

УДК 577.151.52 : 582.284

© О. В. Чемерис, В. В. Рашевский, М. И. Бойко

МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ

ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»; 283050, г. Донецк, ул. Щорса, 46
e-mail: chemeris07@rambler.ru

Чемерис О. В., Рашевский В. В., Бойко М. И. Молокосвертывающая активность некоторых базидиальных дереворазрушающих грибов. – Проведена оценка способности к синтезу экзопротеиназ молокоосвертывающего действия у 6 штаммов 5 видов базидиальных грибов. Установлено, что все штаммы базидиомицетов способны к синтезу экзопротеиназ молокоосвертывающего действия. Однако наиболее активными продуцентами молокоосвертывающего фермента были штаммы грибов *Irpex lacteus*, *Trametes (=Coriolus) versicolor* и *Fomes fomentarius*.

Ключевые слова: молокоосвертывающая (сычужная) активность, протеиназы, экзофермент, базидиальные грибы, продуцент

Введение

С развитием биотехнологии базидиомицеты становятся доступным источником биологически активных веществ и ферментов разных классов. Их способность синтезировать внеклеточные ферменты, характеризующиеся высокой активностью и стабильностью, обуславливает интерес иностранных и отечественных исследователей [3–6, 19–23, 25]. По количеству и производительности энзимов базидиомицеты можно поставить на одну ступень с микроорганизмами, которые применяются в различных отраслях промышленности [6]. Наличие большого количества съедобных базидиальных грибов, отсутствие спороношения в культуре и отсутствие бактериального осеменения ферментных препаратов позволяет использовать их ферментные комплексы в производстве сыров, витаминов, пищевых продуктов и добавок, оздоровительных и лечебно-профилактических препаратов и др. [9], а также в научных исследованиях.

В последнее время особое внимание ученых привлекают протеолитические ферменты высших базидиальных грибов, применяющиеся в различных отраслях промышленности. Наиболее актуальными являются исследования, связанные с поиском и получением заменителей сычужного фермента животного происхождения – реннина (химозина). Замена общепризнанного и достаточно дорогостоящего сычужного (молокосвертывающего) фермента микробными или грибными протеазами узкого специфического действия является экономически выгодной и перспективной задачей сыроварения [7].

Базидиальные грибы являются активными продуцентами протеиназ молокоосвертывающего действия, которые по своим свойствам не уступают ферментам животного происхождения. Наиболее активными продуцентами реннина являются грибы *Russula decolorans* ((Fr.) Fr., 1825) [19], *Schizophyllum commune* (Fr., 1821) [25], *Irpex lacteus* ((Fr.) Fr., 1828) [3–5], *Hirschioporus laricinus* ((P. Karst.) Teram., 1951) [3, 14], *Pleurotus ostreatus* ((Jacq.) P. Kumm., 1871) [11]. Особый интерес представляет собой возможность использования культуральной жидкости таких грибов для получения ферментных препаратов протеиназ молокоосвертывающего действия.

Ежегодно выделяется большое количество штаммов чистых культур базидиомицетов – продуцентов заменителя реннина. Однако лишь некоторые представители из этих выделенных штаммов могут составить конкуренцию сычужному ферменту и быть перспективными для дальнейших исследований. Проведенные исследования молокоосвертывающей активности культурального фильтрата у грибов порядка *Aphillophorales* показали, что для этой группы грибов, прежде всего для возбудителей белой гнили, свойственно образование в культуре ферментов сычужного действия [13]. Установлено, что культуры *Cerrena* sp. и *Coprinus lagopides* (P. Karst., 1879) могут быть рекомендованными для получения ферментных молокоосвертывающих препаратов [8].

Учитывая это и относительно быстрый рост этих грибов в культуре, базидиомицеты могут представлять интерес для исследователей как возможные продуценты не только энзимов молокосвертывающего, но и другого действия.

В связи с этим целью наших исследований была оценка способности штаммов некоторых базидиальных грибов к синтезу ферментов молокосвертывающего (сычужного) действия.

