

УДК 52-337:637.136.3(045)

**ВПЛИВ ФІЗИЧНИХ МЕТОДІВ ОБРОБКИ НА АКТИВНІСТЬ
ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ *A. oryzae***

**О. О. БЕДЕНКО¹, Л. О. КОСОГОЛОВА¹, Л. Р. РЕШЕТНЯК¹,
П. П. ЛОШИЦЬКИЙ²**

¹Національний авіаційний університет, м. Київ

²Національний технічний університет України «КПІ», м. Київ

*Досліджено вплив електромагнітного випромінювання різних частот на протеолітичну активність *A. oryzae*. Найбільший ефект дії електромагнітного випромінювання виявлено за низькочастотного опромінення (100 Гц) протягом 10 хв.*

***Ключові слова:** *Aspergillus oryzae*, електромагнітне випромінювання наднизької, низької та надзвичайно високої частоти, протеолітична активність, ферментні препарати.*

Вступ. Виробництво ферментних препаратів займає одне з провідних місць у сучасній фармацевтичній біотехнології та відноситься до галузей, обсяг продукції яких постійно зростає.

У промислових масштабах ферменти отримують з рослинної, тваринної сировини та мікроорганізмів. Використання останніх має перевагу, оскільки підвищити продуктивність мікроорганізмів незрівнянно легше, ніж продуктивність рослин або тварин. Достатньо багато виробництв ферментних препаратів організовано на основі мікроскопічних грибів роду *Aspergillus*. До різних ферментів, що виробляються цими мікроскопічними грибами, належать і протеази [1, 2].

На сьогодні існує ряд протеолітичних ферментних препаратів, отриманих з таких культур мікроорганізмів, як *Aspergillus oryzae* [3]. Актуальним залишається отримання більш активних ферментних препаратів, що ставить перед біотехнологами ряд завдань на всіх етапах технологічного процесу, починаючи з селекції продуцентів і розробки оптимальних умов для їх культивування з метою отримання штаму з більш високим рівнем біосинтезу продукту [4–6].

Особливої уваги заслуговує вплив електромагнітного випромінювання (ЕМВ) на мікроорганізми наднизьких, низьких та надзвичайно високих діапазонів частот нетеплових інтенсивностей для встановлення можливості використання його з метою підвищення рівня біосинтезу протеолітичних ферментів [7].

Вплив електромагнітних полів на біологічні системи відбувається як через зміни у метаболізмі, так і через зміни специфічної та неспецифічної реактивності мікроорганізмів [8, 9]. Однак питання про конкретні структури, які сприймають електромагнітні поля досі є відкритим [10].

Метою дослідження було визначення впливу електромагнітного випромінювання різних частот на протеолітичну активність *A. oryzae* залежно від тривалості дії.

Матеріали та методи досліджень. При дослідженні впливу електромагнітного випромінювання на активність протеолітичних ферментів використовували мікроскопічний гриб *Aspergillus oryzae*.

Для досліду використовували поживне середовище Чапека [11].

В пробірку з культурою *A. oryzae* на твердому середовищі Чапека в стаціонарній фазі росту (на 7 добу культивування) заливали стерильну воду до верхнього краю скошеного агару. Проводячи бактеріологічною петлею по поверхні скошеного середовища, переносили у воду частину конідіального шару. Отриману водну суспензію конідій перемішували. Відбирали суспензію *A. oryzae* та вносили у пробірки з рідким поживним середовищем Чапека. Далі пробірки проходили процес опромінення.

Джерелом перемінного електромагнітного випромінювання наднизьких частот був магнітостимулятор МС-92, електромагнітне випромінювання низьких частот здійснювалось за допомогою генератору імпульсів Г 5-54, а генератором надзвичайно високих частот був прилад «Ораторія-IV».

Обробку клітин гриба ЕМВ проводили за наднизької частоти (50 Гц), низької частоти (100 кГц) та надзвичайно високої частоти (60 ГГц) упродовж 5, 10, 15, 20, 25 хв. Контрольні зразки знаходились за таких же самих умов без опромінення.

Кожну опромінену та контрольну пробірку ставили у термостат для інкубування при температурі 28 °С на 7 діб.

Основою визначення протеолітичної активності було вимірювання кількості тирозину, який утворився у результаті ферментативного гідролізу білка (модифікований метод Ансона). Протеолітичну активність виражали в од/мл [12, 13].

