

Винахід відноситься до біотехнології і може використовуватись у ферментативній технології для одержання ферменту молокозгортаючої дії на основі культивування нового продуцента - штама М-81 [1]. Цей фермент може використовуватись у сироварінні ! стати заміником гостродефіцитного сичужного ферменту - ренину.

Відомі середовища, які містять сахарозу і мінеральні компоненти (середовище Білай, Вельтє і Хеннеберга), глюкозу і мінеральні елементи (середовище Чапека-Докса) [2], [3], але активність молокозгортаючого ферменту гриба *Hirschioporus laticinus*, який зростає на цих середовищах досить низька і на 10-ту добу культивування зникає.

Найбільш близьким до заявленого об'єкту є глюкозо-пептонне середовище такого складу, г/л: глюкоза - 10, пептон - 3, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, CaCl_2 - 0,05, вода до 1 л [4], яке використовувалось для вирощування мікоризного гриба *Russula decolorans* - продуцента молокозгортаючого ферменту. Це середовище забезпечує утворення ферменту штамом М-81 *Hirschioporus laticinus* протягом всього періоду його культивування, але в малій кількості, що свідчить про недостатнє забезпечення продуцента необхідними живильними компонентами для його біосинтетичної діяльності. Склад живильного середовища для культивування *H. laticinus* в літературі не описано.

В основу винаходу поставлена задача - удосконалення відомого середовища (глюкозо-пептонного), в якому шляхом зміни концентрації деяких компонентів та введення допоміжної хімічної сполуки досягають значного підвищення активності та виходу протеаз молокозгортаючої дії при поверхневому культивуванні *H. laticinus*.

Поставлена задача вирішується тим, що живильне середовище, яке включає глюкозу, пептон, калій фосфорнокислий одно-заміщений, калій фосфорнокислий дво-заміщений, магній сірчанокислий, цинк сірчанокислий і кальцій хлористий відповідно винаходу додатково містить натрій хлористий при такому співвідношенні компонентів, г/л: глюкоза - 18-20, пептон - 8-10, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,9-1,1, CaCl_2 - 0,11-0,13, NaCl - 0,18-0,20, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильована вода до 1 л.

Удосконалення вихідного середовища проводили за методом повного факторного експерименту (ПФЭ-2) [5] від яких в основному залежить біосинтетична активність продуцента. Це глюкоза і пептон, які є джерелами вуглецю та азоту, а сірчанокислий магній і хлористий кальцій - джерелом іонів Mg^{++} і Ca^{++} , що активують діяльність ферментних систем. Поряд з цим повний факторний експеримент дає можливість виявити найбільш ефективний вплив кожного окремого фактору і їх взаємозв'язок на біосинтез протеаз молокозгортаючої дії штамом М-81 *H. laticinus*.

Живильне середовище готують шляхом послідовного розчинення його компонентів з послідуочим доведенням дистильованою водою до 1 л. Кислотність середовища доводять до 4,3-4,5 рН за допомогою 10%-ної HCl . Живильне середовище розливають по 40 мл в конічні колби на 250 мл, стерилізують в автоклаві при 0,8-1 атм протягом 40 хв. Гриб вирощують протягом 10 діб при температурі 30-31 °С. Молокозгортаючу активність культурального фільтрату визначають за методом Каваї і Мукаї [6], а розрахунок ведуть за формулою [7]

$$M3A_{\text{КФ}} = \frac{40 \cdot 100 \cdot K}{\Pi} = \text{умовні одиниці},$$

де К - коефіцієнт розведення культурального фільтрату /КФ/;

Π - час згортання молока, хв;

40 - середній час згортання молока при виробництві сиру, хв.