Материал и методы исследования

Оценку способности к синтезу фермента молокосвертывающего действия проводили на 6 штаммах 5 видов базидиальных грибов. Штаммы были свежеизолированными согласно общепринятым методикам [2] из плодовых тел грибов, собранных в границах г. Донецка и Донецкой области: *Irpex lacteus* ЯСК-13, *Trametes (=Coriolus) versicolor* ((L.) Lloyd, 1920) Tv-11-11, *Laetiporus sulphureus* ((Bull.) Murrill., 1920) Ls-12, Ls-1303, *Fomes fomentarius* ((L.) Fr., 1849) Ff-14, а также в Закарпатской области – *Trametes gibbosa* ((Pers.) Fr., 1838) Tg-1.

Для исследования молокосвертывающей активности (МСА) культурального фильтрата (КФ) штаммы базидиомицетов культивировали глубинным способом в статических условиях на жидкой глюкозо-пептонной питательной среде [20] 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). Кислотность питательной среды доводили до значения pH 4,0 с помощью 10%-го раствора HCl. Культивирование штаммов осуществляли при температурах, оптимальных для роста. Определение молокосвертывающей активности культурального фильтрата проводили через каждые 5 суток, начиная с 5-х по 25-е сутки культивирования по методу Kawai и Mukai [23]. 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 [1, 18].

Содержание белка в культуральном фильтрате определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО) [10], используя формулу Лайне [24]. Накопление биомассы определяли весовым методом [15]. pH КФ измеряли с помощью анализатора ионов AI-123 (ДЕСКК, Украина).

Все исследования проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку полученных данных осуществляли дисперсионным анализом, а сравнение средних арифметических величин – по критерию Дункана [16].

Результаты и обсуждение

Установлено, что наиболее активными продуцентами экзопротеиназ молокосвертывающего действия были грибы *I. lacteus*, что подтверждается литературными данными [5], *T. versicolor* и *F. fomentarius* (рис. 1, а). Динамика активности молокосвертывающего фермента штамма *I. lacteus* ЯСК-13 наблюдалась только с 5-х по 15-е сутки культивирования, а на 20-е и 25-е сутки МСА не обнаружена, что, возможно, связано с ингибированием образования протеиназ сычужного действия продуктом реакции. Максимальные значения молокосвертывающей активности культурального фильтрата составляли 105 Е/мл на 10-е сутки выращивания штамма. Для штамма *F. fomentarius* Ff-14 на начальных этапах культивирования – 5-е и 10-е сутки – молокосвертывающая активность культурального фильтрата не обнаружена, что, по-видимому, связано с адаптацией продуцента к новым условиям произрастания. Молокосвертывающая активность КФ изолята *F. fomentarius* Ff-14 зарегистрирована на 15, 20 и 25-е сутки. При этом она удерживалась на одном уровне, так как достоверного отличия не выявлено, и составляла в среднем 108 Е/мл.

Необходимо отметить, что штамм *T. versicolor* Tv-11-11 был единственным, для которого синтез экзопротеиназ молокосвертывающего действия наблюдалось в течение всего времени культивирования. Активность фермента культурального фильтрата штамма *T. versicolor* Tv-11-11 находилась на уровне от 14,46 Е/мл на 5-е сутки культивирования до

77,83 Е/мл – на 25-е сутки. Штаммы *L. sulphureus* Ls-12, Ls-1303 и *T. gibbosa* Tg-1 показали низкие значения ферментативной активности культурального фильтрата в пределах 10-20 Е/мл. Установлено, что штаммы *L. sulphureus* Ls-12 и Ls-1303 проявили разный характер синтеза экзофермента молокосвертывающего действия. Данное явление характерно для разных штаммов одного вида гриба и подтверждается литературными данными [4, 21]. Также общей чертой этих штаммов базидиомицетов являлось отсутствие ферментативной активности культурального фильтрата на начальных этапах их культивирования.

Отмечено, что на 5-е сутки культивирования базидиомицетов содержание белка в КФ находилось на уровне контроля или ниже, что указывает на разный характер использования его грибом (рис. 1, б). Для штамма *I. lacteus* ЯсК-13 содержание белка в КФ превышало контроль, что указывает на активный синтез экзопротеиназ, очевидно, разной функциональной направленности и, по-видимому, вторая причина, указывающая на отсутствие молокосвертывающей активности культурального фильтрата на 20-е и 25-е сутки культивирования изолята *I. lacteus* ЯсК-13. Подобная тенденция изменения белка в культуральном фильтрате отмечена для штамма *F. fomentarius* Ff-14. Исключение составили 10-е сутки культивирования – резкое понижение уровня белка до контрольного уровня – может свидетельствовать о значительном поглощении его из питательной среды для физиологических потребностей штамма.