Результати та їх обговорення. При обробці суспензії *A. oryzae* ЕМВ наднизької частоти протягом 5 хв. ПА становила 8,4 од/мл, тобто спостерігалось збільшення ПА у порівнянні з контролем на 23,53 %, а при збільшенні тривалості опромінення до 10 та 15 хв., ПА мала менші значення у порівнянні з 5-ти хвилинною обробкою (7,32 та 7,38 од/мл відповідно), але більш високі значення у порівнянні з контролем (ПА збільшилась на 7,64 та 14,41 % відповідно). При 20-ти хвилинному опроміненні ПА становила 8,50 од/мл, а при 25-ти хвилинному – 9,32 од/мл, що мало максимальний позитивний вплив. Отже, ПА за 20-ти хвилинної обробки збільшилась на 25 %, а за 25-ти хвилинної підвищилась у порівнянні з контролем, на 37,05 % (рис. 1).

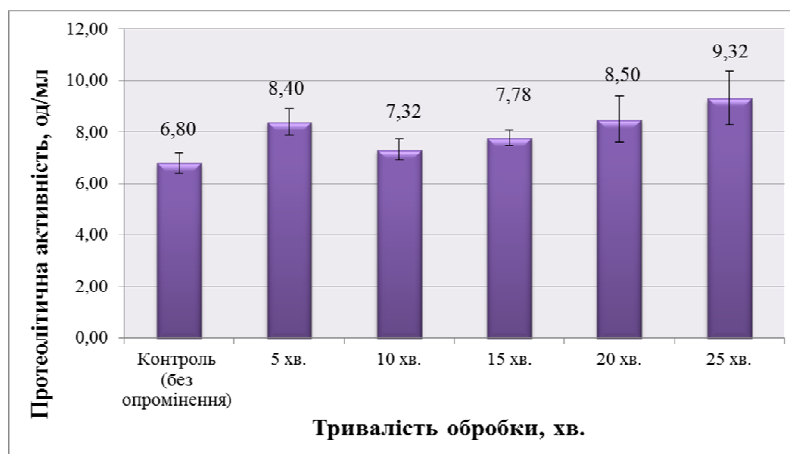


Рис. 1. Вплив ЕМВ наднизької частоти (50 Гц) на активність протеолітичних ферментів *A. oryzae*

Найбільший вплив ЕМВ на ПА *A. oryzae* спостерігався при обробці суспензії грибів наднизькою частотою. Вже при опроміненні впродовж 5 хв. спостерігалось підвищення ПА *A. oryzae* аж на 50 %, що становило 10,22 од/мл, а при обробці впродовж 10 хв. ПА набула максимального значення – 12,32 од/мл. Тобто величина ПА збільшилась на 81,17 %. При 15-ти та 20-ти хвилинному опроміненні ПА мікроскопічних грибів підвищилась до рівня 10,18 од/мл та 9,82 од/мл відповідно, або на 49,70 % та 44,41 % у порівнянні з контролем. 25-ти хвилинна обробка не мала суттєвих результатів, оскільки значення ПА становили 7,57 од/мл, що на 11,32 % більше ніж ПА у контрольному варіанті (рис. 2).

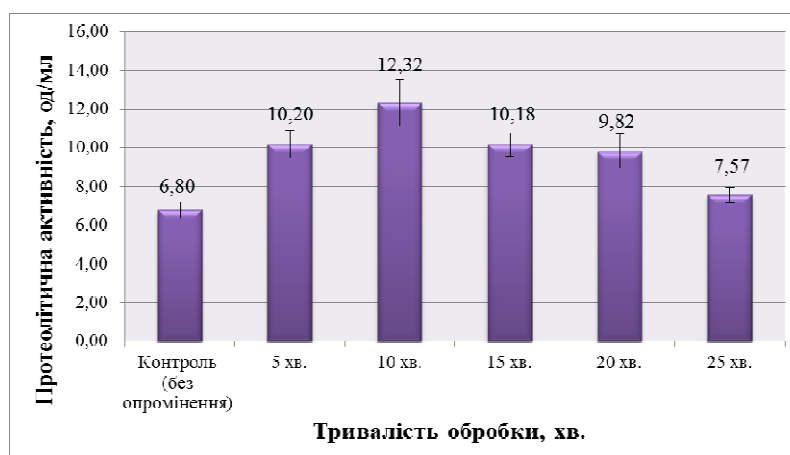


Рис. 2. Вплив ЕМВ низької частоти (100 кГц) на активність протеолітичних ферментів *A. oryzae*

