



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **60690** (13) **U**
(51) **МПК**
C12N 1/14 (2006.01)
A01G 1/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

**(54) ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ Ч-03 ДЕРЕВОРУЙНІВНОГО ГРИБА
IRPEX LACTEUS FR. - ПРОДУЦЕНТА МОЛОКОЗСІДАЛЬНОГО ФЕРМЕНТУ**

1

(21) u201014615

(22) 06.12.2010

(24) 25.06.2011

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) БОЙКО МИХАЙЛО ІВАНОВИЧ, ТКАЧЕНКО
НАТАЛІЯ ПЕТРІВНА, ТЕРЕЩЕНКО ГРИГОРІЙ
СЕРГІЙОВИЧ, ДОРОШКЕВИЧ НЕЛЯ ВІКТОРІВНА,
БІЛУН ОЛЕКСАНДР ВАЛЕРІЙОВИЧ, КУЗНЕЦОВА
ІРИНА АНАТОЛІЇВНА

(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Живильне середовище для культивування
штаму Ч-03 дереворуйнівного гриба *Irpeh lacteus*
Fr. - продуцента молокозсідального ферменту, що
містить пептон, калій фосфорнокислий однозамі-

2

щений, калій фосфорнокислий двозаміщений, ма-
гній сірчаноокислий, цинк сірчаноокислий і кальцій
хлористий, дистильовану воду до 1 л, яке **відрі-
зняється** тим, що додатково містить сахарозу при
наступному співвідношенні компонентів, мас. ч/л:

сахароза	7,49
пептон	5
KH_2PO_4	0,6
K_2HPO_4	0,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4
CaCl_2	0,04
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001
дистильована вода	до 1 л.

Корисна модель належить до біотехнології (мі-
котехнології) і може використовуватися у фермен-
тативній технології для одержання молокозсідаль-
ного сичужного ферменту новим штамом Ч-03
Irpeh lacteus Fr. Цей процес відкриває перспективи
заміни сичужного ферменту тваринного походжен-
ня на більш дешевий ферментний препарат гриб-
ного походження, який за своєю активністю не
поступається активності сичужного ферменту ре-
ніну. Ферментний препарат штаму Ч-03 може ви-
користовуватися у сироварінні.

Відомі середовища, які містять сахарозу і мі-
неральні компоненти (середовище Білай), глюкозу
і мінеральні компоненти (середовище Чапека -
Докса), але активність молокозсідального ферме-
нту на цих середовищах є дуже низькою, або вза-
галі відсутня в період культивування (1-15діб)
штаму Ч-03 при оптимальній температурі 32°C. Як
свідчать літературні джерела активне накопичення
молокозсідального ферменту відбувається на 10-
15 добу в залежності від штаму [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Найбільш близьким до нового середовища є
глюкозо лептонне середовище такого складу: г/л,
глюкоза - 10, пептон - 3, 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, CaCl_2 -
0,05, вода - до 1л, яке використовувалося для ви-
рощування гриба *Hirschioporus laricinus* - забезпе-

чує утворення з недосить високою активністю
(1800 од/мл) ферменту штамом Ч-03 протягом
всього періоду культивування, що свідчить про
недостатнє забезпечення продуцента необхідними
живильними компонентами для його біосинтетич-
ної діяльності. Склад живильного середовища для
культивування *Irpeh lacteus* Fr. недостатньо опи-
саний, і кожний штам потребує свого середовища,
яке б стимулювало ріст та накопичення потрібного
ферменту [8, 10, 11, 12].

В основу корисної моделі поставлено завдан-
ня удосконалення глюкозо-лептонного живильного
середовища шляхом заміни глюкози на сахарозу
та зміни концентрації трьох основних компонентів -
пептону, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та CaCl_2 , використовуючи
метод математичного планування експерименту
ПФЕ - 2⁴ (повний факторний експеримент) [5].

Поставлене завдання вирішується тим, що
живильне середовище для культивування штаму
Ч-03 *Irpeh lacteus* Fr. - продуцента молокозсідаль-
ного ферменту, яке включає пептон, калій фосфо-
рнокислий однозаміщений, калій фосфорнокис-
лий двозаміщений, магній сірчаноокислий, цинк
сірчаноокислий і кальцій хлористий, дистильовану
воду 1л., згідно корисної моделі, додатково міс-
тить сахарозу при такому співвідношенні компоне-
нтів: г/л, сахароза - 7,49, пептон - 5, KH_2PO_4 - 0,6,

(19) **UA** (11) **60690** (13) **U**

K_2HPO_4 - 0,4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,4, $CaCl_2$ - 0,04, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,001 та дистильована вода до 1л.

Кращі показники молокозсідальної активності наведені у таблиці.

