

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 577.151.52:582.284

ШТАММОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СИНТЕЗА СПЕЦИФИЧЕСКИХ
МОЛОКОСВЁРТЫВАЮЩИХ ПРОТЕИНАЗ У БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА
IRPEx LACTEUS

О.В. Чемерис*, В.В. Рашевский, К.А. Галкова, М.И. Бойко

кафедра физиологии растений биологического факультета ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»;

Украина, 83050, г. Донецк, ул. Щорса, д. 46

*e-mail: chemeris07@rambler.ru

Изучена способность к синтезу протеиназ молокосвёртывающего (сычужного) действия у 8 штаммов базидиального гриба *Irpex lacteus*. Установлено, что исследованные штаммы *I. lacteus* отличаются между собой по ферментативной активности культуральной жидкости. Максимальная молокосвёртывающая активность штаммов *I. lacteus* 2425, 2426 и 2427 наблюдалась в экспоненциальную фазу роста на 15-е сутки культивирования на глюкозо-пептонной среде. Данные штаммы *I. lacteus* являются наиболее перспективными продуцентами энзимов сычужного действия для дальнейшего исследования и практического использования. Штаммы *I. lacteus* 2421, 2422, 2423, 2424 и 2428 проявили более низкие значения ферментативной активности и требуют дополнительных исследований по подбору оптимальных условий культивирования.

Ключевые слова: базидиомицет *Irpex lacteus*, штаммы, молокосвёртывающая (сычужная) активность, экзопроотеиназы, продуцент, культуральная жидкость.

В последнее время учёные уделяют особое внимание исследованию протеолитических ферментов высших базидиальных грибов [1–4], которые широко используются во многих странах мира. Наиболее актуальными являются исследования, связанные с поиском и получением заменителей сычужного фермента животного происхождения — реннина (химозина). Замена общепризнанного, но слишком дорогого сычужного (молокосвёртывающего) фермента микробными или грибными протеазами узкого специфического действия, является экономически выгодным и перспективным направлением сыроварения [5, 6].

Многочисленные исследования показали, что базидиальные грибы являются активными продуцентами протеиназ сычужного действия, которые по своим свойствам не уступают ферментам животного происхождения [7–10]. Наиболее активными продуцентами реннина являются грибы *Phellinus chrysoloma*, *Kuehneromyces mutabilis* и *Ganoderma applanatum* [7], *Schizophyllum commune* [11], *Irpex lacteus* [5, 6, 12], *Pleurotus ostreatus* [13], *Cerrena* sp. и *Coprinus lagopides* [14]. Большинство базидиомицетов не спороносят в культуре и являются съедобными. Особый интерес представляет собой возможность использования культуральной жидкости таких грибов для получения ферментных препаратов — протеиназ молокосвёртывающего действия.

Исследований по выделению заменителей сычуга из высших грибов проведено недостаточно. Японскими учёными были исследованы 44 штамма базидиомицетов на способность синтезировать молокосвёртывающий фермент. Было установлено,

что два вида грибов — *Irpex lacteus* и *Fomitopsis pinicola* — образуют протеиназы, которые являются хорошими заменителями сычужных энзимов [9]. Причем гриб *I. lacteus* является наиболее перспективным, так как его культуральная жидкость показала высокую активность ферментов сычужного действия, а по характеру действия ферментный препарат наиболее близок к животному реннину.

Ежегодно выделяется большое количество штаммов чистых культур базидиомицетов. Однако только некоторые представители из этих выделенных штаммов могут составить конкуренцию сычужному ферменту и быть перспективными для дальнейших исследований. Разные штаммы одного вида гриба могут проявлять значительную изменчивость в процессах синтеза биологически активных веществ.

В связи с этим целью наших исследований была оценка штаммовой изменчивости новых штаммов базидиального гриба *I. lacteus* к синтезу фермента сычужного (молокосвёртывающего) действия и отбор среди них наиболее активных продуцентов.

Материалы и методы

Объекты исследования и условия культивирования. Скрининг продуцентов ферментов молокосвёртывающего действия проводили на 8 штаммах базидиального гриба *I. lacteus* (Fr.) Fr. 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428 из коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины (Национальное достояние Украины).