Для штаммов *T. versicolor* Tv-11-11, *L. sulphureus* Ls-12, Ls-1303 и *T. gibbosa* Tg-1 наряду с синтезом фермента сычужного действия происходило и активное потребление белка, содержащегося в исходной питательной среде. Особенно это характерно в период проявления максимальной ферментативной активности культурального фильтрата данных штаммов базидиомицетов.

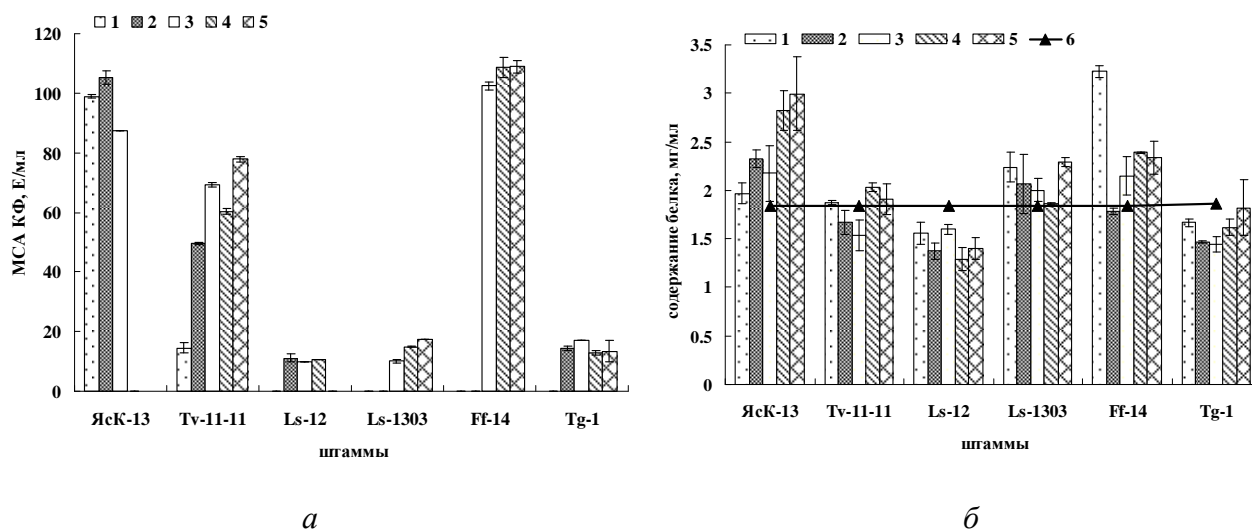


Рис. 1. Динамика изменения молокосвертывающей активности (а) и содержания белка в культуральном фильтрате (б) штаммов исследуемых базидиальных грибов: 1 – 5-е сутки, 2 – 10-е сутки, 3 – 15-е сутки, 4 – 20-е сутки, 5 – 25-е сутки, 6 - контроль

Установлено, что с 5-х по 25-е сутки происходил активный рост базидиомицетов (рис. 2, а). Экспоненциальная фаза роста мицелия наблюдалась с 5-х по 15-е сутки культивирования. Именно в этот период наблюдалось значительное повышение молокосвертывающей активности культурального фильтрата штаммов *I. lacteus* и *T. versicolor*, чего нельзя сказать о штамме *F. fomentarius* Ff-14 ферментативная активность которого в этот период отсутствовала. Выход на стационарную фазу роста штаммов базидиомицетов отмечен на 20-й день. Необходимо отметить, что высокий выход биомассы изученных штаммов не совпадал с максимальными значениями молокосвертывающей активности культурального фильтрата. Особенно эта закономерность прослеживалась для штаммов *L. sulphureus* Ls-12, Ls-1303 и *T. gibbosa* Tg-1.