Таблиця

Показники молокозсідальної активності культурального фільтрату (КФ) штаму Ч-03 *Lrpx lacteus* Fr. на 15 добу в залежності від складу живильних середовищ

Живильні середовища з різною концентрацією речовин	Середнє значення МЗА (ОД/МЛ) культурального фільтрату штаму Ч-03
1	952,4 ± 36,5
2	1581,0 ± 27,3
3	1724,1 ± 11,3
4	1980,1 ± 9,3
5	1183,4 ± 48,1
6	913,2 ± 1,7
7	1568,6 ± 74,1
8	2531,6 ± 52,9
9	754,7 ± 8,9
10	1612,9 ± 19,2
11	2234,6 ± 43,5
12	1659,7 ± 27,9
13	907,0 ± 19,1
14	1166,1 ± 37,2
15	968,5 ± 4,6
16	1612,9 ± 16,9
17	1179,9 ± 13,6

З таблиці видно що, найвищі показники молокозсідальної активності має культуральний фільтрат (КФ) живильного середовища №8. Задовільний вплив гриба на активність молокозсідального ферменту здійснювався на живильних середовищах №2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 14, та 16, нижчі показники у продуцента при зростанні на живильних середовищах №1, 6, 9, 15.

Як показав дисперсійний аналіз, вплив факторів цілком вірогідний. Порівняння результатів середніх проводилося за методом Дункана [7].

З отриманих даних випливає, що від основних факторів, якими є сахароза, пептон, котрі є джерелами вуглецю та азоту, сірчаноокислий магній і хлористий кальцій - джерела іонів Mg^{++} і Ca^{++} , що активують діяльність ферментативних систем, залежить біосинтетична активність [8, 9, 10] продуцента.

Повний факторний експеримент дає можливість виявити найбільш ефективний вплив кожного окремого фактора та їх взаємозв'язок в біосинтезі протеїназ молокозсідальної дії штаму Ч-03 *Lrpx lacteus* Fr.

Живильне середовище готували шляхом послідовного розчинення його компонентів з наступним доведенням дистильованою водою до 1л. Кислотність середовища доводили до 3,4-3,6 рН за допомогою 10% HCl. Живильне середовище розливали по 50мл. в конічні колби на 250мл, стерилізували в автоклаві АГ-1 при 0,8-1 атм протягом 40 хв. Гриб вирощували протягом 15 діб., за оптимальною температурою 32°C. Молокозсідальну активність культурального фільтрату визначали за методом Каваї і Мукаї [9, 10], а розрахунок проводили за формулою.

Формула 1

$$MZA_{\text{кф}} = \frac{40 \times 100 \times K}{\Gamma} \text{ од/мл}$$

де K - коефіцієнт розведення культурального фільтрату /КФ/;

Г - час зсідання молока; протягом якого з 100 мл молока при добавленні 1 мл.

КФ утворюється щільний згусток, хв.

40 - середній час зсідання молока при виробництві сиру, хв.;

(МЗА - молокозсідальна активність).

Приклади конкретного виконання

Приклад 1. Готують живильне середовище такого складу, г/л: сахароза - 3,49, пептон - 3, KH_2PO_4 - 0,09, K_2HPO_4 - 0,06, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,4, $CaCl_2$ - 0,4, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,00015, дистильована вода до 1л. Живильне середовище розливають по 50 мл. в конічні колби на 250 мл, стерилізують в автоклаві при 0,8-1 атм протягом 40 хв. Кислотність середовища після стерилізації становить 3,5-3,6 рН. Після охолодження середовища його інокулюють шматочком міцелію розміром, приблизно 10×10мм, вирощують продуцент в термостаті ТС - 80М за температури 32°C протягом 15 діб. Активність ферменту дорівнювала 952,4 од./мл (Активність ферменту визначали за формулою 1).

Приклад 2. Готують живильне середовище такого складу, г/л: сахароза - 7,49, пептон - 5, KH_2PO_4 - 0,09, K_2HPO_4 - 0,06, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,4, $CaCl_2$ - 0,04, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,00015, дистильована вода до 1л. Живильне середовище розливають по 50 мл. в конічні колби на 250 мл, стерилізують в автоклаві при 0,8-1 атм протягом 40 хв. Кислотність середовища після стерилізації становить 3,5-3,6 рН. Після охолодження середовища його іно-

кульють шматочком міцелію розміром, приблизно 10×10мм, вирощують продуцент в термостаті ТС – 80М за температури 32°C протягом 15 діб. Активність ферменту дорівнювала 1980,1 од./мл.

Приклад 3. Готують живильне середовище такого складу, г/л: сахароза - 7,49, пептон - 5, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2, CaCl_2 - 0,04, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильована вода до 1л. Живильне середовище розливають по 50 мл. в конічні колби на 250 мл, стерилізують в автоклаві при 0,8-1 атм протягом 40 хв. Кислотність середовища після стерилізації становила 3,5-3,6 рН. Після охолодження середовища його інокульють шматочком міцелію штаму Ч-03 розміром, приблизно 10×10мм, вирощують продуцент в термостаті ТС - 80М за температури 32°C протягом 15 діб. Активність ферменту дорівнювала 2531,6 од./мл.

