



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44964 (13) U
(51) МПК (2009)
C12N 9/00
C12N 1/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ СОМАТИЧНИХ СТРУКТУР МАКРОМІЦЕТУ *IRPEx LACTEUS* Fr. B-02 - ПРОДУЦЕНТ ФЕРМЕНТУ ТРОМБОЛІТИЧНОЇ ДІЇ

1

(21) u200903687
(22) 15.04.2009
(24) 26.10.2009
(46) 26.10.2009, Бюл.№ 20, 2009 р.
(72) ЗАГНІТКО ЮЛІЯ ПЕТРІВНА, БОЙКО МИХАЙЛО ІВАНОВИЧ, КУЛІШ АЛІНА ДМИТРІВНА, ПЕТРАКОВА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА

2

(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
(57) Штам соматичних структур макроміцету *Irpeh lacteus* Fr. B-02 (зберігається в колекції кафедри фізіології рослин Донецького національного університету) - продуцент ферменту тромболітичної дії.

Корисна модель належить до ферментативної галузі мікробіологічної промисловості та стосується одержання нового штаму соматичних структур макроміцету (вищого базидіального гриба) *Irpeh lacteus* Fr. - продуцента ферменту тромболітичної дії, який може бути використаний у медицині як тромболітичний препарат.

Протеїнази, що виділені з різних джерел зараз широко застосовуються у багатьох галузях медицини. Відомі штами *Bacillus amyloliquefaciens* H2 [1] та *B. intermedius* 3-19 [3] - продуценти протеїназ тромбо-, фібринолітичної та антикоагулянтної дії, які належать до бактерій та характеризуються спороутворенням у культурі, що збільшує ризик професійних захворювань при промисловому культивуванні. Також було експериментально показано, що дані протеїнази мають велику залежність тромбо- та фібринолітичної активності від дози препарату. Препарати протеїназ з тромбо-, фібринолітичною та коагулятивною активністю тваринного та рослинного походження мають дуже широку субстратну специфічність, що не дуже зручно для застосування їх як лікарських засобів [3].

Найбільш близьким за технічною суттю та результатом, який досягається, є гриб *Irpeh lacteus* C-11, рівень активності культуральної рідини якого в оптимальних умовах культивування складає 68 питомих одиниць (10 доба росту) [4]. Представлені результати свідчать про те, що найшвидший лізис тромбу проходить приблизно за 10 годин, що є доволі низьким показником для подальших медичних досліджень з метою одержання препарату тромболітичної дії.

Зараз однією з найважливіших проблем, що стоять перед медициною, є пошук ефективних

засобів лікування та попередження серцево-судинних та тромбоемболічних захворювань, які пов'язані з порушенням зсідальної системи крові та фібринолізу. Відомі зараз тромболітичні препарати не задовольняють повністю потреб практичної охорони здоров'я. У зв'язку з цим, поряд з роботами по вдосконаленню вже відомих препаратів, ведеться широкий пошук нових ферментних засобів. При цьому найважливішим етапом досліджень є відбір нових високоефективних продуцентів з високими виробничими показниками.

В основу корисної моделі поставлена задача одержання нового штаму соматичних структур афілофорального макроміцету *I. lacteus*, який здатний до активного синтезу екзоферментів тромболітичної дії

Поставлена задача вирішується тим, що інтродукований штам B-02 *I. lacteus* виявив високі показники тромболітичної активності (ТА) в культурі.

Штам, який пропонують, зберігається в колекції чистих культур кафедри фізіології рослин біологічного факультету Донецького національного університету.

Одержаний штам B-02 *I. lacteus* має наступні характеристики.

Культурально-морфологічні ознаки.

Штам досліджували на глюкозо-картопляному агарі, сусло-агарі та агарі Чапека-Докса.

На глюкозо-картопляному агарі та сусло-агарі міцелій повітряний, ватоподібний, стелиться по поверхні, субстрат не забарвлює. На глюкозо-картопляному агарі колір колонії кремуватобілий з середньою тільністю міцелію, край колонії тонковолокнистий. На сусло-агарі колонія білого кольо-

U
(13)
44964
(11)
UA
(19)

ру, міцелій щільний, пухнастий. На агаризованому середовищі Чапека-Докса ріст міцелію не зафіксований. Швидкість росту міцелію на глюкозо-картопляному агарі при температурі $30 \pm 1^\circ\text{C}$ складає $10,99 \pm 0,38$ мм за добу, на сусло-агарі - $10,76 \pm 0,31$ мм за добу. Плодоношення на застосованих середовищах культивування не спостерігається. Мікроскопічні дослідження показали, що міцелій складається з гіллястих, щільно переплелих гіф з перегородками. Пряжки не виявлено.

Ріст міцелію можливий в інтервалі температур $5-50^\circ\text{C}$. Температурний оптимум росту гриба знаходиться в межах $30-35^\circ\text{C}$, біосинтетичний - $28-32^\circ\text{C}$. В інших умовах (температура культивування $5-25^\circ\text{C}$ та $40-50^\circ\text{C}$) ріст гриба різко знижується, а при температурі 5 та 50°C ріст гриба припиняється.

На рідких вихідному та модифікованому глюкозо-пептонному середовищах утворює як поверхневий, так і занурений міцелій. Повітряних гіф мало. Культуральний фільтрат при рості протягом 30 діб не забарвлює.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

При визначенні оптимальних джерел вуглецевого та азотного живлення головним критерієм було значення ТА культуральної рідини, скорочення терміну росту гриба для подальшого одержання ферментного препарату тромболітичної дії.

