

Винахід відноситься до ферментативної технології та представляє собою новий штам соматичних структур макроміцету (базидіального гриба) *Irrex lacteus* Fr. для отримання молокозсідального ферменту в якості замінича сичужного ферменту іри виробництві сирів.

Відомі штамми вищих базидіальних грибів *Tyromyces revolutus* (Bred.) Bond et. Sing БН-32, *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Ryv. М-81 та *Irrex lacteus* Fr Д-4 які продукують молокозсідальні ферменти, активність яких уступає активності пропонуємого штаму, *I.lacteus* БН-3 [3, 4].

Найбільш близькими по суті га досягаємому результату, є штам: Д-4 сапротрофного дереворуйнівного гриба *Irrex lacteifs* Fr., активність якого складає 1,3 хвилини [4], що майже у 2 рази менше ніж у пропонуємого штаму БН-3.

В основу винаходу поставлена задача використання нового штаму гриба *I. lacteus* БН-3 в якості продуцента високоактивного молокозсідального ферменту.

Поставлена задача вирішується тим, що штам БН-3 сапротрофного дереворуйнівного гриба *Irrex lacteus* (клас Basidiomycetes, порядок Aphyllophorales, родина Poriaceae [6]) культивують при температурі 37°C, під час чого він синтезує та виділяє у середовище фермент, з високою молокозсідальною активністю (МЗА). МЗА культурального фільтрату становить 40 секунд (600 од/мл). Отриманий згусток має білий колір, не має: побічного запаху та присмаку.

Штам БН-3 *I. lacteus* зберігається у колекції кафедри фізіології рослин Донецького національного університету, який депоновано в спеціальну колекцію культур Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, колекційний номер 1082.

Отриманий штам БН-3 *I. lacteus* має слідуочу характеристику: Морфологія. Плодових тіл у культурі не утворює. Міцелій білого кольору, досить міцний. Гіфи розгалужені з перегородками. Виділяються генеративні та скелетні гіфи (диметична гіфальна система). Ширина гіф 2,6 – 7,0 μ. Спорношення у культурі нема. У природних умовах плодове тіло резупінантне або черепично розташоване. Поверхня шляпки мохната, біла або ара, гіменофор трубчатий. Спори еліпсоїдальні, 4 – 6 * 2 – 3 μ у основі косо загострені.

На мінеральному середовищі Чапека-Докса колонія має занурений міцелій білого кольору. Середня швидкість зростання міцелію за 1 добу при 27-35°C складає 11,8 ± 0,9 мм. Зворотна сторона колонії не пігментована.

На агаризованому пивному суслі штам БН-3 утворює пишний білий міцелій. Добре розвинутий повітряний міцелій. Середня швидкість зростання за 1 добу при 27-35°C становить 16,0 ± 0,8 мм. Зворотна сторона колонії не пігментована. Дуже добре зростає на глюкозо-картопляному агарі. При 27-35°C швидкість зростання становить в середньому 15,5 ± 0,7 мм. Зворотна сторона колонії не пігментована. Міцелій пишний, білий досить міцний.

При 40°C зростання штаму майже не відбувається.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

При відборі джерела вуглецевого живлення критерієм придатності служило значення МЗА культурального фільтру (КФ). Найкраще усього штам БН-3 засвоює глюкозу, крохмаль та сахарозу, менш добре ксилозу та галактозу. Штам БН-3 зростаючи на зазначених середовищах утворює фермент молокозсідальної дії, активність якого неоднакова.

Приклад 1.

Штам БН-3 *I. lacteus* отримано з плодового тіла зібраного з сухого гілля листяних порід у штучному масиві поблизу м. Донецька у жовтні 1996 року. Культура зберігалась шляхом пересіву на глюкозо-картопляному агарі або агаризованому пивному суслі.

Дія виявлення молокозсідальної активності штам БН-3 культивували на глюкозо-пептоному середовищі [2] слідуочого складу, г/л: глюкоза-10,0; пептон-3,0; K₂HPO₄-0,6; K₂HPO₄-0,4; MgSO₄·7H₂O-0,5; ZnSO₄·7H₂O-0,001; CaCl₂-0,05; дистильована вода до 1л. Кислотність середовища після стерилізації становила 3,50 рН Гриб культивували у конічних колбах на 250мл, з об'ємом живильного середовища 50мл, при температурі 37°C, яка була оптимальною для даного штаму. Посівним матеріалом була 10-15 добова культура, яка зростала на агаризованих середовищах.