Приклад 4. Готують живильне середовище такого складу, г/л: сахароза - 3,49, пептон - 5, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,4, CaCl_2 - 0,08, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001 дистильована вода до 1л. Живильне середовище розливають по 50 мл. в конічні колби на 250 мл, стерилізували в автоклаві АГ-1 при 0,8-1 атм протягом 40 хв. Кислотність середовища після стерилізації становить 3,5-3,6 рН. Після охолодження середовища його інокульють шматочком міцелію продуцента розміром, приблизно 10×10мм, вирощують продуцент в термостаті ТС - 80М за температури 32°C. протягом 15 діб. Активність ферменту дорівнювала 968,5 од./мл.

Таким чином, нове модифіковане живильне середовище, яке містить: г/л, сахарозу - 7,49, пептон - 5, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2, CaCl_2 - 0,04, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильовану воду - 1л, є оптимальним для культивування штаму Ч-03 *Irrex lacteus* Fr. Як показник, на живильному середовищі №8 самий високий рівень МЗА (2531,6 од./мл.), тобто це живильне середовище можна використовувати для культивування штаму Ч-03 з метою одержання ферментного препарату.

Як видно з даних таблиці, та складу нового модифікованого живильного середовища сахароза в кількості - 7,49 г/л, пептон – 5 г/л, магній сірчано-кислий - 0,2, кальцій хлористий - 0,04, максимально сприяють росту міцелію та накопиченню молокозсідального ферменту. При інших концентраціях даних сполук накопичення необхідного ферменту у рідині культурального фільтрату відбувається дуже повільно і не набуває необхідної кількості для отримання щільного молочного згустку.

Джерела інформації:

1. Бойко М.И. Определение оптимальных значений рН и температуры для культивирования *Irrex lacteus* Fr. А-Дон-02 - продуцента протеиназ

молокосвертывающего действия / М.И. Бойко И.А., Кузнецова, А.В Белун.// Совр. микология в России, тезисы докладов. - М, 2008. - С. 121;

2. Кузнецова І.А. Вплив високих та низьких температур на вихід протеїназ молокозсідальної дії у гриба *Irrex lacteus* Fr. /Кузнецова І.А// Вісник Харківського нац. ун-ту. - 2008. - №2 (14). - С. 96-99.

3. Кузнецова І.А. Біосинтетичні властивості гриба *Irrex lacteus* Fr. в залежності від якісного складу пептону в живильному середовищі / І.П. Парасій, І.А Кузнецова // Сучасні проблеми природничих наук: III Всеукр. студ. наук, конф.: матер, конф. - Ніжин, 2008. - С. 129

4. UA 23877 U A 23C 19/032 (2007.01) C12 N 5/00. Корисна модель на живильне середовище для виділення та пересіву чистих культур базидіального гриба *Irrex lacteus* Fr.. /Кузнецова І.А., Клименко Г.В, Бойко М.І. А; опубл 11.06.2007, Бюл. №8.

5. Максимов В.Н. Оптимизация состава питательной среды методом математического планирования эксперимента /В.Н. Максимов, М.Н. Пименова, Н. Н. Гречушкина // Практикум по микробиологии - М, 1976. - С. 53-163.

6. Патент СССР №1211288 кл С 12 N 15 //00 С 12 R 9/58, С 12 R. Живильне середовище для росту штаму М-81 *Hirshioporus laricinus* – продуценту молокозсідального ферменту// Бойко МЛ, Негруцький С.Ф., Федотов О.В, Борисенко О.О. - №22915 UA; опубл. 15.02.86 Бюл №4.

7. Присецкий Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів./ Ю.Г. Присецкий - Донецьк: Кассиопа, 1999. - 210с.

8. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. - (Справочник) /С.М. Семенов - М: В.О. «Агропромиздат», 1990, 240с.

9. Федорова Л.П.. Влияние различных источников углеродного питания на молокозвертывающую активность микоризного гриба / Л.Н. Федорова, Т.Н Дроздова. //Микол. и фитопатол., 1982. - Т.16, вып. 2. - С. 133-138. (прототип)

10. Типограф Д.Я. Условия культивирования гриба *Aspergillus candidus* и его ферментные комплексы /Д.Я. Типограф, Т.А. Петина // Прикл. биохим. и микробиол., 1966. - Т-2, - С.417-424.

11. Kawai M. Studies on milk clotting enzymes produced by Basidiomycetes// Screening test of Basidiomycetes for the production of milk clotting enzymes //Kawai M, Mukai N. // Agric. Biol. Chem, 1970. -V.34, 2. - P. 159-163.

12. Koshland D.E., Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis // Koshland D.E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1958 Feb; 44(2): S. 98-104.