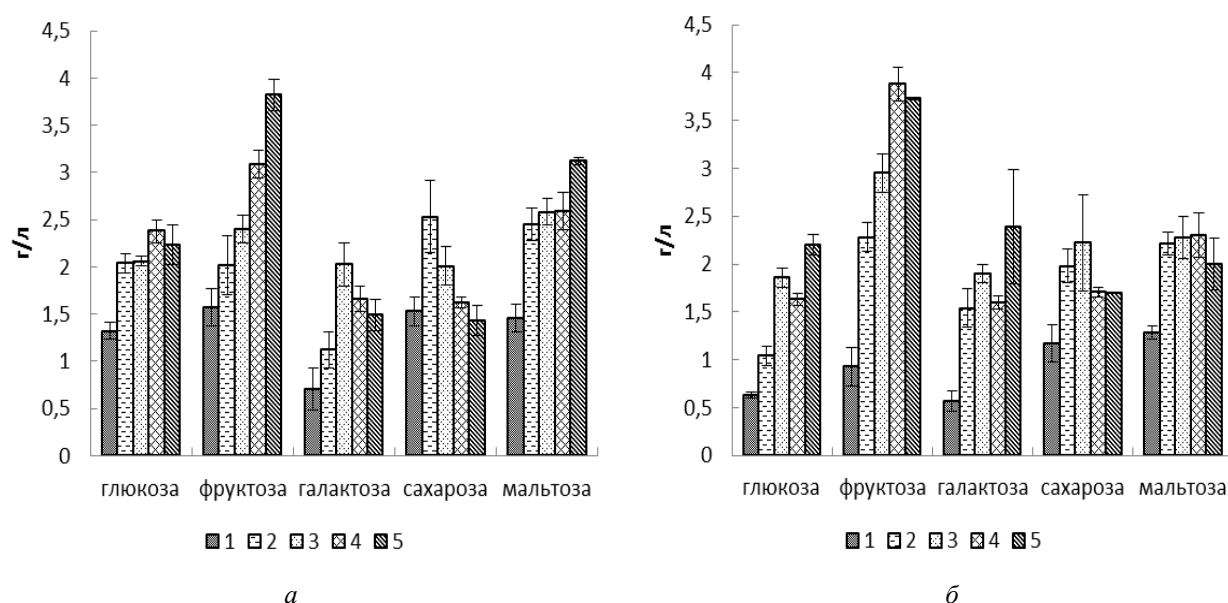


Рис. 3. Накопление абсолютно сухой биомассы штаммами *Irpex lacteus* 2421 (а) и 2424 (б) при культивировании на питательных средах с разными источниками углерода: 1 – 5 сутки, 2 – 10 сутки, 3 – 15 сутки, 4 – 20 сутки, 5 – 25 сутки

Установлено, что при культивировании штамма *I. lacteus* 2421 на питательных средах, содержащих глюкозу и фруктозу, максимальные значения молокосвертывающей активности наблюдались на экспоненциальной фазе роста. При культивировании данного штамма на средах с галактозой и сахарозой фаза отмирания мицелия наступала с 20-х суток. Именно в этот период наблюдалось резкое снижение ферментативной активности культуральной жидкости. При использовании мальтозы в качестве источника углерода экспоненциальная фаза роста мицелия наблюдалась до 25-х суток культивирования.

При культивировании штамма *I. lacteus* 2424 на питательных средах с глюкозой, галактозой и сахарозой, экспоненциальная фаза роста наблюдалась с 5-х по 15-е сутки, при использовании фруктозы – до 20-х суток, а в варианте с мальтозой – до 10-х суток роста (см. рис. 3, б). Очевидно, что активный синтез молокосвертывающего фермента осуществлялся в период активного роста штамма *I. lacteus* 2424, что соответствует литературным данным [16].

Максимальный выход биомассы мицелия отмечен при использовании фруктозы в качестве источника углерода для двух исследуемых штаммов *I. lacteus*.

Как видно на рис. 4, значение кислотности культуральной жидкости при культивировании штамма *I. lacteus* 2421 с содержанием глюкозы и фруктозы было ниже контрольного (исходного) рН. При использовании в качестве источника углеродного питания галактозы, сахарозы и мальтозы значение рН постепенно увеличивалось до 6. При культивировании штамма *I. lacteus* 2421 на питательной среде с фруктозой зарегистрированы наиболее низкие значения рН КЖ – 3,8. Причем именно в этот период наблюдались высокие значения молокосвертывающей активности культуральной жидкости.