Молокозсідальну активність культурального фільтрату визначали на 3-, 6-, 9-, 12-, 15-, 18-, 21-, 24-, 27-, 30-добу зростання гриба. Середовище фільтрували, а КФ використовували для визначення молокозсідальної активності за методом Каваї та Мукаї [1].

У 100мл натурального молока вносили 1мл 15%-го розчину CaCl₂ та доводили кислотність за допомогою 10%-го розчину HCl до 6,0-6,1 рН. Кожна пробірка містила 10 мл молока та знаходилась на водяній бані при 35°C. Після цього у кожную пробірку вносили 1 мл КФ. Добре перемішували та ставили у водяну баню. За часом зсідання молока судили про МЗА. Розрахунок МЗА проводили за формулою, запропонованою Типографом Д.Я. та Петіної Т.А [5]:

$$MCA_{\text{кф}} = \frac{40 \times 100 \times K}{\Pi} \text{ од/мл,}$$

де 40 - середній (у хвилинах) час згортання молока, прийнятий в технології виробництва сирів; K - коефіцієнт розведення культурального фільтрату; Π - час (у хвилинах), за який зі 100мл спеціально підготовленого молока (рН-6,0; t°-35°C) утворюється згусток.

Отриманні результати (табл.) свідчать про те, що штам БН-3 *I. lacteus* починаючи з 3 добовою віку синтезує у середовище фермент молокозсідальної дії, активність якого становить 24,8хв. Потім поступово збільшується активність з 4,3хв. на 6 добу до 40 секунд на 21. На 30 добу культивування штаму БН-3 активність ферменту молокозсідальної дії становить 1,1хв.

Таблиця

Динаміка синтезу ферменту молокозсідальної дії штаму БН-3 *I. lacteus*.

Вік культури, доба	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
МЗ активність, секунд	1485	260	130	80	55	48	40	45	51	67

Отримані результати свідчать про те, що активність протеїназ молокозсідальної дії залишається на високому рівні протягом усього часу культивування продуцента. Виявлена здатність штаму БН-3 *I.lacteus* може бути використана для його промислового культивування з метою одержання ферменту молокозсідальної дії.

Таким чином, нами отримано новий активний штам-продуцент (родина *Porciaceae*, род *Irpex* Fr.) ферменту молокозсідальної дії, який здатний синтезувати більш активний фермент у порівнянні з прототипом *Irpex lacteus* Fr. Д-4.

Джерела інформації.

1. Белки, ферменты и стерилы базидиальных грибов/Под ред. О.П Низковской. Л.: Наука, 1979. -72с.
2. Федоров Н.И., Стайченко Н.И. Целлюлозная активность корневой губки // Микол. и фитопатол. -1971. -Т.5, №3. -С.308-310.
3. Штамм *Hirschioporus laricinus* M-81 (Kafst.) Ryv. - продуцент молокосвертывающего фермента: А.с. 1211288 СССР, МКИ С12N9/58, С12N15/00./ Бойко М.И., Негруцкий С.Ф., Мирошниченко Т.И., Соболев М.А., Варенко Ю.С. (СССР). -№3787001/28-13; Заявл. 18.05.84; Оpubл. 15.06.85.
4. Пат. 34088А Україна, МКВ С12N9/50, А23С19/032. Штам соматичних культур макроміцету *Irpex lacteus* Fr. - Д-4 продуцент молокозсідального ферменту: Пат. 34088А Україна, МКВ С12N9/50, А23С19/032 / Бойко С.М., Бойко М.І., Єфанова І.Л. -№99063016; Заяв. 02.06.99; Оpubл. 15.02.01.
5. Типограф Д.Я., Петина Т.А. Условия культивирования гриба *Aspergillus candidus* штамм П и его ферментативный комплекс.// Прикл. биохим. и микробиол. -1966. -2, №4. -С.417-424.
6. Шварцман С.Р. Флора споровых растений Казахстана. Т.IV. Алма-Ата: Издательство академии наук Казахской ОСУ, 1964. -715с.