



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14941 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 9/08
C12N 9/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ ПЕРОКСИДАЗ ШТАМУ 523 БАЗИДІОМІЦЕТУ LENTINUS EDODES (BERK.) SING.

1	2
(21) u200508655	пролін 8,34 та 2,12
(22) 12.09.2005	фенілаланін 6,47 та 5,08
(24) 15.06.2006	метіонін 0,09 та 1,24
(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.	гліцин 7,79 та 5,01
(72) Федотов Олег Валерійович	серин 7,64 та 4,76
(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ	треонін 6,85 та 5,20
(57) Амінокислотний склад ферментних препаратів	цистеїн 3,43 та 0,35
пероксидаз штам 523 базидіоміцету Lentinus	тирозин 5,58 та 4,10
edodes (Berk.) Sing., які містять фермент, який	аспарагінова кислота
відрізняється тим, що ферментом є пероксидази	(аспарагін) 12,52 та 11,07
позаклітинного та внутрішньоклітинного похо-	глутамінова кислота
дження, які містять в собі, відповідно мг %:	(глутамін) 8,78 та 15,74
аланін 6,88 та 6,74	лізін 4,35 та 9,05
валін 5,63 та 7,20	аргінін 1,37 та 7,62
лейцин 8,74 та 8,91	гістидин 1,96 та 0,28.
ізолейцин 3,58 та 5,53	

Корисна модель відноситься до мікології та біотехнології і може бути використана на підприємствах мікробіологічної, харчової, фармацевтичної та інших галузей промисловості.

Перспективним джерелом лікарських препаратів є базидіальні гриби. Такі препарати з базидіоміцетів сприяють адаптації організму до несприятливих умов навколишнього середовища, мають загальнозміцнюючу і тонізуючу дію, прискорюють виведення з нього радіонуклідів, важких металів, різних токсинів тощо. У лікарських засобів на основі їстівних базидіоміцетів не виявлені небажані побічні ефекти і токсична дія. Лікарську дію пов'язують, зокрема, зі здатністю грибів до біосинтезу всіх класів ферментів. Отже, вивчення структури та функцій біологічно активних речовин грибів, в тому числі ферментів представляє науковий і практичний інтерес [1, 2, 5].

Сітате Lentinus edodes (Berk.) Sing. - один з найбільш популярних їстівних ксилотрофів у східних країнах, який все більше культивують і в інших країнах. Гриб виявляє загальнозміцнюючу, антивірусну, антиоксидантну, гіпотензивну, протипухлинну, імуномодулюючу, гіпоглікемічну, гіполіпідемічну, антистресову лікарську дію, підвищує

імунітет [1, 6, 8]. Всебічно вивчені живильні потреби гриба, біосинтетична активність, хімічний склад плодових тіл і міцелію, розроблені технології твердофазного і глибинного культивування на різних середовищах. Глибинним методом вирощування сітате отримують низку цінних лікарських препаратів [5].

В результаті дії деяких оксидаз утворюється перекис водню, здатний відігравати роль окислювача. Окислення органічних сполук перекисом водню відбувається в організмі під дією пероксидаз (КФ 1.11.1.7.). Ферменти розкладають H_2O_3 зі звільненням активного атомарного кисню, який бере участь в окисненні різних поліфенолів, амінів, а також жирних кислот, цитохрому, глутатіону. З'ясовано, що пероксидази разом з каталазою відіграють відповідну захисну роль антиоксидантної системи організму на несприятливі умови життєдіяльності і інфекції при утворенні токсичних сполук реакцій перекисного окиснення ліпідів [3, 6]. Виділені в чистому виді ферменти при визначених умовах каталізують різноманітні перетворення, які мають велике значення в різних галузях практичної діяльності. Отже, зростаючий дефіцит тваринної сировини - основного джерела промислових

(19) UA (11) 14941 (13) U

ензимів обумовлює пошук нових продуцентів, зокрема поміж базидіоміцетів, які б мали високі виробничі властивості.

Відомі фізико-хімічні характеристики позаклітинних протеїназ культур базидіоміцетів *Coriolus consors*, *C. hirsutus*, *C. versicolor*, *Daedaleopsis styracina*, *Fomitopsis castaneae*, *F. cytisina*, *F. pinicola*, *Irpex lacteus*, *Lenzites betulina*, *Pycnoporus coccineus*, *Schizophyllum commune*, *Trametes sanguineus*, *Coprinus macrorhizus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Russula decolorans*. Однак, дослідження охоплюють достатньо вузьку систематичну групу грибів, надаються характеристики ферментних препаратів різного ступеня очистки, не наводяться дані з активності пероксидаз досліджених культур [2].