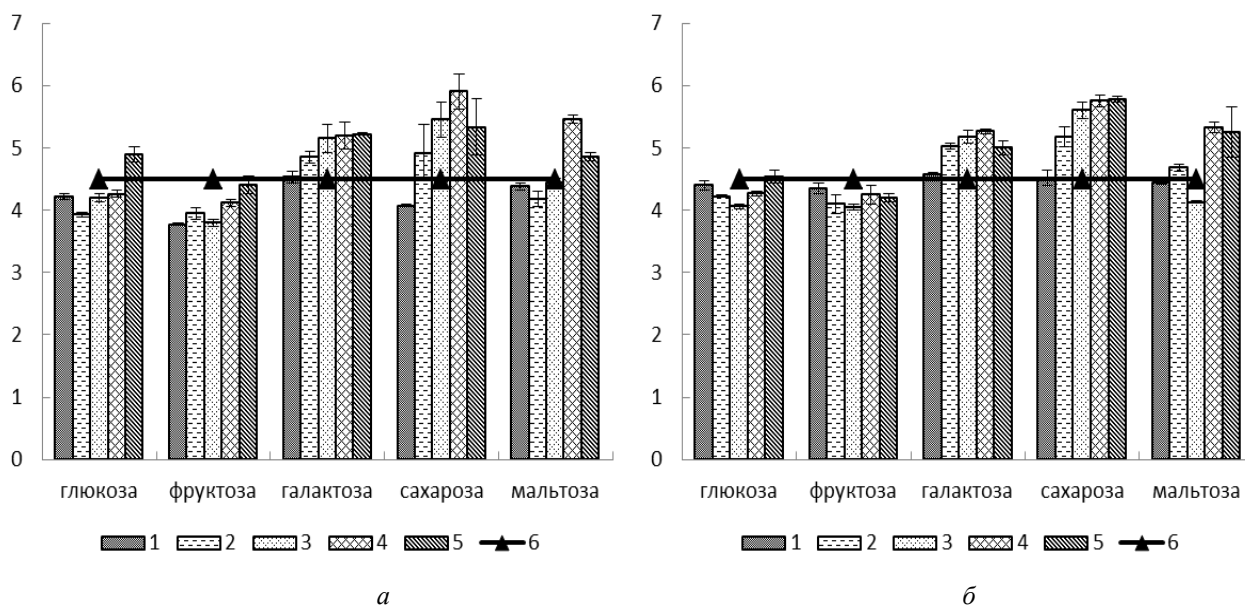


Рис. 4. рН культуральной жидкости штаммов *Irpex lacteus* 2421 (а) и 2424 (б) при культивировании на питательных средах с разными источниками углерода: 1 – 5 сутки, 2 – 10 сутки, 3 – 15 сутки, 4 – 20 сутки, 5 – 25 сутки, 6 – контроль

При культивировании штамма *I. lacteus* 2424 на питательных средах с содержанием фруктозы и глюкозы рН культуральной жидкости находилось на постоянном ниже контрольных значений уровне. На 5-е сутки культивирования штамма *I. lacteus* 2424 на питательных средах, содержащих сахарозу, галактозу и мальтозу, кислотность находилась на уровне контрольного значения. Дальнейшее культивирование штамма *I. lacteus* 2424 приводило к повышению рН до уровня 6. Следует отметить, что в данный период наблюдались невысокие значения молокосвертывающей активности культуральной жидкости.

## Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что штаммы гриба *I. lacteus* проявляют индивидуальные особенности биосинтеза молокосвертывающего фермента и требуют подбора условий культивирования. Наиболее оптимальным источником углерода для культивирования штамма *I. lacteus* 2421 является глюкоза и фруктоза, для штамма *I. lacteus* 2424 – глюкоза.

