



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42451 (13) U  
(51) МПК (2009)  
C12N 1/14  
C12N 9/24

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ШТАМ ГРИБА *Penicillium aculeatum* RAPER ET FENNELL 225 - ПРОДУЦЕНТ ІНУЛІНАЗИ

1

(21) u200815008

(22) 25.12.2008

(24) 10.07.2009

(46) 10.07.2009, Бюл.№ 13, 2009 р.

(72) АЙЗЕНБЕРГ ВІКТОРІЯ ЛЕОНІДІВНА, ЗАХАРЧЕНКО ВАЛЕНТИНА ОЛЕКСІВНА, СТОЙКО ВІКТОРІЯ ІШТВАНІВНА, ЖДАНОВА НЕЛЛІ МИКОЛАЇВНА, КУРЧЕНКО ІРИНА МИКОЛАЇВНА, КАПІЧОН ГАННА ПАВЛІВНА, КОНОВАЛОВА ВІКТОРІЯ ВАЛЕРІЙВНА, БУРБАН АНАТОЛІЙ ФЛАВІАНОВИЧ

2

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Штам гриба *Penicillium aculeatum* Raper et Fennell 225 - продуцент інулінази, з підвищеною здатністю до синтезу інулінази, що не синтезує протеазу, який характеризується високою швидкістю синтезу ферменту.

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема до виробництва ферментів, стосується штамів грибів - продуцентів ферменту інулінази, і може бути використана в харчовій промисловості, медицині, у виробництві дієтичних продуктів, у сільському господарстві для передобробки рослинної сировини тощо.

Відомі штами мікроорганізмів, що синтезують фермент інуліназу. Так відомий штам дріжджів *Kluuyveromyces fragilis* NCIM 3217 - продуцент інулінази, у якого максимум накопичення інулінази (70д/мл) відмічено при температурі 25-27°C на середовищі, що містить в якості джерела вуглецю - 1%-ий фруктан, а в якості джерела азоту - пептон [1]. Недолік штаму - дефіцитні компоненти поживного середовища для його вирощування.

Найбільш близьким до запропонованого по досягнутому ефекту є штам гриба *Aspergillus awamori* 808 [2]. Однак гриб *Aspergillus awamori* 808, окрім інулінази, синтезує в значних кількостях протеазу. Наявність у препаратах інулінази фермента протеази, що розщеплює білки, вкрай небажано, оскільки додаткове очищення ускладнює процес отримання цільового продукту та збільшує його вартість. Суттєвим недоліком гриба *Aspergillus awamori* 808 є також тривалість його вирощування для досягнення позитивного ефекту. При цьому максимальне значення інуліназної активності (18,0-48,0од/мл) досягається на 144 годину глибинного культивування гриба, тобто на шосту добу.

Задача корисної моделі - одержання нового штаму гриба-продуцента інулінази, що здатний до підвищеного синтезу ферменту.

Поставлена задача реалізується тим, що як продуцент інулінази застосовується штам гриба *Penicillium aculeatum* 225. Запропонований штам, на відміну від прототипу, не синтезує протеазу, а максимальний рівень інуліназної активності у гриба відмічається на 72 годину вирощування, тобто на третю добу глибинного культивування (27,7-62,2од/мл).

Культура зберігається у колекції чистих культур відділу фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Штам гриба *Penicillium aculeatum* 225 виділений з зразка ґрунту Київської області у 1990 році й ідентифікований В.О. Захарченко, з використанням визначників вітчизняних і закордонних авторів [3, 4]. Штам отриманий методом ґрунтових розведень. Штам гриба *Penicillium aculeatum* 225 відібраний по ознаці позаклітинного синтезу інулінази. *Penicillium aculeatum* 225 відрізняється стабільністю культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних ознак.

Культурально-морфологічні властивості гриба *Penicillium aculeatum* Raper et Fennell 225

Колонії на агаризованому середовищі Чапека ростуть обмежено, бархатисті, жовто-зелені до жовтувато-коричнюватих, з жовтим краєм 2-2,5мм ширини, частково з гіфальним тяжем; реверзум темно-сірувато-фіолетовий до пурпурно-червоного.

(19) UA (11) 42451 (13) U

Конідієносці відходять в основному від гіфальних тяжів, 50-100мкм довжиною, 3,0-3,5мм в діаметрі, з зернистою оболонкою. Китички за характером розгалуження дворядні і симетричні (секція *Biverticillata*), але зустрічаються фракційні і однорядні (секція *Monoverticillata*).

Конідії кулясті до напівкулястих, 3-3,5мкм, з товстою оболонкою, помітно шипуваті.