Штаммы гриба культивировали глубинным способом в статических условиях на жидкой питательной среде следующего состава (г/л): глюкоза — 10, пептон — 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, KH_2PO_4 — 0,6, K_2HPO_4 — 0,4, CaCl_2 — 0,05, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001 (“Реакхим”, Россия). Кислотность питательной среды доводили до значения pH 4,0 с помощью 10 %-го раствора HCl. Культивирование штаммов проводили при температурах, оптимальных для роста.

Определение молокосвёртывающей активности культуральной жидкости. Активность протеиназ молокосвёртывающего действия в культуральной жидкости штаммов *I. lacteus* проводили через каждые 5 сут, начиная с 5-х и заканчивая 25-ми сут культивирования, по методу Каваи и Мукаи [9]. За единицу молокосвёртывающей активности (МСА) принимали такое количество фермента, которое створаживает 100 мл молока за 40 мин при 35°C.

Определение белка в культуральной жидкости. Содержание белка в культуральной жидкости определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия) [15], используя формулу Лайне [16].

Определение абсолютно сухой биомассы. Накопление биомассы штаммов *I. lacteus* определяли весовым методом. Мицелий штаммов отделяли фильтрованием от культуральной жидкости и высушивали при 105°C до постоянного веса.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Все исследования проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью дисперсионного анализа, а сравнение средних арифметических величин — с помощью критерия Дункана [17].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлено распределение молокосвёртывающей активности культуральной жидкости исследованных штаммов *I. lacteus* по времени. На 5-е сут культивирования молокосвёртывающая активность культуральной жидкости штаммов *I. lacteus* составляет 18,87–135,16 Е/мл. При этом для штаммов *I. lacteus* 2421, 2422, 2424, 2425 уровень ферментативной активности ниже, чем для штаммов 2423, 2426, 2427 и 2428. На 10-е сутки культивирования штаммов *I. lacteus* 2421, 2422, 2423, 2424, 2425 молокосвёртывающая активность их культуральной жидкости возрастает в два и более раз; для штамма 2428, напротив, наблюдается снижение активности почти в два раза; а для штаммов *I. lacteus* 2426 и 2427 максимальная активность фермента приходится на 5-е сут, на 10-е сут происходит её снижение. При дальнейшем культивировании молокосвёртывающая активность культуральной жидкости штаммов данного гриба повышается. Повышение уровня ферментативной активности на 30% отмечается для штаммов 2421, 2424, снижение — для штамма 2423. Максимальные значения

уровня молокосвёртывающей активности культуральной жидкости (210,74–290,18 Е/мл) зафиксированы для штаммов *I. lacteus* 2425, 2426 и 2427 на 15-е сут культивирования. Дальнейшее культивирование гриба *I. lacteus* приводит к постепенному снижению молокосвёртывающей активности протеиназ штаммов 2421, 2422, 2425, 2426 и 2427. Для штамма 2428 ферментативная активность культуральной жидкости значительно снижается. Исключение составляют штаммы *I. lacteus* 2423 и 2424, уровень сычужной активности которых повышается на 25-е сут культивирования до значений 212,52 Е/мл и 220,45 Е/мл, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что штаммы одного гриба отличаются по синтезу специфического молокосвёртывающего фермента. Такая изменчивость может быть следствием различия условий, необходимых для культивирования штаммов гриба *I. lacteus*, — начальные значения pH питательной среды одинаковые, а температурные режимы, необходимые для оптимального роста, различаются. Изученные штаммы можно условно разделить на две группы. Первая группа — штаммы 2425, 2426, 2427, проявляющие высокую молокосвёртывающую активность на уровне 210–290 Е/мл, вторая группа — штаммы 2421, 2422, 2423, 2424, 2428 с низкой активностью на уровне 100–150 Е/мл. В то же время анализ литературы показал, что штаммы гриба *I. lacteus* значительно превышают показатели культур *Coprinus lagopides* и *Cerrena* sp., отобранных в качестве потенциальных продуцентов молокосвёртывающих ферментов [14].

Содержание белка в культуральной жидкости исследуемых штаммов показано на рис. 2. Можно отметить, что на 5-е сут культивирования базидиомицета уровень содержания белка соответствует уровню контроля или ниже его, что указывает на использование белка грибом. При дальнейшем выращивании грибов на 10-е и 15-е сут происходит значительное повышение белка в культуральной жидкости штаммов *I. lacteus* 2423, 2425, 2426 и 2427. Именно в этот период наблюдается высокая молокосвёртывающая активность культуральной жидкости изученных штаммов, что свидетельствует об активном синтезе экзопротеиназ молокосвёртывающего действия. Для штаммов *I. lacteus* 2421, 2422, 2424 и 2428 наряду с синтезом экзопротеиназ сычужного действия происходит и активное потребление белка, содержащегося в исходной питательной среде.