При опроміненні суспензій *A. oryzae* перемінним електромагнітним випромінюванням надзвичайно високої частоти від 5 до 25 хв. було виявлено, що протеолітична активність вже при 5-ти хвилинній обробці підвищувалась на 42,05 % у порівнянні з контролем, що становило 9,66 од/мл. При 10-ти хвилинній обробці значення ПА збільшились на 55,15 % (10,55 од/мл). При 15-ти хвилинному опроміненні значення ПА досягло максимуму і становило 11,63 од/мл, тобто ми отримали підвищення ПА на 73,03 % порівняно з контролем. За 20-ти хвилинної обробки ПА суспензії грибів підвищилась на 43,24 % (9,74 од/мл), в той час як за 25-ти хвилинного опромінення ПА підвищилась тільки на 11,47 %, що становило 7,58 од/мл (рис. 3).

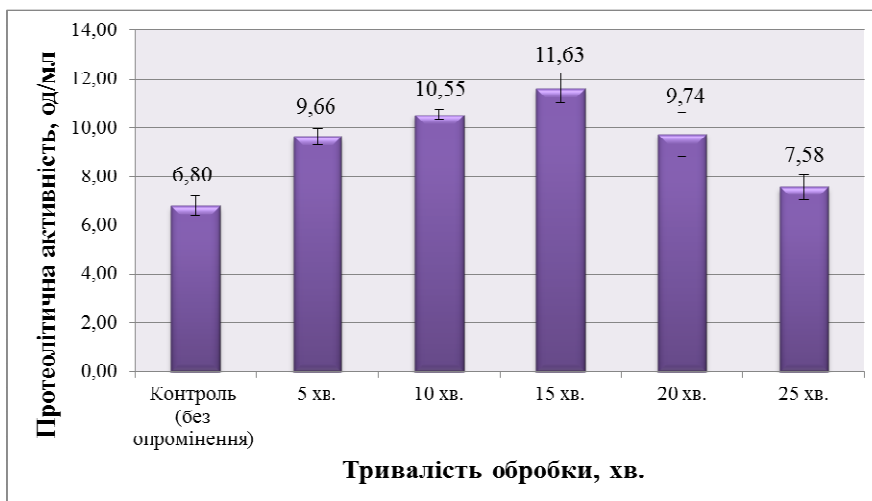


Рис. 3. Вплив ЕМВ надзвичайно високої частоти (60 ГГц) на активність протеолітичних ферментів *A. oryzae*

Оскільки за обробки ЕМВ даних частот особливого збільшення біомаси *A. oryzae* не спостерігалось, можна зробити припущення, що ЕМВ виступає як стресовий фактор, при якому збільшується синтез протеаз.

Отже, отримані результати свідчать про те, що максимальний ефект від впливу ЕМВ спостерігався за обробки низькою частотою (100 кГц), оскільки найвище значення протеолітичної активності ми реєстрували при 10-ти хвилинному опроміненні (12,32 од/мл), що на 81,17 % більше ніж значення протеолітичної активності у контрольному варіанті. Найменший ефект від впливу ЕМВ виявлено при опроміненні наднизькою частотою (50 Гц), тому що

при 10-ти та 15-ти хвилинному опроміненні значення протеолітичної активності збільшилися лише на 7,64 % та 14,41 % відповідно у порівнянні з контролем.

ВИСНОВКИ

Було досліджено вплив електромагнітного випромінювання різних частот на *A. oryzae* для встановлення можливості використання його з метою підвищення синтезу протеолітичних ферментів.

Виявлено, що протеолітична активність *A. oryzae* збільшувалась при опроміненні електромагнітним випромінюванням наднизькою (50 Гц), низькою (100 кГц) та надзвичайно високою частотою (60 ГГц) тривалістю від 5 до 25 хв.

Максимальний ефект впливу ЕМВ спостерігався при опроміненні суспензії *A. oryzae* низькою частотою (100 кГц), а найменший ефект виявлено при опроміненні суспензії *A. oryzae* наднизькою частотою (50 Гц).

Встановлено, що при наднизькій частоті (50 Гц) 25-ти хвилинне опромінення *A. oryzae* перемінним електромагнітним полем є найбільш ефективним для підвищення протеолітичної активності. Її значення при цьому режимі досягло 9,32 од/мл, що на 37,05 % більше у порівнянні з контролем.

При низькій частоті (100 кГц) максимальне збільшення активності протеолітичних ферментів *A. oryzae* спостерігалось при 10-ти хвилинному опроміненні електромагнітним полем. Протеолітична активність підвищилась на 81,17 % від контролю і становила 12,32 од/мл.

