

Таблица 2 - Биохимические показатели крови

Показатели	Группы животных	
	1-я опытная	2-я опытная
	Содержание	
	в помещении	в помещении
На начало опыта		
Общий белок, г /л	77,68±2,20	79,20±1,17
Кальций, ммоль/л	2,56±0,06	2,59±0,04
Фосфор, ммоль/л	1,68±0,03	1,71±0,12
Каротин, мкмоль/л	7,95±0,57	8,22±0,49
На конец опыта		
	на пастбище	в помещении
Общий белок, г /л	78,85±1,72	82,68±1,66
Кальция, ммоль/л	3,02±0,04 ^{xxx}	2,51±0,09
Фосфор, ммоль/л	1,66±0,08	1,85±0,09
Каротин, мкмоль/л	12,45±0,24	11,73±0,47

Примечание: уровень достоверности ^{xxx} - $P < 0,001$.

Закключение. Проведенными исследованиями установлено, что содержание коров на пастбище для хозяйства оказалось более эффективным, чем беспривязно-боксовое содержание. Так как среднесуточный удой у коров первой опытной группы был выше, себестоимость полученного молока снизилась, а прибыль, соответственно, увеличилась. Рентабельность молока в двух группах оказалась положительной, но в 1 опытной группе она была выше, чем во второй, на 0,25 п.п. и составила по группам, соответственно, 11,25 и 11,0%.

Литература. 1. В стойле или на пастбище? // Новое сельское хозяйство. – 2005. – № 1. – С. 68–69. 2. Дедов, М. Увеличение производства молока и повышение его качества в летний период / М. Дедов, Н. Сивкин // Зоотехния. – 2004. – № 8. – С. 21–24. 3. Основы пастбищного кормления и содержания крупного рогатого скота // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. – 2007. – № 4. – С. 35–41. 4. Пора большого молока / Н. Попков [и др.] // Белорусское сельское хозяйство. – 2002. – № 1. – С. 35–38. 5. Рубина, М. В. Эффективность получения молока при разных системах содержания коров / М. В. Рубина // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сборник научных трудов. – Горки : БГСХА, 2017. – Вып. 20, Ч. 2. – С. 122–129. 6. Физиологические и технологические аспекты повышения молочной продуктивности / Н. Мотузко [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2009. – 490 с. 7. Шматко, Н. Экономическая эффективность различных способов пастбищного содержания коров / Н. Шматко // Агроекономика. – 2001. – № 9. – С. 11–12.

Статья передана в печать 09.08.2018 г.

УДК 582.287.238:608.2

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА, ОБЛАДАЮЩЕГО МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ *PLEUROTUS OSTREATUS*

Сакович В.В., Груша А.М., Жерносеков Д.Д.

УО «Полесский государственный университет», г. Пинск, Республика Беларусь

Подобрана питательная среда и оптимальные условия для глубинного культивирования *Pleurotus ostreatus*. Проведена первичная очистка сычужных ферментов культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus*.
Ключевые слова: культуральная жидкость, базидиомицеты, протеолитические ферменты.

METHODOLOGICAL RECOMMENDATIONS TO OBTAIN THE PREPARATION POSSESSING MILK-CLOTTING ACTIVITY FROM *PLEUROTUS OSTREATUS*

Sakovich V.V., Hrusha A.M., Zhernosekov D.D.

Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus

The nutrient medium and optimal conditions were selected for submerged liquid cultivation of *Pleurotus ostreatus*. The primary purification of the rennet enzyme from the culture liquid of *Pleurotus ostreatus* was carried out for the first time. **Keywords:** medium liquid, basidiomycetes, proteolytic enzymes.

