



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1211288** **A**

(5D) 4 С 12 N 9/58, С 12 N 15/00 //
(С 12 N 9/58, С 12 R 1:645)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3787001/28-13

(22) 18.05.84

(46) 15.02.86. Вюл. № 6

(71) Донецкий государственный универ-
ситет

(72) М.И. Бойко, С.Ф. Негруцкий,
Т.В. Мирошниченко, М.А. Соболев
и Ю.С. Варенко

(53) 663.11(088.8)

(56) Авторское свидетельство СССР
№ 691488, кл. С 12 N 15/00, 1975.

Авторское свидетельство СССР
№ 522230, кл. С 12 N 9/59, 1972.

(54) ШТАММ *HIRSCHIOPORUS LARICINUS*
M-81 (KARST) RYV. - ПРОДУЦЕНТ МОЛО-
КОСВЕРТЫВАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА.

(57) Штамм *Hirschioporus laricinus*
M-81 (Karst.) Ryv. (хранится в Цент-
ральном музее промышленных микроор-
ганизмов ВНИИгенетика под номером
ЦММ Б-263) - продуцент молокасверты-
вающего фермента.

SU (11) **1211288** **A**



Изобретение относится к ферментативной технологии и представляет собой новый вид гриба для получения молокосвертывающего фермента в качестве заменителя сычужного фермента, применяющегося при изготовлении сыров.

Целью изобретения является использование нового штамма гриба *Hirschioporus laricinus* М-81 в качестве продуцента молокосвертывающего фермента, обладающего более высокой активностью, чем известные штаммы грибов.

Предлагаемый штамм М-81 сапрофитового дереворазрушающего гриба *Hirschioporus laricinus* (класс Basidiomycetes, порядок Aphyllophorales, семейство Polyporaceae) синтезирует и выделяет в сферу фермент, обладающий высокой молокосвертывающей активностью (МСА). МСА культурального фильтрата составляет 16000 ед/мл, а ферментного препарата 1000000 ед/г. Образующийся сгусток белого цвета, посторонних запахов и привкусов не имеет. Штамм М-81 образует молокосвертывающий фермент даже при произрастании на минеральной среде Чапека-Докса, где источником углерода служит фильтровальная бумага.

Штамм М-81 *Hirschioporus laricinus* хранится в коллекции кафедры физиологии растений Донецкого госуниверситета и в ЦМТМ ВНИИгенетика (Москва) под шифром ЦМТМ F-263.

Полученный штамм М-81 *Hirschioporus laricinus* имеет следующие характеристики.

Морфология. Плодовых тел в культуре не образует. Мицелий белый, достаточно плотный. Гифы ветвящиеся, с перегородками. Ширина гиф составляет 2,49–5,71 мкм. Спороношений в культуре не дает. В естественных условиях образует плодовые тела, имеющие шляпку, разделенную на две полукруглые половинки. Размер их 3,15х5,30 мм, до 7 мм толщиной. Плодовые тела жесткие, слабо опушенные, темно-серого цвета, гименофор пластинчатый. Споры цилиндрической формы: 5,5–8 х 2–2,5 мкм.

Минеральная среда Чапека. Грибница белого цвета, редкая, паутиннообразная. Воздушный мицелий развит слабо. Гифы ветвящиеся, с перегород-

ками. Средняя скорость роста мицелия за 1 сут при 30°C 13,9±0,15 мм. Спороношений не образует. Обратная сторона колонии непигментирована.

5 Органические среды. На агаризированном неохмеленном пивном сусле штамм М-81 образует пышный, белый мицелий. Воздушный мицелий хорошо развит. Средний линейный рост за 10 1 сут при 30°C 14,4±0,3 мм. Спороношений не образует. Среда непигментирована. Хорошо растет на агаризированной глюкозо-картофельной среде. При 30°C линейный рост мицелия 15 за 1 сут. 13,4±0,12 мм. Мицелий пышный, белый, достаточно плотный. Спороношений не образует. Обратная сторона колонии гриба непигментирована.

20 При 50°C рост грибницы отсутствует. Физиологические признаки. Лучше всего усваивает глюкозу, фруктозу и ксилозу, слабее арабинозу, маннит и очень слабо сахарозу. Штамм М-81, 25 произрастая на среде с указанными источниками углерода, образует молокосвертывающий фермент, активность которого различна.