При надзвичайно високій частоті (60 ГГц) найбільший ефект виявлено при 15-ти хвилинному опроміненні електромагнітним полем *A. oryzae*. Значення протеолітичної активності – 11,63 од/мл, що на 71,03 % більше в порівнянні з контролем.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Василюнец И. М. Основы технологий пищевых продуктов из сырья растительного происхождения: текст лекций / И. М. Василюнец. – СПб.: СПбГАХПТ, 1999. – 151 с.
2. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева. – [2-е изд., перераб. и доп.]. – М.: Агропромиздат, 1987 – 335 с.
3. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т. П. Прищеп [и др.]. – Ростов на Дону: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с.
4. Гапочка Л. Д. Популяционные аспекты устойчивости одноклеточных организмов к действию электромагнитного излучения низкой интенсивности / Гапочка Л. Д., Гапочка М. Г., Королев А. Ф. // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2002. – № 2 (26). – С. 43–48.
5. Девятков Н. Д. Особенности медико-биологического применения миллиметровых волн / Девятков Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О. В. – М.: ИРЭ РАН, 1994. – 164 с.
6. Unele probleme fundamentale și aplicativeale radiațiilor electromagnetice de frecvența extrem de înaltă (milimetrice) atermice / [D. I. Ghițu, O. V. Bețchii, V. F. Parhomenco et al.] // Нетрадиционные методы в медицине, биологии и растениеводстве. Эниология. Экология и здоровье : междунар. научно-практ. конф., 2005 г.: тезисы докл. – Кишинев, 2005. – С. 41–47.
7. Roy C. R. Rapporteur Report: ICNIRP international workshop on EMF dosimetry and biophysical aspects relevant to setting exposure guidelines / C. R. Roy // Health Phys. – 2007. – Vol. 92, № 6. – P. 658–667.
8. Влияние электромагнитных полей сантиметрового диапазона на клетки *Salmonella typhimurium* [Даниленко И. И., Мирутенко В. И., Ковальчук В. К. и др.] // Электронная обработка материалов. – 1985. – № 5 – С. 81–83.
9. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на клетки *Salmonella typhimurium* [Даниленко И. И., Мирутенко В. И., Сониль А. В. и др.] // Электронная обработка материалов. – 1985. – № 6. – С. 55–57.

10. Геращенко С. И. Основы лечебного применения электромагнитных полей микроволнового диапазона / С. И. Геращенко. – К. : Радуга, 1997. – 223 с

11. Яровенко В. Л. Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий / Яровенко В. Л., Калунянц К. А., Голгер Л. И. – М.: Пищевая промышленность, 1970. – 444 с.

12. Виноградова А. А. Лабораторный практикум по общей технологии пищевых производств / Виноградова А. А., Мельникова Г. М., Фомичева Л. А. – М.: Агропромиздат, 1991. – 335 с.

13. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности : ДСТУ ГОСТ 20264.2–88. – [Чинний від 01-01-1989]. – М. : Изд-во стандартов, 1988. – 15 с.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОБРАБОТКИ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ *A. oryzae*

*О. А. БЕДЕНКО¹, Л. А. КОСОГОЛОВА¹, Л. Р. РЕШЕТНЯК¹,
П. П. ЛОШИЦКИЙ²*

¹*Национальный авиационный университет, г. Киев*

²*Национальный технический университет Украины «КПИ», г. Киев*

*Исследовано влияние электромагнитного излучения на *A. oryzae*. Наибольший эффект действия электромагнитного излучения обнаружено при низкочастотном облучении (100 Гц) на протяжении 10 минут.*

Ключевые слова: *Aspergillus oryzae, электромагнитное излучение сверхнизкой, низкой и крайне высокой частоты, протеолитическая активность, ферментные препараты.*

**THE INFLUENCE OF TREATMENT BY PHYSICAL METHODS ON THE
ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES OF *A. oryzae***

*O. O. BEDENKO¹, L. A. KOSOHOLOVA¹, L. R. RESHETNYAK¹,
P. P. LOSHITSKIY²*

¹National Aviation University, Kyiv

²National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”, Kyiv

*We investigated the influence of the electromagnetic radiation on *A. oryzae*. The greatest effect of the electromagnetic radiation have been observed by irradiating the low frequency (100 Hz) for 10 minutes.*

Keywords: *Aspergillus oryzae, the electromagnetic radiation of ultra-low, low and very high frequency, proteolytic activity, enzyme preparations.*