Введение. Получение сычужных ферментов в молочной промышленности сопряжено с использованием в качестве исходного материала отделов желудка телят и ягнят. Естественно, что при крупномасштабном производстве такой путь не является рациональным. Таким образом, поиск альтернативных источников для получения ферментов, обладающих молокосвертывающей активностью, является актуальной проблемой для отечественной и зарубежной молочной промышленности. Одним

из перспективных источников рассматривают базидиальные грибы [1]. Показано, что среди этих грибов имеются активные продуценты молокосвертывающих протеиназ [2]. В ходе исследований было установлено, что экстракт плодовых тел *Pleurotus ostreatus* имеет определенное сходство с препаратами, используемыми в молочной промышленности, и после проведения очистки может быть применен в сыроделии при производстве сыра [3, 4, 5, 6]. Однако использование плодовых тел *Pleurotus ostreatus* не дает возможности контролировать санитарно-микробиологическое состояние грибного препарата на всех этапах его получения. В этом плане более перспективным может быть использование культуральной жидкости и культурального мицелия. В предыдущих исследованиях в препаратах культуральной жидкости обнаружена протеолитическая активность по отношению к ряду субстратов (казеин, желатин, фибриноген и гемоглобин) [7]. Однако, целенаправленное изучение молокосвертывающей активности и очистки ферментного препарата в данной работе не проводились. В нашем исследовании проведен подбор питательной среды и оптимальных условий для глубинного культивирования *P. ostreatus*, а также предложены методы для очистки ферментного препарата, обладающего молокосвертывающей активностью.

Материалы и методы исследований. Эксперименты выполнены на «диком» штамме *P. ostreatus*, который был выделен из плодовых тел, растущих на культурном тополе (*Populus* sp.). В ходе исследований использовали картофельно-сахарозную, свекольную, морковную, капустную среды, а также раствор неферментированного солода. Высадка мицелия происходила под ламинарным боксом для минимализации риска контаминации. Инокулюм вводили в виде фрагментов ковра стоккультуры мицелия площадью 1 см². Культивирование велось в течение 14 дней в темноте при температурах 26, 27 и 28°C на шейкере модели Wise Shake SHO при 70 и 100 об/мин. По окончании инкубации отбирали культуральную жидкость и замораживали. Мицелий обезвоживали в сухожаровом шкафу при температуре 37°C и взвешивали. Культуральную жидкость использовали без дополнительного разведения.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, предполагая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует $A_{280}=1$ оптической единице в кювете, имеющей толщину 1 см [8].

Молокосвертывающую активность (МСА) определяли по общепринятой методике: пробирку с субстратом (объем молока 10 мл), содержащим 0,0015 М раствор $CaCl_2$, нагревали до 35°C и вносили 2 мл исследуемого ферментного препарата. Активность препарата оценивали по времени образования плотного молочного сгустка. За единицу МСА принимали количество фермента, которое сворачивает 100 мл молока за 40 мин. при 35°C [9].

Общую протеолитическую активность (ПА) определяли по лизису желатина в тонком слое агарового геля [4]. Объем образца, наносимого на белок-агаровые пластины, составлял 10 мкл. Активность препарата рассчитывали, измеряя площадь белок-агаровых пластинок с гидролизованным субстратом вокруг каждой лунки. За 1 единицу активности (Е) фермента принимали такую активность, которая обуславливает гидролиз субстрата на участке геля размером 1 см² [10].

Для очистки протеолитических ферментов из культуральной жидкости применялся метод высаливания с использованием двух солей различных концентраций: сульфата аммония и хлорида натрия. Для удаления соли применялся метод диализа.

Для длительного хранения препарата использовали метод лиофильной сушки при сочетании температуры -51°C и давления 1.370 mBar.

Катионообменную хроматографию проводили на колонке (1,5 X 3) с КМ-сефарозой (Bio-Rad, США), уравновешенной 0,2 М ацетатным буфером pH 5,0. Элюцию проводили ступенчатым градиентом со следующими концентрациями NaCl: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1М, со скоростью 10 мл/ч.

Анионообменную хроматографию проводили на колонке (1,5 X 3) с DEAE-сефарозой (Bio-Rad, США), уравновешенной 0,2 М ацетатным буфером pH 5,0. Элюцию проводили ступенчатым градиентом со следующими концентрациями NaCl: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1М, со скоростью 10 мл/ч.

