



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61605 (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 P-04 IRPEX LACTEUS FR.-ПРОДУЦЕНТА СИЧУЖНОГО ФЕРМЕНТУ

1

(21) u201015573

(22) 23.12.2010

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) БОЙКО МИХАЙЛО ІВАНОВИЧ, ДОРОШКЕ-ВИЧ НЕЛЯ ВІКТОРІВНА, ТКАЧЕНКО НАТАЛІЯ ПЕТРІВНА, ТЕРЕЩЕНКО ГРИГОРІЙ СЕРГІЙОВИЧ, БІЛУН ОЛЕКСАНДР ВАЛЕРІЙОВИЧ, КУЗ-НЕЦОВА ІРИНА АНАТОЛІЇВНА

(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Живильне середовище для культивування штаму P-04 Irpex lacteus Fr. - продуцента сичужного ферменту, що містить пептон, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

2

$CaCl_2$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, дистильовану воду, яке **відрізняється** тим, що додатково містить сахарозу при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

сахароза	7,4988
пептон	5,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$CaCl_2$	0,02
KH_2PO_4	0,6
K_2HPO_4	0,4
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001
вода дистильована	решта.

Корисна модель відноситься до біотехнології і може бути використана у мікробіологічній промисловості для одержання ферменту сичужної дії на основі культивування нового продуцента - штаму P-04 Irpex lacteus Fr. Гриб Irpex lacteus Fr. відомий як активний продуцент протеолітичних ферментів, в тому числі й молокозсідальних [1, 2, 3]. Цей фермент після медико-біологічних досліджень може використовуватися у виробництві твердих сирів та стати заміником гостродефіцитного сичужного ферменту тваринного походження - реніну [2, 4].

Відомі середовища, які містять сахарозу та мінеральні компоненти (середовище Білай, Хеннеберга), глюкозу та мінеральні компоненти (середовище Чапека-Докса), забезпечують низьку активність молокозсідального ферменту базидіальних грибів або взагалі вона відсутня в період культивування (1-15 діб) [5].

Відомі також живильні середовища невизначеного складу - сусло-агар та картопляний агар, які характеризуються невеликими значеннями молокозсідальної активності (МЗА) [6]. Суттєвим недоліком цих середовищ є їх невизначеність компонентів, які можуть по-різному впливати на показники МЗА штаму P-04 [6, 7].

Найбільш близьким за суттю і технічним результатом є глюкозо-лептонне живильне середовище за таким складом, г/л: глюкоза - 10, пептон -

3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5, $CaCl_2$ - 0,05, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,001, дистильована вода - до 1 л, яке широко застосовується у мікробіологічній практиці [8] та для культивування гриба Irpex lacteus Fr. - продуцента молокозсідального ферменту [9]. Компоненти цього середовища сприяють виділенню сичужного ферменту штамом P-04 на протязі всього його періоду культивування, однак МЗА культурального фільтрату (КФ) характеризується невисокими значеннями, що свідчить про недостатнє забезпечення продуцента необхідними живильними речовинами для його біосинтетичної діяльності.

В основу корисної моделі поставлено завдання удосконалення живильного середовища для культивування штаму P-04 Irpex lacteus Fr. - продуцента сичужного ферменту, у якому досягнення високих значень МЗА за поверхневого культивування досягається шляхом зміни концентрації чотирьох основних компонентів стандартного глюкозо-пептонного середовища. Удосконалення живильного середовища проводили за методом повного факторного експерименту 2^4 (ПФЕ 2^4) [10]. Такі експерименти дають можливість виявити найбільш ефективний вплив кожного окремого фактора та їх взаємозв'язку на біосинтез екзопротеїназ молокозсідальної дії штаму P-04 I. lacteus.

(13) U

(11) 61605

(19) UA

Поставлене завдання вирішується тим, що живильне середовище для культивування штаму P-04 *I. lacteus* - продуцента сичужного ферменту, яке містить пептон, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та дистильовану воду, згідно корисної моделі, додатково містить сахарозу при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

сахароза	7,4988
пептон	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
CaCl_2	0,02
KH_2PO_4	0,6
K_2HPO_4	0,4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001
вода дистильована до	1 л.