30 Токсичность и патогенность культурального фильтрата определяли на беспородных белых мышах обоего пола. Полученные результаты показали, что культуральный фильтрат штамма М-81 *Hirschioporus laricinus* при внутри- 35 брюшном и пероральном методах введения патогенными и токсичными свойствами не обладает.

Пример 1. Штамм М-81 *Hirschioporus laricinus* выделен из 40 плодового тела, произраставшего на стволе срубленной сосны. Культуру штамма сохраняли путем редких пересевов на агаризированную глюкозо-картофельную среду или агаризиро- 45 ванное пивное сусло.

Для обнаружения молокосвертывающей активности штамм М-81 культивировали на глюкозо-пептонной среде 50 следующего состава: г/л: глюкоза 10,0; пептон 3,0; K_2HPO_4 0,4; KH_2PO_4 0,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001; $CaCl_2$ 0,05, дистиллированная вода до 1 л. Кислотность среды после стерилизации 5,50–5,90 рН. Гриб вы- 55 ращивали в колбах Эрленмейера на 250 мл, с объемом питательной среды 50 мл, поверхностным способом при температуре 30°C, являющейся опти-

мальной для роста штамма М-81. Посевным материалом служила 10-15-суточная культура, выращенная на указанных агаризированных средах.

Молокосвертывающую активность культурального фильтрата определяли в 3-, 7-, 5-, 12-, 14-, 17-, 22-, 30- и 70-суточном возрасте гриба. Для этого мицелий отделяли от питательной среды путем фильтрования через стеклянный фильтр (размер пор 16-40 мкм), соединенный с колбой Бунзена. Полученный таким образом культуральный фильтрат использовали для обнаружения в нем молокосвертывающего фермента по методу, предложенному Каван и Мукаи.

В 100 мл натурального молока вносили 1 мл 15%-ного раствора CaCl_2 , перемешивали на магнитной мешалке и доводили кислотность 10%-ной HCl до pH 6,0. В пробирки вносили по 10 мл молока и помещали в водяную баню при 35°C. Через 2-3 мин в опытные пробирки вносили 1 мл культурального фильтрата (КФ) или 1 мл 0,1%-ного раствора ферментного препарата, полученного из КФ путем осаждения белков сернокислым аммонием и других соответствующих процедур. В контрольные пробирки вносили 1 мл прокипяченного КФ или раствора фермента. Смесь в пробирках встряхивали и ставили на водяную баню при 35°C. О молокосвертывающей активности КФ судили по времени свертывания молока в минутах. Расчет МСА вели в условных единицах по формуле, предложенной Типограф Д.Я. и Петинной Т.А.

$$\text{МСА}_{\text{КФ}} = \frac{40 \cdot 100 \cdot K}{\Pi} \text{ ед/мл,}$$

$$\text{МСА}_{\text{преп}} = \frac{40 \cdot 100 \cdot K}{\Pi \cdot a} \text{ ед/г,}$$

где К - коэффициент разведения КФ или препарата фермента;

Π - время, в течение которого из 100 мл молока при добавлении 1 мл КФ или 1 мл раствора фермента образуется плотный сгусток, мин;

40 - среднее время свертывания молока при производстве сыра, мин;

а - навеска ферментного препарата, г.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что штамм М-81, начиная с 3-суточного возраста, продуцирует в среду молокосвертывающий фермент. Активность этого фермента постепенно увеличивается от 9 мин (5-суточная культура) до 2,5 мин (в 12-15-суточном возрасте), когда отмечается наибольшая активность фермента. В 16-22-суточном возрасте створаживание молока осуществляется за 3 мин, а МСА культурального фильтрата штамма в 30-суточном возрасте составляет 4 мин. Культура штамма и в 70-суточном возрасте обладает молокосвертывающей активностью, равной 21 мин.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что активность молокосвертывающего фермента остается высокой на протяжении месячного возраста культуры. Обнаруженное свойство может быть использовано при промышленном культивировании штамма М-81 с целью получения молокосвертывающего фермента.

Активность ферментного препарата, полученного из КФ штамма 15-суточного возраста, составляет более 1000000 ед/г.

Таким образом, предлагаемый штамм продуцирует молокосвертывающий фермент, активность которого в 2 раза выше, чем активность фермента, продуцируемого известным штаммом.

Редактор Н. Горват

Составитель В. Голымбет

Техред Ж. Кастелевич

Корректор С. Шекмар

Заказ 610/31

Тираж 490

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ИПИ "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4