Результаты исследований. Урожайность *P. ostreatus* при культивировании в колбах использованием различных сред на шейкере показана в таблице 1.

Наибольший урожай (22,4 г/л по сухой массе) получен на картофельно-сахарозной среде при температуре 27°C и перемешивании 70 об/мин. Урожайность мицелия при глубинном культивировании в колбах на шейкере оказалась высокой, максимальные показатели урожая отвечают требованиям к грибам-продуцентам – не менее 10 г/л по сухой массе. Объем питательной среды в колбе составлял 200 мл. Во всех вариантах наших экспериментов наблюдался рост гриба только в виде шариков.

Нами был также проведен первый этап очистки ферментов. Для высаливания энзимов культуральной жидкости *P. ostreatus*, использовались две соли: сульфат аммония и хлорид натрия. Ранее, по литературным данным, производилось высаливание этими солями ферментов из экстрактов плодовых тел и мицелия [6]. Использование сульфата аммония в нашем случае не привело к желаемому результату. В связи с тем, что методика высаливания ферментов из культуральной жидкости *P. ostreatus* отсутствует, нами были подобраны оптимальные условия. Наилучший результат дало полное насыщение раствора хлоридом натрия, температура - 4°C, pH - 4,7, перемешивание - 60 об/мин и 12 ч. Осаждение хлоридом натрия в нашем случае имеет еще одно явное преимущество при дальнейшем использовании ферментного препарата в пищевой промышленности: данная соль является

удобным и нетоксичным реагентом. После высаливания был проведен диализ. Условия диализа также были установлены экспериментально: температура - 4°C, перемешивание - 60 об/мин и 20 ч. Также для этих этапов очистки был подобран оптимальный буферный раствор: 0,1 М ацетатный рН 4,7, в котором сохраняется активность ферментов. Молокосвертывающая активность определялась на каждом этапе очистки.

Таблица 1 – Результаты культивирования в колбах на шейкере

Питательная среда	Средняя температура инкубации, °С	Перемешивание, об/мин	Масса гриба через 2 недели культивирования	
			сырая, г/л	сухая, г/л
Раствор солода	27	100	112	11,2
Раствор солода	27	70	212	16,2
Раствор солода	28	100	75	3,5
Раствор солода	28	70	81	4,9
Картофельно-сахарозная	27	70	315	22,4
Картофельно-сахарозная	27	100	298	19,8
Картофельно-сахарозная	28	100	70	3,3
Картофельно-сахарозная	28	70	98	5,2
Морковная	27	100	52	2,4
Морковная	27	70	92	2,85
Морковная	28	100	78	3,9
Морковная	28	70	104	5,4
Свекольная	27	100	54	2,2
Свекольная	27	70	113	7,7
Свекольная	28	100	53	1,8
Свекольная	28	70	94	4,9
Капустная	27	100	71	3,5
Капустная	27	70	85	4,0
Капустная	28	100	48	2,1
Капустная	28	70	75	3,7

Первый этап очистки культуральной жидкости позволил сохранить практически всю исходную молокосвертывающую активность, что показано в таблице 2.

Таблица 2 – Начальные этапы очистки молокосвертывающих ферментов *P. ostreatus*

Фракция	Объем, мл	Белок мг/мл	МСА во фракции, ед/мл	Общая МСА	Удельная МСА	Степень очистки
Культуральная жидкость	200	0,185	5	1000	27	1
Осаждение хлоридом натрия	50	0,22	5	250	22,7	0,84
Раствор лиофильного порошка	5	1,07	33	165	30,8	1,14

Часть лиофильного порошка использовали для дальнейшей очистки препарата, содержащего МСА и ПА на ионообменниках (КМ- и ДЭАЭ-сефароза).

Хроматография на КМ-сефарозе показала, что протеолитическая активность исходного препарата представлена тремя фракциями:

1. Ферменты, которые элюируются с колонки буфером без добавления соли.
2. Ферменты, которые элюируются с колонки буфером, содержащим от 0,1 до 0,25 М NaCl.
3. Ферменты, которые элюируются с колонки буфером, содержащим от 0,1 до 0,75 М NaCl, что показано на рисунке 1.