Штам В-02 *I. lacteus* утилізує моно- (глюкоза, галактоза, ксилоза) та дисахариди (лактоза, сахароза) і спирти (маніт) з різною швидкістю. Найбільше накопичення біомаси спостерігалось на середовищі з глюкозою та сахарозою, а найменше - на середовищі з манітом.

Штам В-02 *I. lacteus* при культивуванні на рідкому живильному середовищі з зазначеними джерелами вуглецю виявляє різну тромболітичну та біосинтетичну активність в культурі. Вірогідно найвищі показники ТА спостерігаються на середовищі з глюкозою на 10 добу культивування. Вивчення впливу джерела азоту на ТА та біосинтетичну активність штаму показує, що лише на середовищі з пептоном відбувається активний синтез ферментів тромболітичної дії та високий рівень накопичення біомаси. Вивчення придатності для ферментоутворення неорганічного (амонійний, нітратний) та органічного (ферментативний пептон, сечовина, аспарагінова кислота) азоту показує, що рівень

тромболітичної та біосинтетичної активності на даних середовищах набагато нижче (в $2,5 - 20$ разів), ніж на середовищі з пептоном.

Приклад.

Штам В-02 *I. lacteus* одержаний методом первинного відбору. Плодові тіла зібрані з засохлої деревини черешні. Чисту культуру штаму підтримують шляхом пересівів через кожні 3-5 місяців на агаризованому глюкозо-картопляному середовищі.

Для виявлення ТА культуральної рідини штам В-02 *I. lacteus* культують на рідкому глюкозо-пептонному середовищі наступного складу (г/л): глюкоза - 10; пептон - 3; CaCl_2 - 0,05; KH_2PO_4 - 0,6; K_2HPO_4 - 0,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; дистильована вода - до 1 літра. Кислотність середовища після стерилізації становить $4 + 0,05$ рН. Культуру вирощують у колбах Ерленмейера на 250 мл з об'ємом середовища 50 мл, поверхневим способом у термостатах при температурі $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Посівним матеріалом служить 7-добова культура з глюкозо-картопляного агаризованого середовища.

ТА культуральної рідини визначають на 5, 10, 15, 20, 25, 30 добу культивування.

Визначення тромболітичної активності культуральної рідини проводили за методом Імшенецького та Броцької, який заснований на врахуванні часу лізису експериментально отриманих тромбів людини [2]. Субстратом була цитратна донорська кров однієї й тієї ж групи (II група, резус-позитивний), а реактивом - тромбін з активністю 100 од. в ампулі, який розводять у фізіологічному розчині з розрахунком, щоб в 1 мл розчину знаходилось 25 одиниць. Тромби отримують при змішуванні 0,1 мл крові та 0,1 мл розчину тромбіну в пробірках Відаля. До утворених щільних тромбів додають по 2 мл культуральної рідини, обережно струшують і розміщують в термостаті при температурі 37°C . ТА виражають у годинах розчинення згустку та в умовних одиницях. Перерахування ТА в умовні одиниці проводять за прописом Псурської та Денисової [5]:

$$ТА = \frac{24 - t}{t} \times 50,$$

де t - час лізису тромбу, в г; 50 - нормований множник, отриманий з вибору граничних умов

Результати наведено у таблиці:

Таблиця

Вік культури, діб	5	10	15	20	25	30
ТА, умовних одиниць	$94,4 \pm 6,8$	$114,3 \pm 8,7$	$88,9 \pm 6,8$	$56,1 \pm 3,7$	$47,4 \pm 3,1$	$23,5 \pm 1,8$

Одержані результати свідчать про те, що штам В-02 *I. lacteus* активно синтезує у середовищі фермент тромболітичної дії, найбільша кількість якого зафіксована на 10 добу культивування, коли ТА складає 114,3 у.о.

Отже, штам В-02 *I. lacteus* у порівнянні з прототипом (штам С-11 *I. lacteus*) синтезує у живильному середовищі набагато більшу кількість протеїназ тромболітичної дії, що є більш вигідним для подальшого дослідження його з метою одержання ферментного препарату тромболітичної дії.

Штам *Irpex lacteus* Fr. В-02 відправлений на реєстрацію до Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Джерела інформації, використані при складанні заявки.

1. Балабан Н.ІХ, Марданова А.М., Маликова Л.А., Ильинская О.Н., Шарипова М.Р. Биосинтез субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* H2 и биологические свойства фермента // Ученые записки Казанского государс-

твенного университета. Серия: Естественные науки. - 2008. - Т. 150, кн. 2. - С.81-90.

2. Имшенецкий А.А., Броцкая С.З. Селекция микроорганизмов, обладающих тромболитической активностью // Микробиология. - 1969. - Т. 38. - №6. - С. 1403-1409.

3. Ицкович Е.Л., Лютова Л.И., Балабан Н.П., Марданова А.М., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р., Лещинская И.Б., Руденская Г.Н. Тромболитические и антикоагулянтные свойства тиолзависимой сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* 3-19 //

Вопросы медицинской химии. - №5. 1999. - С. 68-73.

4. Пат. 33371 А України, МКВ С 12 N 9/58, С 12 N 1/14. Штам соматичних структур макроміцету *Irpex lacteus* Fr. C-I 1 - продуцент ферменту тромболітичної дії / В.М. Стадничук, М.І. Бойко, О.В. Пітькіна. Заявл. 16.02.1999.; Опубл. 15.02.2001., Бюл. №1. - 2с. (прототип).

5. Псурцева Н.В., Денисова Н.П Тромболитическая активность культур *Flammulina velutipes* (Fr.) Karst. //Микология и фитопатология. - 1982. - Т. 16. - №6.-С.518-521.