На рис. 3 представлены данные накопления абсолютно сухой биомассы исследуемыми штаммами *I. lacteus*. Установлено, что активный рост базидиомицетов приходится на 5–25 сут. Экспоненциальная фаза роста мицелия наблюдается на 5–15 сут культивирования. Именно в этот период происходит значительное повышение молокосвёртывающей активности культуральной жидкости штаммов *I. lacteus*. Для штаммов 2421, 2422, 2423

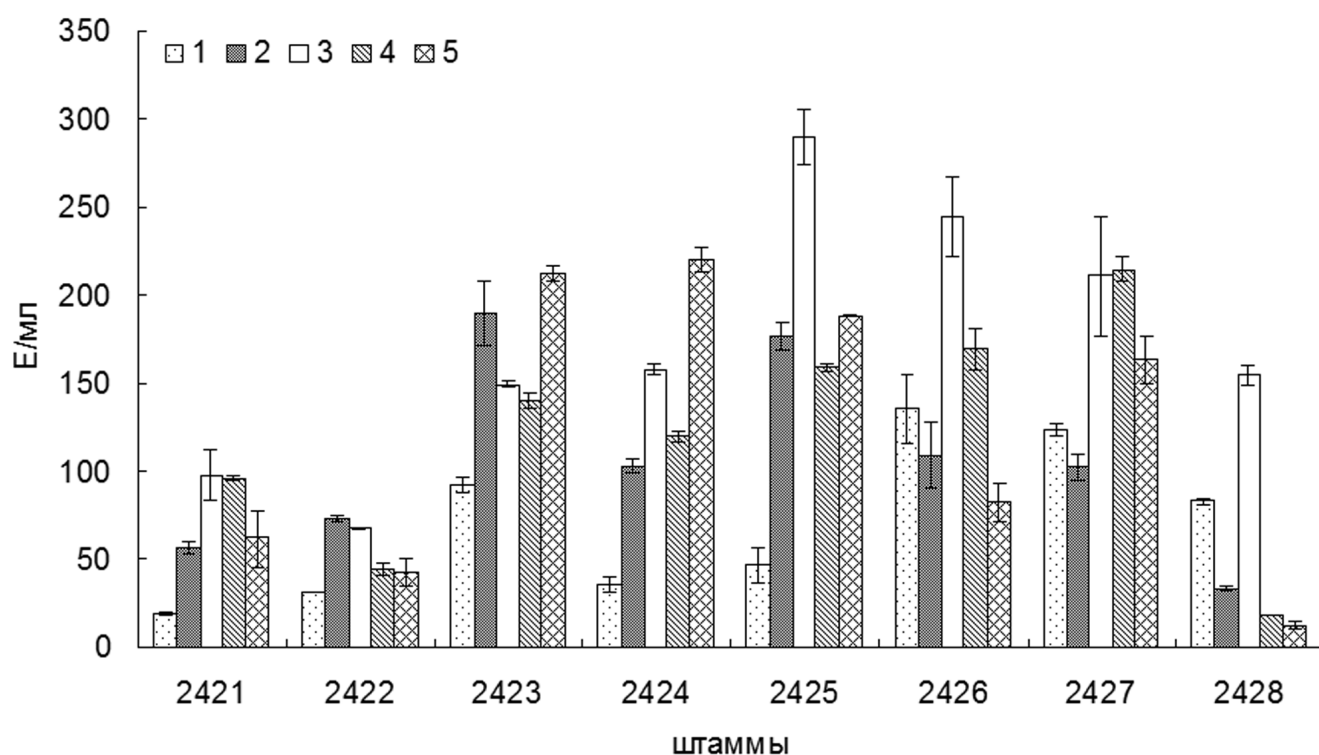


Рис. 1. Молокосвертывающая активность культуральной жидкости штаммов *Irpex lacteus*:
1 — 5-е сутки, 2 — 10-е сутки, 3 — 15-е сутки, 4 — 20-е сутки, 5 — 25-е сутки