Живильне середовище готують шляхом послідовного розчинення його компонентів з наступним доведенням дистильованою водою до 1 л. Молокозсідаьну активність культурального фільтрату ($\text{МЗА}_{\text{кф}}$) визначають за методом Каваї і Мукаї за формулою [11]:

$$\text{МЗА}_{\text{кф}} = \frac{40 \cdot 100 \cdot K}{t} = \text{од./мл формула 1,}$$

де $\text{МЗА}_{\text{кф}}$ - молокозсідаьна активність культурального фільтрату, од./мл;

K - коефіцієнт розведення культурального фільтрату (КФ);

t - час, протягом якого з 100 мл молока при додаванні 1 мл КФ утворюється щільний згусток, хв.;

40 - середній час зсідання молока при виробництві сирів, хв. Приклад конкретного виконання.

Приклад 1

Приготувати оптимізоване живильне середовище для культивування штаму P-04 *I. lacteus* Fr. - продуцента сичужного ферменту.

Наважки 7,4988 г сахарози, 5,0 г пептона, 0,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 г CaCl_2 , 0,6 г KH_2PO_4 , 0,4 г K_2HPO_4 та 0,001 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ послідовно розчиняли у 500 мл дистильованої води. Отриманий розчин складових середовища доводили до 1 л дистильованою водою. Кислотність середовища доводили до 3,5 рН, яка є оптимальною для росту продуцента P-04, за допомогою крапель 10% HCl . Живильне середовище розливали по 50 мл в конічні колби Ерленмейєра ємністю 250 мл та стерилізували в автоклаві АГ-1 під тиском 0,8-1 атм протягом 40 хв. Через три доби контролю стерильності живильного середовища проводили інокуляцію 7-добовою агаризованою, чистою культурою штаму P-04 *I. lacteus*. Для інокуляції використовували шматочки міцелію, приблизно, 1×1 см.

Гриб вирощували протягом 10 діб в термостаті ТС-80М за оптимальної температури 30-32°C. Потім міцелій гриба відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування. Одержаний культуральний фільтрат використовували для визначення його молокозсідаьної активності за формулою 1. Молокозсідаьна активність культурального фільтрату дорівнювала 2590,37 од./мл.

Таким чином, нове модифіковане живильне середовище, яке містить, г/л: сахарозу - 7,4988, пептон - 5,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2, CaCl_2 - 0,02, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001, дистильовану воду - 1 л, є оптимальним для куль-

тивування штаму P-04 *I. lacteus* Fr., тому що забезпечує найвищі значення його МЗА. Високий рівень МЗА (2590,37 од./мл) вказує на те, що запропоноване живильне середовище максимально містить усі необхідні речовини для синтезу сичужного ферменту штамом P-04 *I. lacteus* Fr.

Інша кількість сахарози в живильному середовищі сприяла невеликим значенням МЗА культурального фільтрату штаму P-04.

Приклад 2

Приготувати живильне середовище для культивування штаму P-04 *I. lacteus* Fr. - продуцента сичужного ферменту.

Наважки 3,4988 г сахарози, 5,0 г пептона, 0,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 г CaCl_2 , 0,6 г KH_2PO_4 , 0,4 г K_2HPO_4 та 0,001 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ послідовно розчиняли у 500 мл дистильованої води. Отриманий розчин складових середовища доводили до 1 л дистильованою водою. Кислотність середовища доводили до 3,5 рН, яка є оптимальною для росту продуцента P-04, за допомогою крапель 10% HCl . Живильне середовище розливали по 50 мл в конічні колби Ерленмейєра ємністю 250 мл та стерилізували в автоклаві АГ-1 під тиском 0,8-1 атм протягом 40 хв. Через три доби контролю стерильності живильного середовища проводили інокуляцію 7-добовою агаризованою, чистою культурою штаму P-04 *I. lacteus*. Для інокуляції використовували шматочки міцелію, приблизно, 1×1 см.

Гриб вирощували протягом 10 діб в термостаті ТС-80М за оптимальної температури 30-32°C. Потім міцелій гриба відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування. Одержаний культуральний фільтрат використовували для визначення його молокозсідаьної активності за формулою 1. МЗА культурального фільтрату після культивування штаму P-04 в даному випадку дорівнювала 2322,21 од./мл.

Приклад 3

Приготувати живильне середовище для культивування штаму P-04 *I. lacteus* Fr. - продуцента сичужного ферменту.