Очевидно, что в полученных фракциях содержатся ферменты, которые представлены группами белков с различными физико-химическими свойствами. Белки, содержащие в своем составе больше аминокислот с положительно заряженными R-группами, прочнее удерживаются на колонке с КМ-сефарозой.

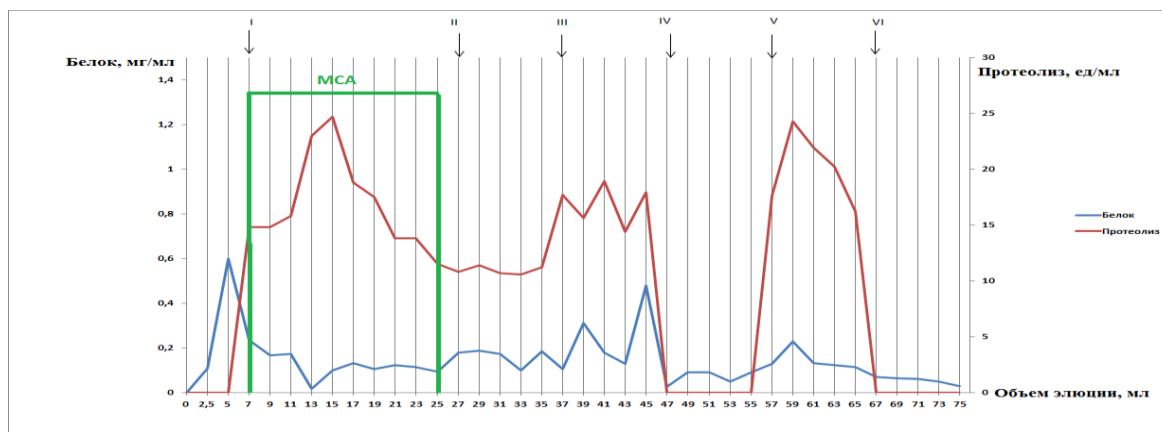


Рисунок 1 – График очистки молока свертывающих и протеолитических ферментов на КМ-сефарозе: МСА - показана на рисунке зеленым цветом, элюция 0,1 М ацетатным буфером pH 4,7: I - контроль, II - с добавлением 0,1 М NaCl, III - с добавлением 0,25 М NaCl, IV - с добавлением 0,5 М NaCl, V - с добавлением 0,75 М NaCl, VI - с добавлением 1 М NaCl

Таким образом, произошло частичное разделение молока свертывающей и общей протеолитической активности препарата.

Данный метод можно рекомендовать для дальнейших более детальных исследований свойств протеолитических ферментов, входящих в исходный препарат, например, субстратной специфичности.

При хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе фермент, обладающий МСА, не связывается с носителем, при этом достигается его очистка в 22,7 раза. Это обусловлено тем, что большинство белков (более 50% от общего количества белка, наносимого на колонку) связывается с анионообменником. Кроме того, в процессе хроматографического разделения происходит автоактивация ферментов или фермента, обладающего МСА. Данное явление обнаружено ранее для ферментного препарата, содержащего МСА из плодовых тел *P. ostreatus* [6]. Как видно из рисунка 2, при данном виде хроматографии МСА и общая протеолитическая активность не разделяются.

Хроматографию на DEAE можно рекомендовать для получения очищенного препарата фермента, для использования в молочной промышленности (сыроделии) на этапе получения сырного сгустка.