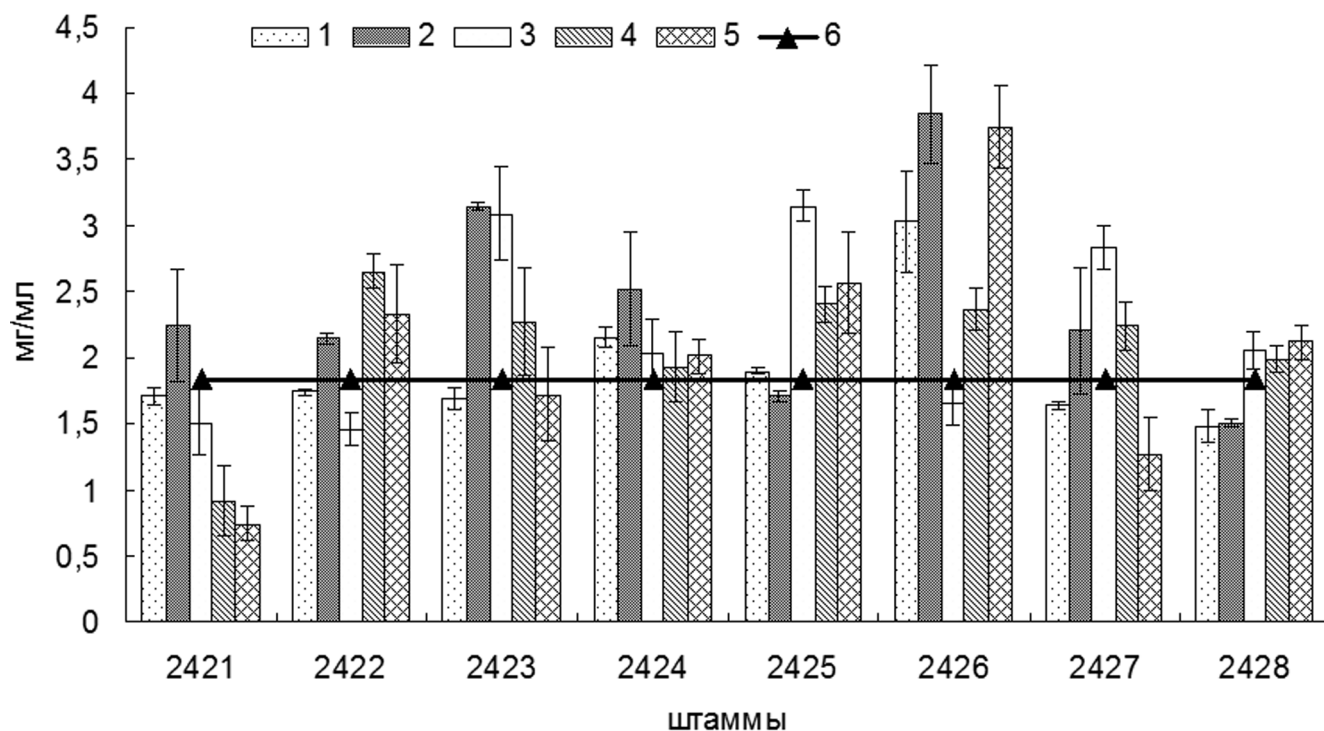


Рис. 2. Содержание белка в культуральной жидкости штаммов *Irpex lacteus*:
1 — 5-е сутки, 2 — 10-е сутки, 3 — 15-е сутки, 4 — 20-е сутки, 5 — 25-е сутки, 6 — контроль

характерен выход на стационарную фазу роста базидиомицета на 10-е сут. Для штаммов 2424 и 2428 *I. lacteus* на 25-е сут культивирования наблюдается достоверное уменьшение накопления биомассы, что указывает на процессы автолиза. Также было установлено, что в процессе культивирования

штаммов *I. lacteus* pH культуральной жидкости незначительно смещается в слабокислую сторону — к значениям 5,0, что, вероятно, связано с выделением в преобладающем количестве метаболитов со слабощелочными свойствами. Необходимо отметить, что высокий выход биомассы изученных