Колонії на сусловому агарі тонкоповстисті, жовтувато-зелені, з вузьким білим краєм; реверзум буруватий.

Конідіальні структури подібні до описаних вище. Колонії на картопляно-глюкозному агарі темно-зелені, тонкоповстисті до бархатистих, з світло-жовтуватим краєм, з дрібними безбарвними краплями ексудату. Реверзум світло-пурпуровий.

Конідіальні структури подібні до описаних вище.

Штам добре росте на живильних середовищах з інулінвмісною сировиною (жом топінамбуру, подрібнених коренях цикорію).

Фізіолого-біохімічні властивості гриба *Penicillium aculeatum* Raper et Fennell 225

Гриб засвоює глюкозу, арабінозу, рамному, галактозу, фруктозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, крохмаль, інулін, маніт, сорбіт. Засвоює амонійний, нітритний, нітратний азот; асимілює сечовину, пептон, кукурудзяний екстракт, мелясу, солодові паростки.

Росте в широких межах рН 2,5-8,0.

Аероб.

Оптимальна температура росту 25-26°C.

Максимум утворення ферменту в культуральній рідині при рості на рідкому поживному середовищі з індуктором та мінеральними солями в умовах глибинного культивування спостерігається на 72 годину вирощування.

Гриб *Penicillium aculeatum* 225 не синтезує протеолітичні ферменти.

При зберіганні на сусло-агарі високий рівень ферментативної активності не знижується і зберігається протягом 2-х років. При культивуванні на рідкому поживному середовищі певного складу штам гриба *Penicillium aculeatum* 225 синтезує інуліназу.

Приклад 1. Посівний матеріал вирощують при 25-26°C в колбах об'ємом 750мл на кругових качалках з 160об/хв. протягом 48 годин на середовищі, що містить, %: калій азотнокислий - 0,2; калій фосфорнокислий однозаміщений - 0,1; магній сірчанокислий - 0,05; калій хлористий - 0,05; інулінвмісний індуктор - жом топінамбуру - 2,0; вода дистильована 150мл.

Посівний матеріал, що складає 10% від загального об'єму середовища, додають в ферментаційне середовище, що містить ті ж компоненти і в

тих же кількостях, що і при приготуванні посівного матеріалу. Культивування проводять при 25-26°C в колбах об'ємом 750мл на кругових качалках з 160об/хв. протягом 72 годин.

По закінченню ферментації культуральну рідину фільтрують, відокремлюючи від біомаси і невикористаного субстрату. У фільтраті визначають активність інулінази згідно методики [5].

За одиницю інуліназної активності приймають кількість ферменту, що каталізує утворення 1мкМ фруктози з інуліну за 1хв в стандартних умовах (t=50°C, рН 4.6).

Величина інуліназної активності складає 27,7од/мл.

Приклад 2. Посівний матеріал вирощують при 25-26°C в колбах об'ємом 750мл на кругових качалках з 160об/хв. протягом 48 годин на середовищі, що містить, %: калій азотнокислий - 0,2; калій фосфорнокислий однозаміщений - 0,1; магній сірчанокислий - 0,05; калій хлористий - 0,05; інулінвмісний індуктор - жом топінамбуру - 2,0; вода дистильована 150мл.

Посівний матеріал, що складає 10% від загального об'єму середовища, додають в ферментаційне середовище, що містить ті ж компоненти і в тих же кількостях, що і при приготуванні посівного матеріалу. Культивування проводять при 25-26°C в колбах об'ємом 750мл на кругових качалках з 160об/хв. протягом 72 годин.

По закінченню ферментації культуральну рідину центрифугують та піддають ультрафільтрації, використовуючи полісульфонову мембрану Nadir RM UN 050P 1060.

Величина інуліназної активності складає 62,2од/мл.

Джерела інформації:

1. Gupta A.K., Singh D.P., Kaur N., Singh R. Production, purification and immobilization of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*, NCIM. J.Chem. Technol. and Biotechnol. - 1994. - 59, №4. - с.377-385.

2. Корнеева О.С., Жеребцов Н.А., Шуваева Г.И. и др. Инулаза микромицета *Aspergillus awamori* 808. Препаративное получение и некоторые физико-химические свойства. - Биотехнология. - 1993, №7, с.31-35.

3. Пидопличко Н.М. Пенициллины. - К.: Наукова думка. - 1972, с.31.

4. Ramirez C. Manual and atlas of the Penicillia. - Amsterdam, New-York, Oxford: Elsevier Biomedical Press. - 1982. - P.34-36.

5. Айзенберг В.Л., Стойко В.Л., Демиденко Е.А. Методика количественного определения активности грибной инулиназы с использованием реактива Самнера. - Биотехнология, 2007, №5, с.95-96.