

Винахід відноситься до ферментативної галузі мікробіологічної промисловості і становить новий штам соматичних структур макроміцета (вищого базидіального гриба) *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Riv. A-032, який може використовуватись для отримання молокозсідального фермента як заміника сичужного фермента при виробництві сирів.

Відомі штами вищих базидіальних грибів *Amyloporia lenis* (Karst.) Bond, et Sing., *Mycena pura* (Fr.) Kumm., що продукують молокозсідальні ферменти [6]. Однак активність цих штамів поступається активності запропонованого штама *H.laricinus* A-032.

Розвиток біотехнології ферментів пов'язаний з подальшим пошуком нових штамів - продуцентів, що мають високі виробничі якості [2,4].

Найбільш близьким за технічною суттю та досяжному результату до об'єкта, що заявляється, є штам M-81 *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Riv., який відноситься до сапротрофних дереворуйнівних грибів [1]. Молокозгортаюча активність (МЗА) культурального фільтрату (КФ) цього продуцента має найвище значення у віці культури 12 - 15 діб і становить 2,5хв (1600од/мл).

В основі винаходу поставлено завдання використання штаму соматичних структур A-032 макроміцета *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Riv., який виділено у чисту культуру на кафедрі фізіології рослин Донецького державного університету як такого, що виявляє високу молокозгортаючу активність у культурі і може бути використаний для синтезу протеїназ молокозсідальної дії і заміни сичужного фермента у виробництві сирів. Запропонований штам A-032 сапротрофного дереворуйнівного гриба *H.laricinus* (клас *Basidiomycetes*, порядок *Aphillophorales*, родина *Porfungaceae*) синтезує у навколишнє середовище екзофермент, що має високу молокозсідальну активність. Максимальне значення МЗА культурального фільтрату становить 100000од/мл. Молочний згусток, що утворюється, білого кольору, сторонніх запахів і присмаків не має. Штам A-032 синтезує молокозсідальний фермент на рідких поживних середовищах: мінеральному Чапека - Докса і пивне сусло-пептон.

Штам A-032 *H.laricinus* зберігається у колекції чистих культур макроміцетів кафедри фізіології рослин Донецького державного університету і депонований у спеціальній колекції культур Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, колекційний номер 1075.

Отриманий штам A-032 *H.laricinus* має наступні характеристики:

Культурально-морфологічні ознаки.

Штам A-032 плодових тіл у культурі не утворює. За мікроскопічними дослідженнями міцелій складається з розгалужених гіф із чіткими стінками і перегородками, що добре проглядаються. Досить часто зустрічаються анастомози, пражки і утворюються хламідоспори. В природних умовах утворює поодинокі, в'ялоподібні, сидячі плодові тіла. Їх поверхня злегка повстяна, світло-сіра, гіменофор пластинчатий.

На мінеральному живильному середовищі Чапека - Докса колонія біла, представлена, головним чином, зануреним міцелієм. Середня швидкість росту міцелій за добу при 30 - 32°C

становить 8,83 ± 0,17мм. Зворотня сторона колонії не пігментована.

На агаризованому безхмілевому пивному суслі штам A-032 утворює пишний білий міцелій. Повітряний міцелій добре розвинутий. Середній лінійний ріст за добу при 30 - 32°C становить 11,75 ± 0,12мм. Міцелій пишний, білий, достатньо щільний. Зворотня сторона колонії не пігментована. При 50°C ріст грибиці припиняється. На рідких глюкозо-пептонному і сусло-пептонному середовищах штам A-032 утворює у рівній мірі як поверхневий, так і занурений міцелій. Культуральний фільтрат не забарвлює.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

При визначенні кращих джерел вуглецевого і азотного живлення, критерієм придатності було значення МЗА КФ. Штам A-032 найліпше засвоює глюкозу і фруктозу, менше мальтозу, непридатна до культивування арабіноза. З поліцукрів краще засвоюються інулін та крохмаль. Штам A-032, що зростав на поживних середовищах з зазначеними джерелами вуглецю, синтезує молокозсідальний фермент різної активності.

Вивчення придатності неорганічного азоту (нітратного, амонійного, сульфатного) і органічного (ферментативний пептон, сечовина, амінокислоти) показало, що тільки на середовищах, які містять пептон і аспарагін йде активне ферментоутворення.

Завдання 1. Штам A-032 *H.laricinus* виділено із плодового тіла, що було зібрано зі стовбура зламаного сосни у штучному лісному масиві Краснолиманського лісгоспзагу Донецької обл., у жовтні 1992р. Культуру зберігали за методом обрідних пересівів на агаризоване пивне сусло і агаризоване глюкозо-картопляне середовище.

Для виявлення молокозсідальної активності, штам A-032 культивували на глюкозо-пептонному середовищі складу, г/л: глюкоза - 10,0; пептон - 3,0; K₂HPO₄ - 0,4; KH₂PO₄ - 0,6; MgSO₄ × 7H₂O - 0,5; ZnSO₄ × 7H₂O - 0,001; CaCl₂ - 0,05; дистильована вода до 1л. Водневий показник, після стерилізації середовища, становив 3,4 - 3,5 рН. *H.laricinus* вирощували в колбах Ерленмейєра на 250мл, що вміщували 50мл живильного середовища; поверхневим способом при температурі 30 - 32°C, яка є оптимальною для росту даного гриба [3]. Посівним матеріалом була 10 - 15 добова культура, яку вирощували на вказаних агаризованих середовищах.

МЗА визначали на 3-, 5-, 7-, 10-, 15-, 20-, 25-, 30 добу вирощування гриба. Міцелій відділяли фільтруванням, а КФ використовували для визначення молокозсідальної активності за методом, запропонованим Каваї і Мукаї [7].

У 100мл цільного молока вносили 1мл 15% - го розчину CaCl₂ і доводили кислотність за допомогою 10% - ної HCl до рН 6,0 - 6,1. В пробірки вливали по 10мл молока і розміщували у водяній бані при 5°C. Після нагріву, в дослідні пробірки вносили по 1мл КФ. Суміш перемішували і залишали на водяній бані. Про МЗА судили за часом зсідання молока в хвилинах. Розрахунок МЗА вели за формулою, запропованою Тіпографом Д.Я. і Петіной ТА [5]

$$МЗА_{\text{КФ}} = \frac{40 \cdot 100 \cdot K}{\Pi}, \text{ од/мл,}$$

де K - коефіцієнт розведення КФ;

Π - час зсідання молока, хв;

40 - середній час зсідання молока у виробництві сирів, хв.

Отримані результати свідчать про те, що штам

A-032 *H.laricinus*, починаючи з 3-добового віку, синтезує в середовищі молокозсідальний фермент, активність якого становить 30хв. Потім йде поступове збільшення активності від 7хв у віці 5 - ти діб до 2,5хв у віці 7 - ми діб. Найвища активність спостерігається у віці 10 - ти діб і становить 0,5хв, потім активність зменшується до 1,25хв і залишається на такому рівні до 30 - ти діб культивування.

Одержані результати свідчать про те, що активність КФ штаму А-032 залишається високою на протязі всього часу культивування та перевищує активність відомих штамів. Виявлена властивість може бути використана у промисловому культивуванні штаму А-032 *H.laricinus* з метою отримання молокозсідального фермента.

Запропонований штам продукує у середовищі молокозсідальний фермент. Активність культурального фільтрату цього штаму вище в 5 разів у порівнянні з прототипом *H.laricinus* штам М-81.