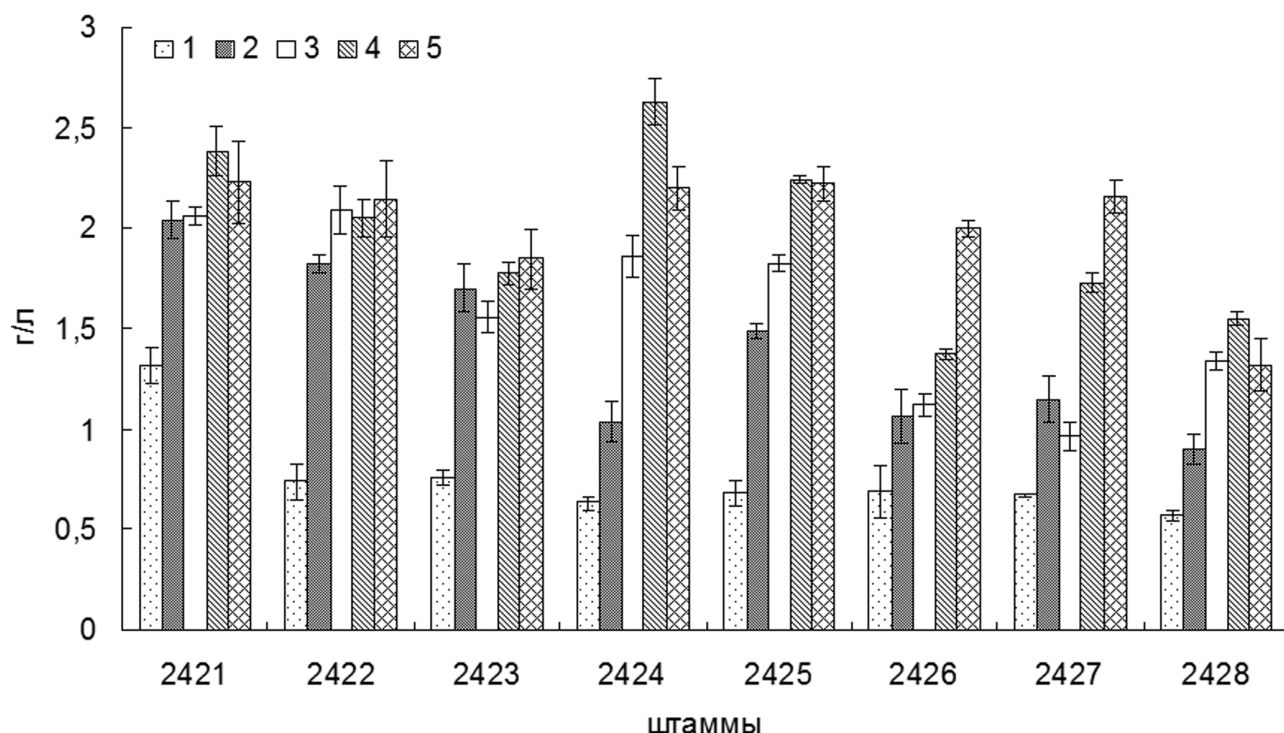


Рис. 3. Накопление абсолютно сухой биомассы штаммами *Irpex lacteus*:
1 — 5-е сутки, 2 — 10-е сутки, 3 — 15-е сутки, 4 — 20-е сутки, 5 — 25-е сутки

штаммов не совпадает с максимальными значениями молокосвёртывающей активности культуральной жидкости.