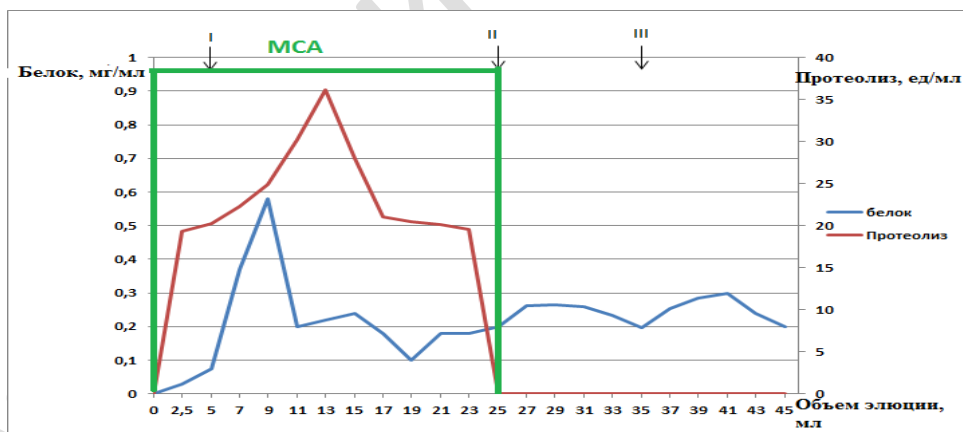


Рисунок 2 – График очистки молока свертывающих и протеолитических ферментов на DEAE-сефарозе: МСА - показана на рисунке зеленым цветом, элюция 0,1 М ацетатным буфером pH 4,7: I - контроль, II - с добавлением 0,5 М NaCl, III - с добавлением 1 М NaCl

Заключение. Нами подобраны среды и оптимальные условия для глубинного культивирования *P. ostreatus*. Проведен начальный этап очистки ферментного препарата из культуральной жидкости *P. ostreatus*, подобраны оптимальные параметры для максимального сохранения молока свертывающей активности в очищенном препарате. Установлено, что молока свертывающие ферменты сохраняют свою активность при высаливании 100% насыщенным раствором хлорида натрия при температуре 4°C, pH 4,7, перемешивании 60 об/мин и 12 ч и могут применяться в сыроделии на стадии образования сырного сгустка. Хроматографическое разделение МСА и ПА на КМ-сефарозе можно рекомендовать для дальнейших более детальных исследований протеолитических ферментов, входящих в исходный препарат. Очистку ферментного препарата, обладающего МСА, с помощью хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе предлагаем использовать в сыроделии на этапе образования сырного сгустка. Планируется дальнейшая очистка препарата, обладающего МСА, и изучение субстратной специфичности ферментов, входящих во фракции, разделяемые хроматографией на ионообменных носителях.

Литература. 1. Дьяконова, Г. В. Исследование некоторых физико-химических свойств молокосвертывающих ферментов вешенки обыкновенной : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.04 / Г. В. Дьяконова ; Кубанский государственный аграрный университет. – Ростов-на-Дону. – 2010. – 44 с. 2. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringaoleifera* flowers / V. Emmanuel [et all.] // *Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 135. – No. 6. – P. 1848-1854. 3. Esposito, M. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynarascolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease / M. Esposito // *Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 204. – No. 1. – P. 115-121. 4. Palmieri, G. Purification, characterization and functional role of novel extracellular protease from *Pleurostostreatus* / G. Palmieri, C. Bianco, G. Cennamo // *Applied and Environmental Microbiolog.* – 2001. – Vol. 67. – P. 2754–2759. 5. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withaniacoagulans* fruit / M. Salehi [et all.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – Vol. 98. – P. 847-854. 6. Лебедева, Г. В. Выделение и характеристика фермента сычужного действия из плодовых тел вешенки обыкновенной / Г. В. Лебедева, М. Т. Проскуряков, М. А. Кожухова // *Пищевая химия*. – 2008. – 114 с. 7. Влияние хлорида марганца (II) на протеолитическую активность гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании / О. Н. Жук, И. А. Ильючик, А. Д. Кульзавеня, В. Н. Никандров // *Вестник Полесского государственного университета. Серия природознавческих наук*. – 2017. – С. 62-68. 8. Рудакова, Н. Л. Секретируемая металллопротеиназа *Bacillus intermedius*: получение гомогенного препарата фермента и исследование физико-химических свойств / Н. Л. Рудакова // *Ученые записки Казанского государственного университета*. – 2010. – Т. 40, кн. 2. – С. 145-154. 9. ГОСТ ISO 11815-2015. Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента. – Москва : Стандартформ, 2015. – 10 с. 10. Никандров, В. Н. Методы исследования протеолиза. Глава 5 / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // *Современные проблемы биохимии. Методы исследований*. – Минск : Вышэйшая школа. – 2013. – С. 132-157.