Значения рН питательной среды влияет на рост и метаболизм дереворазрушающих грибов [12]. В процессе роста гриба на соответствующем субстрате осуществляется регуляция рН питательной среды [17]. В связи с этим нами была измерена кислотность КФ исследуемых штаммов базидиомицетов как одна из важнейших физиологических характеристик (рис. 2, б). Установлено, что в процессе культивирования базидиомицетов рН КФ незначительно смещался в слабо кислую сторону – к значениям 5,0, что совпадает с литературными данными [22]. Исключения составили только два штамма *L. sulphureus* Ls-12 и Ls-1303, рН КФ которых снизилась до значений 2,5-2,8, что указывает на выделение грибом метаболитов кислой природы.

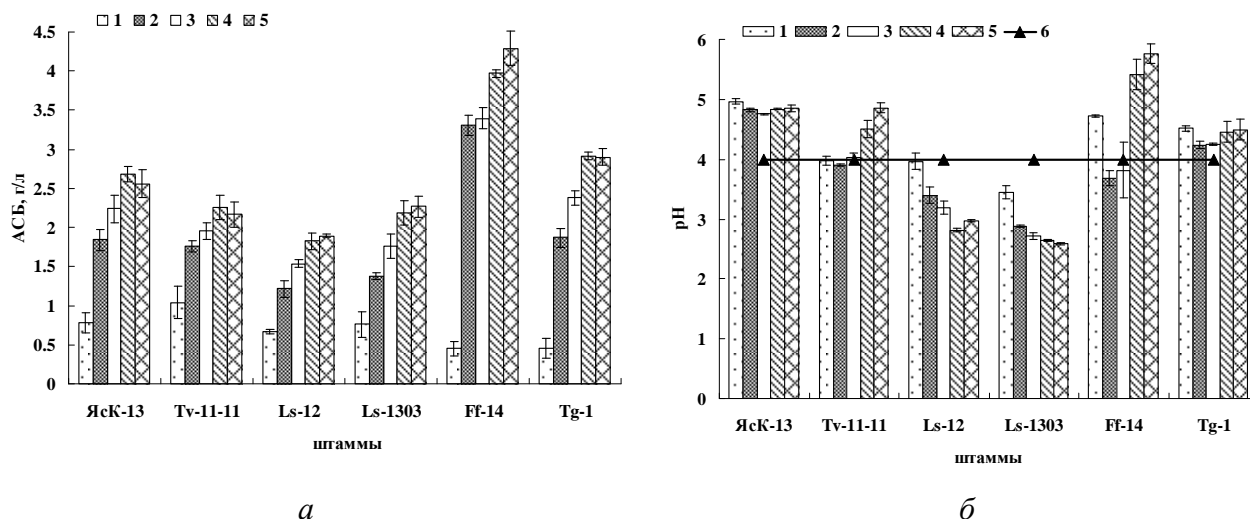


Рис. 2. Накопление абсолютно сухой биомассы (а) и рН культурального фильтрата (б) штаммов исследуемых базидиальных грибов:

1 – 5-е сутки, 2 – 10-е сутки, 3 – 15-е сутки, 4 – 20-е сутки, 5 – 25-е сутки, 6 - контроль

Выводы

Исследованные штаммы базидиомицетов способны к синтезу экзопротеиназ молокосвертывающего действия. При этом среди 6 штаммов базидиальных грибов наиболее активными продуцентами молокосвертывающего фермента являются штаммы *F. fomentarius* Ff-14, *I. lacteus* ЯсК-13 и *T. versicolor* Tv-11-11. При культивировании исследованные штаммы базидиомицетов проявляют индивидуальные особенности синтеза экзопротеиназ сычужного действия, накопления абсолютно сухой биомассы и изменения рН культурального фильтрата. Возможно, что создание оптимальных условий культивирования для этих штаммов будет способствовать повышению синтеза протеиназ молокосвертывающего действия.