## Список литературы

1. Антоненко Л. О. Вплив джерел живлення на ріст грибів роду *Coriolus* Quel (*Trametes* Fr.) і їх антиокислювальну активність / Л. О. Антоненко, В. М. Кучма, Ю. С. Крисюк // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2010. – № 3. – С. 10-15.
2. Белки, ферменты и стерилы базидиальных грибов. Методы исследования / Под ред. О. П. Низковской. – Л. : Наука, 1979. – 72 с.
3. Белова Н. В. Некоторые перспективные направления биотехнологии базидиомицетов / Н. В. Белова, И. И. Шамолина // Микология и фитопатология. – 2013. – Т. 47, вып. 2. – С. 73-82.
4. Блilieва Р. К. Влияние различных источников азота и углерода на биосинтез протеолитических ферментов у культуры *Aspergillus awamori* 21/96 / Р. К. Блilieва, Ж. Е. Сафуани, Ж. А. Искакбаева // Прикл. биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, вып. 2. – С. 213-216.
5. Бойко С. М. Біологічні особливості штамів *Irpex lacteus* Fr. – продуцентів протеїназ молокозсідальної дії : автореф. дис. ... канд. біол. наук : спец. 03.00.21 «Мікологія» / С. М. Бойко. – К., 2002. – 20 с.
6. Влияние различных источников углеродного питания на молокосвертывающую активность *Hirschioporus laricinus* / [М. И. Бойко, С. Ф. Негруцкий, О. В. Федотов, В. А. Полях] // Философские и естественно-научные аспекты антропологии. – СПб. – Донецк, 1992. – С. 117-120.
7. Исследование потребностей *Hirschioporus abietinus* в источниках углеродного и азотного питания / [С. Ф. Негруцкий, О. А. Криводубский, Л. П. Фильчаков, Т. А. Потапова] // Микология и фитопатология. – 1982. – Т. 16, вып. 3. – С. 236-241.
8. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М. : Высшая школа, 1980. – 272 с.
9. Петербургский А. В. Практикум по агрономической химии / А. В. Петербургский. – М. : Колос, 1968. – 469 с.
10. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів : навч. посібник / Ю. Г. Приседський. – Донецьк : Кассиопея, 1999. – 210 с.
11. Типограф Д. Я. Условия культивирования гриба *Aspergillus candidus*, шт. 111 и его ферментативные комплексы / Д. Я. Типограф, Т. А. Петина // Прикл. биохимия и микробиология. – 1966. – Т. 2, № 4. – С. 417-424.
12. Федорова Л. Н. Влияние источников углеродного питания на молокосвертывающую активность микоризного гриба / Л. Н. Федорова, Т. Н. Дроздова // Микология и фитопатология. – 1982. – Т. 16, вып. 2. – С. 133-138.
13. Федорова Л. Н. Протеазы сычужного действия в культурах высших грибов / Л. Н. Федорова, А. Н. Шиврина // Микология и фитопатология. – 1974. – Т. 8, № 1. – С. 22-25.
14. Цивилева О. М. Влияние состава среды культивирования на активность внеклеточных лектинов / О. М. Цивилева, В. Е. Никитина, Л. В. Гарибова // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, вып. 2. – С. 200-203.
15. Чемерис О. В. Оптимизация состава питательной среды для культивирования штамма *Irpex lacteus* 2432 – продуцента протеиназ молокозсвертывающего действия / О. В. Чемерис, А. А. Ильина, М. И. Бойко // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – 2017. – № 3–4. – С. 85-90.

16. Штаммовая изменчивость синтеза специфических молокосвертывающих протеиназ у базидиального гриба *Irpex lacteus* / [О. В. Чемерис, В. В. Рашевский, К. А. Галкова, М. И. Бойко] // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. – 2016. – № 4. – С. 45-49.

17. *Kawai M.* Studies on milk clotting enzymes produced by Basidiomycetes. I. Screening test of Basidiomycetes for the production of milk clotting enzymes / M. Kawai, N. Mukai // Agric. Biol. Chem. – 1970. – Vol. 34 (2). – P. 159-163.

18. *Elisashvili V. I.* Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production / V. I. Elisashvili, E. T. Kachlishvili, S. P. Wasser // Прикл. биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, вып. 5. – С. 592-596.

19. *Layne E.* Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins / E. Layne // Methods Enzymol. – 1957. – Vol. 3. – P. 447-455.

***Chemeris O. V., Kuptsova Yu. G., Boyko M. I.* Influence of various sources of carbon nutrition on the synthesis of milk-clotting proteinases by fungus *Irpex lacteus*.** – The effect of five sources of carbon nutrition on the synthesis of milk-clotting exoproteinases by two strains of *Irpex lacteus* 2421 and 2424 was studied. It was established that the optimal source of carbon is glucose and fructose for strain *I. lacteus* 2421, and glucose for strain *I. lacteus* 2424.

*Key words:* basidiomycete *Irpex lacteus*, milk-clotting (rennet) activity, optimization of nutrient medium composition, carbon nutrition.