Статья передана в печать 29.07.2018 г.

УДК 619:636.02:661.718.6:612.11

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ДОЗ НАНОГЕРМАНИЯ ЦИТРАТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ СОСТАВ КРОВИ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС-САМЦОВ F₂

Тесаривская У.И.

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, г. Львов, Украина

Изучали влияние различных концентраций наногермания цитрата (HGeЦ), полученного методом нанотехнологии, в дозах 20 и 200 мкг Ge/кг массы тела на организм крыс-самцов F₂, определяя биохимические и морфологические показатели крови. Показано, что длительное выпаивание с водой 200 мкг Ge/кг м. т. в период физиологического и полового созревания крыс-самцов F₂ в сравнении с животными контрольной группы статистически значимо уменьшает содержание гемоглобина в крови на 15%, а также снижает среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците на 4,9%. В сравнении с животными контрольной группы наблюдалась тенденция к снижению показателей белой крови у животных обеих опытных групп. Между опытными и контрольной группами установлена разница и в показателях лейкограммы. У животных первой опытной группы отмечено статистически значимое увеличение лимфоцитов на 7,5% и снижение эозинофилов – на 3%; у животных второй опытной группы - повышение лимфоцитов на 4,9%, а снижение нейтрофилов - на 3,3%. Применение животным HGeЦ вызывало статистически значимое уменьшение количества железа в сыворотке крови животных первой опытной группы на 51,4%, второй - на 28,1%. Общая железосвязывающая способность сыворотки крови у крыс-самцов F₂ первой опытной группы имеет тенденцию к снижению, однако у животных, которым применяли высокую концентрацию HGeЦ, к статистически значимому увеличению на 28,8%. Отмечено также статистически значимое увеличение остаточной Fe-связывающей способности сыворотки крови у крыс-самцов F₂ первой опытной группы на 113,5%, а также и уменьшение насыщения трансферрина у крови животных обеих опытных групп относительно показателей контрольной группы животных в 1,8 раза. Использование 20 мкг Ge/кг массы тела наногермания цитрата, по сравнению с животными контрольной группы, приводило к статистически значимому уменьшению активности фермента АЛТ на 24%, а также понижению уровня МСМ на 27,8%. Длительное выпаивание животным 200 мкг Ge/кг массы тела наногермания цитрата вызывало статистически значимое уменьшение активности АЛТ на 24%, АсАТ - на 17,9%, а также снижение уровня мочевины на 25,2%, креатинина - на 16,2% и МСМ - на 28,7%. **Ключевые слова:** морфология крови, биохимия сыворотки крови, цитрат Ge, наноматериалы, самцы, крысы.

INFLUENCE OF DIFFERENT DOSES OF NANOGERMANE CITRATE ON THE MORPHOLOGICAL COMPOSITION OF BLOOD AND BIOCHEMICAL PROCESSES IN THE ORGANISM OF F₂ MAIL RATS

Tesarivska U.I.

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, Lviv, Ukraine

The influence of different concentrations of nanogermanium citrate (HGeC), obtained by nanotechnology, was studied at the doses of 20 and 200 µg Ge / kg of b. m. on the organism of F₂ mail rats by determining the biochemical and morphological parameters of the blood. It was shown that continuous watering with 200 µg Ge / kg b.m. during the physiological and sexual maturation of male rats F₂ comparing with the control animals group statistically significant decreases the haemoglobin content in the blood by 15%, and also reduces the average concentration of haemoglobin in the erythrocyte by 4.9%. There was a tendency to decrease the white blood parameters in animals of both experimental