Приклад 1. Готують вихідне середовище такого складу, г/л: глюкоза - 10, пептон - 3, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5, CaCl_2 - 0,05, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильована вода до 1 л. Живильне середовище розливають по 40 мл в конічні колби і стерилізують в автоклаві при 0,8-1 атм протягом 40 хв. Кислотність середовища після стерилізації становила 4,4 рН. Після охолодження середовища його інокують кусочком міцелію розміром, приблизно, 10 x 10 мм, вирощують продуцент при температурі 30-31 °С протягом 10 діб і визначають молокозгортаючу активність культурального фільтрату. Активність ферменту культуральної рідини дорівнювала 5334 ум. од./100 мл молока, а вихід ферменту становив 54,5 мг/1л середовища.

Приклад 2. Готують живильне середовище такого складу, г/л: глюкоза - 14-16, пептон - 5-6, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,7-0,9, CaCl_2 - 0,9-0,11, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильована вода до 1 л. Всі операції по приготуванню середовища такі, як у прикладі 1. Молокозгортаюча активність культуральної рідини дорівнювала 9478 ум. од./100 мл молока, а вихід ферменту становив 74,5 мг/1 л середовища.

Приклад 3. Готують живильне середовище такого складу, г/л: глюкоза - 18-20, пептон - 8-10, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,1-1,3, CaCl_2 - 0,13-0,15, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильована вода до 1 л. Всі операції по приготуванню середовища і час вирощування продуцента такі, як у прикладі 1. Молокозгортаюча активність КФ дорівнювала 28571 ум. од./100 мл молока, а вихід ферменту становив 124,3 мг/1 л середовища.

Приклад 4. Готують живильне середовище, г/л: глюкоза - 18-20, пептон - 8-10, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,9-1,1, CaCl_2 - 0,11-0,13, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильована вода до 1 л. Всі операції по приготуванню живильного середовища і період культивування гриба такий, як у прикладі 1. Активність ферменту культурального фільтрату дорівнювала 55006 ум. од./100 мл молока. Вихід ферменту становив 166 мг/1 л середовища.

Таким чином, при вирощуванні штама М-81 *Hirschioporus laticinus* на середовищі, яке має співвідношення глюкози - 18-20, пептону - 8-10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,9-1,1 і CaCl_2 - 0,11-0,13 г/л є оптимальним для одержання ферменту молокозгортаючої дії.

Введення допоміжної сполуки - хлористого натрію здійснювали в оптимізоване глюкозо-пептонне середовище в концентрації 0,1, 0,2 і 0,25 г/л.

Приклад 5. Готують живильне середовище такого складу, г/л: глюкоза - 18-20, пептон - 8-10, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,9-1,1, CaCl_2 - 0,11-0,13, NaCl - 0,1-0,15, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильована вода до 1 л. Всі операції по приготуванню живильного середовища і період культивування гриба такий, як у прикладі 1.

1.

Активність ферменту дорівнювала 63490, од./100 мл молока. Вихід ферменту в кристалічному стані становив 179,1 мг/л середовища.

Приклад 6. Готують живильне середовище такого складу, г/л: глюкоза - 18-20, пептон - 8-10, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,9-1,1, CaCl_2 - 0,11-0,13, NaCl - 0,18-0,20, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильована вода до 1 л. Всі операції по приготуванню середовища такі, як у прикладі 1. Молокозгортаюча активність КФ дорівнювала 85106 ум. од./100 мл молока. Вихід ферменту становив 234 мг на 1л живильного середовища.

Приклад 7. Готують живильне середовище такого складу, г/л: глюкоза - 18-20, пептон - 8-10, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,9-1,1, CaCl_2 - 0,11-0,13, NaCl - 0,23-0,25, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильована вода до 1 л. Всі операції по приготуванню живильного середовища такі, як у прикладі 1. Молокозгортаюча активність культурального фільтрату становила 62395 ум. од./100 мл молока. Вихід ферменту у кристалічному стані дорівнював 167 мг/л середовища.

Таким чином оптимізоване глюкозо-пептонне живильне середовище, яке містить у своєму складі NaCl в концентрації 0,18-0,20 г/л є оптимальним для культивування гриба *Hirschioporus laricinus* з метою одержання ферменту у кристалічному стані. Це середовище дає можливість одержати у кристалічному стані ферментного препарату у 4,3 рази більше, ніж вихідне.