Список литературы

1. Белки, ферменты и стерилы базидиальных грибов. Методы исследования / Под ред. О. П. Низковской. – Ленинград : Наука, 1979. – 72 с.
2. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии / В. И. Билай. – Киев : Наукова думка, 1973. – 243 с.
3. Бойко М. И. Фізіолого-біохімічні особливості системи *Pinus sylvestris* L. – *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. і перспективи практичного використання екзометаболітів деяких дереворуйнівних грибів : дис. ... докт. біол. наук : 03.00.12; 03.00.24 / М. И. Бойко. – Донецьк, 1996. – 461 с.
4. Бойко М. И. Физиологические различия штаммов гриба *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. – продуцентов протеиназ сычужного действия / М. И. Бойко, С. В. Киселева, О. В. Чемерис // Донецкие чтения 2016. Образование, наука и вызовы современности. Химические, биологические и медицинские науки : матер. I Междунар. науч. конф. (г. Донецк, 16-18 мая

- 2016 г.). – Ростов-на-Дону : Изд-во Южного федерального университета, 2016. – С. 206-208.
5. Бойко С. М. Біологічні особливості штамів *Irpex lacteus* Fr. – продуцентів протеїназ молокозсідальної дії : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.21 / С. М. Бойко. – Київ, 2002. – 20 с.
 6. Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А. С. Бухало. – Киев : Наукова думка, 1988. – 177 с.
 7. Гудков А. В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / А. В. Гудков. – Москва : ДеЛи принт, 2004. – 804 с.
 8. Дмитриева Т. А. Изучение молокосвертывающей активности высших базидиомицетов: автореф. дис. ... канд. тех. наук / Т. А. Дмитриева. – Санкт-Петербург, 2011. – 20 с.
 9. Егорова Н. С. Промышленная микробиология / Н. С. Егорова. – Москва : Высшая школа, 1989. – 686 с.
 10. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – Москва : Высшая школа, 1980. – 272 с.
 11. Лебедева Г. В. Очистка и характеристика молокосвертывающих ферментов вешенки обыкновенной / Г. В. Лебедева, М. Т. Проскуряков // Прикл. биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 6. – С. 690-692.
 12. Лилли В. Физиология грибов / В. Лилли, Г. Барнетт. – Москва : Изд-во иностр. лит., 1953. – 531 с.
 13. Низковская О. П. Протеолитическая активность базидиомицетов из порядка *Aphyllphorales*. I. Молокосвертывающая активность / О. П. Низковская, Л. Н. Федорова, Т. Н. Дроздова // Микология и фитопатология. – 1980. – Т. 14, № 1. – С. 36-40.
 14. Никитина О. А. Регуляция активности экзопротеиназ молокосвертывающего действия штаммов *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Ryv.: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / О. А. Никитина. – Донецк, 1999. – 174 с.
 15. Петербургский А. В. Практикум по агрономической химии / А. В. Петербургский. – Москва : Колос, 1968. – 469 с.
 16. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів : навч. посібник / Ю. Г. Приседський. – Донецьк : Кассиопея, 1999. – 210 с.
 17. Рипачек В. Биология дереворазрушающих грибов / В. Рипачек. – Москва : Лесная промышленность, 1967. – 276 с.
 18. 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.
 19. Федорова Л. Н. Биосинтез молокосвертывающего фермента базидиальными грибами *Russula decolorans* 456 / Л. Н. Федорова, Т. Н. Дроздова, В. П. Гаврилова // Микология и фитопатология. – 1981. – Т. 15, вып. 6. – С. 496-500.
 20. 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.
 21. Чемерис О. В. 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.
 22. Шиврина А. Н. Биосинтетическая деятельность высших грибов / А. Н. Шиврина, О. П. Низковская, Н. Н. Фалина и др. – Ленинград : Наука, 1969. – 171 с.
 23. 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. – V. 34 (2). – P. 159-163.
 24. Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins / E. Layne // Methods Enzymol. – 1957. – Vol. 3. – P. 447-455.
 25. Okamura-Matsui T. Characteristics of a Cheese-like food produced by fermentation of the

mushroom *Schizophyllum commune* / T. Okamura-Matsui, K. Takemura, M. Sera et al. // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2001. – V. 92 (1). – P. 30-32.

Chemeris O. V., Rashevskiy V. V., Boyko M. I. Milk-clotting activity of some basidial wood-destroying fungi. – The evaluation of the ability to synthesize milk-clotting enzymes in 6th strains of 5th species of basidiomycetes. It was found that all the strains of Basidiomycetes were able to synthesize exoproteinase of milk-clotting action. However, the most active producers of milk-clotting enzyme were strains of fungi *Irpex lacteus*, *Trametes* (= *Coriolus*) *versicolor* and *Fomes fomentarius*.

Key words: milk-clotting (rennet) activity, proteinases, extracellular enzyme, basidial fungi, producer.