Таким образом, исследованные штаммы *I. lacteus* проявляют индивидуальные особенности синтеза экзопроотеиназ сычужного действия. При этом среди 8 штаммов гриба наиболее активными продуцентами молокосвёртывающего фермента являются штаммы гриба *I. lacteus* 2425, 2426 и 2427, поэтому они представляют теоретический и практический интерес для дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waderkar R.V., North M.J., Watkinson S.C. Proteolytic activities in two wood-decaying basidiomycetes fungi, *Serpula lacrimans* and *Coriolus versicolor* // Microbiology. 1995. Vol. 141. N 7. P. 1575–1583.
2. Sabotić J., Trček T., Popović T., Brzin J. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity // J. Biotechnol. 2007. Vol. 128. N 2. P. 297–307.
3. Kudryavtseva O.A., Dunaevsky Ya.E., Kamzolkin O.V., Belozersky M.A. Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xilotrophic basidiomycetes // Microbiology. 2008. Vol. 77. N 6. P. 643–653.
4. Nakamura M., Iketani A., Shioi Yu. A survey of proteases in edible mushrooms with synthetic peptides as substrates // Microscience. 2011. Vol. 52. N 4. P. 234–241.
5. Kobayashi H., Kusakabe I., Murakami K. Milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* as a calf rennet substitute for cheddar cheese manufacture // Agric. Biol. Chem. 1985. Vol. 49. N 6. P. 1605–1609.
6. Kikuchi E., Kobayashi H., Kusakabe I., Murakami K. Suitability of milk clotting enzyme from *Irpex lacteus* for gouda cheese manufacture // Jpn. J. Zootech. Sci. 1988. Vol. 59. N 6. P. 532–540.
7. Nerud F., Mišurkova Z., Muzilek V. Production of milk-clotting enzymes by basidiomycetes // Folia Microbiol. 1989. Vol. 34. N 4. P. 310–315.
8. Kobayashi H., Kim H., Iton T., Kasamo K., Kusakabe I., Murakami K. Screening for milk-clotting enzymes from basidiomycetes // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. Vol. 58. N 2. P. 440–441.
9. Kawai M., Mukai N. Studies on milk clotting enzymes produced by basidiomycetes. I. Screening test of basidiomycetes for the production of milk clotting enzymes // Agric. Biol. Chem. 1970. Vol. 34. N 2. P. 159–163.
10. Kawai M. Studies on milk clotting enzymes produced by basidiomycetes. II. Some properties of basidiomycete milk clotting enzyme // Agr. Biol. Chem. 1970. Vol. 34. N 2. P. 164–169.
11. Okamura-Matsui T., Takemura K., Sera M., Takeno T., Hiroko H., Fukuda Sh., Ohsugi M. Characteristics of a cheese-like food produced by fermentation of the mushroom *Schizophyllum commune* // J. Biosci. Bioeng. 2001. Vol. 92. N 1. P. 30–32.
12. Kobayashi H., Kasamo K. Crystalization and preliminary X-ray diffraction studies of aspartic proteinase from *Irpex lacteus* // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 226. N 4. P. 1291–1293.

13. Lebedeva G.V., Proskuryakov M.T. Purification and characterization of milk-clotting enzymes from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm) // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. Vol. 45. N 6. P. 623–625.

14. Dmitriyeva T., Korchmaryova A., Denisova N., Shamt-syan M. Milk-clotting enzymes of higher basidiomycetes // Biotechnology: state of the art and prospects for development / Eds. G.E. Zaikov. N.Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2008. P. 49–57.

15. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.

16. Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins // Methods Enzymol. 1957. Vol. 3. P. 447–455.

17. Приєдський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: навч. Посібник. Донецьк: Кассіопея, 1999. 210 с.

Поступила в редакцию 19.07.2016

Принята в печать 26.08.2016

MYCOLOGY AND ALGOLOGY

VARIABILITY OF STRAINS OF BASIDIOMYCETES *IRPEX LACTEUS* TO SYNTHESIS OF SPECIFIC MILK-CLOTTING PROTEINASES

O.V. Chemeris, V.V. Rashevskiy, K.A. Galkova, M.I. Boyko*

Department of Plant Physiology, School of Biology, SEI HPE "Donetsk National University", Shchorsa ul. 46, Donetsk, 83050, Ukraine

**e-mail: chemeris07@rambler.ru*

The ability to synthesize of milk-clotting (rennet) proteinase in 8 strains basidiomycetes *I. lacteus* was studied. It is found that the investigated strains of *I. lacteus* differ in enzyme activity of the culture liquid. Maximum milk-clotting activity of strains *I. lacteus* 2425, 2426 and 2427 was observed in the exponential growth phase on the 15th day of cultivation on glucose-peptone medium. These strains of *I. lacteus* are the most perspective producers of the milk-clotting enzymes for further research and practical application. Strains of *I. lacteus* 2421, 2422, 2423, 2424 and 2428 showed lower values of enzymatic activity and require additional research on the selection of the optimal culture conditions.

Keywords: *basidial fungus Irpex lacteus, strains, milk-clotting (rennet) activity, exoproteinases, producer, cultural filtrate.*

Сведения об авторах

Чемерис Оксана Вячеславовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии растений биологического факультета ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет». Тел. +38 (062) 302-09-93; e-mail: chemeris07@rambler.ru

Рашевский Владислав Вадимович — студент биологического факультета ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет». Тел. +38 (062) 302-09-93; e-mail: vladdomein@mail.ru

Галкова Кристина Анатольевна — студент биологического факультета ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет». Тел. +38 (062) 302-09-93; e-mail: kristi.galkova@yandex.ua

Бойко Михаил Иванович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии растений биологического факультета ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет». Тел. +38 (062) 302-09-93; e-mail: prof_bmi@mail.ru