Наважки 11,4988 г сахарози, 4,0 г пептона, 0,4 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,04 г CaCl_2 , 0,6 г KH_2PO_4 , 0,4 г K_2HPO_4 та 0,001 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ послідовно розчиняли у 500 мл дистильованої води. Отриманий розчин складових середовища доводили до 1 л дистильованою водою. Кислотність середовища доводили до 3,5 рН, яка є оптимальною для росту продуцента P-04, за допомогою крапель 10% HCl . Живильне середовище розливали по 50 мл в конічні колби Ерленмейєра ємністю 250 мл та стерилізували в автоклаві АГ-1 під тиском 0,8-1 атм протягом 40 хв. Через три доби контролю стерильності живильного середовища проводили інокуляцію 7-добовою агаризованою, чистою культурою штаму P-04 *I. lacteus*. Для інокуляції використовували шматочки міцелію, приблизно, 1×1 см.

Гриб вирощували протягом 10 діб в термостаті ТС-80М за оптимальної температури 30-32°C. Потім міцелій гриба відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування. Одержаний культуральний фільтрат використовували для визначення його молокозсідаьної активності за формулою 1. Більша кількість сахарози в живильному середо-

вищі сприяла утворенню невисокої МЗА культурального фільтрату штаму Р-04 і дорівнювала 1118,75 од./мл.

Таким чином, приклади 2 і 3 доводять недоцільність застосування для культивування штаму Р-04 *Irpex lacteus* Fr. сахарози в кількості, яка є нижчою або вищою оптимального значення 7,4988 г/л.

Джерела інформації, використані при складанні заявки.

1. Белова Н.В. Базидиомицеты - источник биологически активных веществ / Н.В. Белова // Растительные ресурсы. - 1991. - №2. - С. 8-17.

2. Бойко М.І. Фізіолого-біохімічні особливості системи *Pinus sylvestris* L. - *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. і перспективи практичного використання екзометаболітів деяких дереворуйнівних грибів: автореф. дис. на здобуття д-ра біол. наук.: спец. 03.00.12 "Фізіологія рослин", спец. 03.00.21 "Мікологія" / М.І. Бойко - К., 1996. - 51 с.

3. Бойко С.М. Біологічні особливості штамів *Irpex lacteus* Fr. - продуцентів протеїназ молокозсідальної дії: автореф. дис. на здобуття канд. біол. наук.: спец. 03.00.21 "Мікологія" / С.М. Бойко - К., 2002. - 20 с.

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

5. Пат. 24126 Україна, МПК⁶ C12N 1/38, 9/14. Живильне середовище для росту штаму М-81 *Hirshiorporus laricinus* - продуценту молокозсідного ферменту / Нікітіна О.А., Бойко М.І., Негруцький С.Ф.; заявитель і патентотримувач Донецький

держ. ун-т. - №97073489; заявл. 02.07.98; опубл. 31.08.98, Бюл. №4.

6. Пат. 23877 Україна, МПК⁶ A23C 19/032, C12N 5/00. Живильне середовище для виділення та пересіву чистих культур штамів базидіального гриба *Irpex lacteus* Fr. / Кузнецова І.А., Клименко Г.В., Бойко М.І.; заявитель і патентотримувач Донецький нац. ун-т. - №u200700908; заявл. 29.01.2007; опубл. 11.06.2007, Бюл. №8.

7. Кузнецова І.А. Біосинтетичні властивості гриба *Irpex 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.

8. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов / С.М. Семенов - М.: ВО "Агропромиздат" 1, 1990. - 240 с.

9. Пат. 34088 А Україна, МКВ C12N 9/50, A23C 19/032. Штам соматичних культур макроміцету *Irpex lacteus* Fr. - Д-4 продуцент молокозсідального ферменту / Бойко С.М., Бойко М.І., Єфанова І.Л. - №99063016; заявл. 02.06.99; опубл. 15.02.01, Бюл. №1. (прототип).

10. Максимов В.Н. Оптимизация состава питательной среды методом математического планирования эксперимента / В.Н. Максимов, М.Н. Пименова, Н.Н. Гречушкина // Практикум по микробиологии - М: изд-во МГУ, 1976. - С. 153-163.

11. Kawai M. Studies on milk clotting enzymes produced by Basidiomycetes 1. Screening test of Basidiomycetes for the production of milk clotting enzymes / M. Kawai, N. Mukai // Agric. Biol. Chem. - 1970. - V.34, №2. - P. 159-163.