Найбільш близький за технічною суттю і досяжності результату є амінокислотний склад молокозсідальних ферментних препаратів (ФП) базидіальних ксилотрофів *Corticium laeve* Fr. (штам Р-330); *Chaetoporus ambiguus* (Bres.) Bond. et Sing. (В-062); *Fibuloporia mollusca* (Pers.) Bond. et Sing. (А-020); *Tyromyces lacteus* (Fr.) Murr. (А-027); *Tyromyces revolutus* (Bres.) Bond. et Sing. (А-025); *Tyromyces undosus* (Peck.) Murr. (С-070, М-250); *Irpex lacteus* (Fr.: Fr.) Fr. (В-059, М-232, М-253); *Amiloporia lenis* (Karst.) Bond. et Sing. (А-004); *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Ryv. (М-81) і *Hydnum ochraceum* Pers. (В-046). Штами грибів вирощували поверхнево на рідкому сусло-пептонному середовищі, що містило знехмілене пивне сусло (4° по Балінгу) і ферментативний пептон (3г/л) до максимальної молокозсідальної активності культурального фільтрату. Грибні ферментні препарати, які мали позаклітинне походження, отримували шляхом фракціонування сульфатом амонію з культурального фільтрату. Кількісний вміст зв'язаних амінокислот і білка у молокозсідальних ФП визначали за допомогою амінокислотного аналізатора моделі ААА-881, після їх кислотного гідролізу. Не наводяться дані з активності пероксидаз досліджених культур [7].

В основу корисної моделі покладено завдання встановлення амінокислотного складу ферментних препаратів пероксидаз штаму 523 базидіоміцету *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., який відрізняється від прототипу ферментативною активністю, походженням ферменту, амінокислотним складом, продуцентом та дешевий у виробництві.

Поставлене завдання вирішується тим, що встановлено амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз штаму 523 базидіоміцету *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., які містять фермент, згідно корисної моделі в якості ферменту є пероксидази позаклітинного та внутрішньоклітинного походження і містять в собі, відповідно мг %:

аланін	6,88 та 6,74;
валін	5,63 та 7,20;
лейцин	8,74 та 8,91;
ізолейцин	3,58 та 5,53;
оксипролін	0,00 та 0,00;
пролін	8,34 та 2,12;
фенілаланін	6,47 та 5,08;
метіонін	0,09 та 1,24;
гліцин	7,79 та 5,01;

серин	7,64 та 4,76;
треонін	6,85 та 5,20;
цистеїн	3,43 та 0,35;
тирозин	5,58 та 4,10;
аспарагінова кислота (аспарагін)	12,52 та 11,07;
глутамінова кислота (глутамін)	8,78 та 15,74;
лізін	4,35 та 9,05;
аргінін	1,37 та 7,62;
гістидин	1,96 та 0,28.

Пропонована корисна модель є нова, тому що не відома з амінокислотного складу і вмісту білку грибних ферментних препаратів пероксидаз, ферментативної активності та продуценту.

Приклад конкретного виконання 1. Штам 523 отримано з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України [4]. Культивування штаму 523 базидіоміцету *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. проводять в колбах об'ємом 1 або 2 літри. Колби містять 350 чи 700 мл, відповідно, стерильного глюкозо-пептонного середовища наступного складу, г/л:

глюкоза	10,0;
пептон	3,0;
KH ₂ PO ₄	0,6;
K ₂ HPO ₄	0,4;
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5;
CaCl ₂	0,05;
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,001;
дистильована вода	до 1л [7].

Інокулюм становить 5-10%. Культивування проводять до максимальних значень пероксидазної активності культурального фільтрату і міцелію - протягом 15-20-ти діб в термостаті при температурі 27,5°С.

Визначають ПА культурального фільтрату, вегетативного міцелію і ферментного препарату (ФП) штаму 523 базидіоміцету *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. за методом, який базується на вимірі за допомогою фотоелектроколориметра (наприклад, приладу КФК-2-УХЛ 4,2) інтенсивності забарвлення продукту окиснення о-діанізидину перекисом водню, який утворився при дії пероксидази. Одиниця пероксидази відповідає кількості ферменту, що каталізує перетворення 1мкмольа Н₂О₂ за одну хвилину в оптимальних умовах. Розрахунки проводять за формулою [3]:

$$X = \frac{E \cdot V_1}{E_1 \cdot K \cdot V_2 \cdot t} \cdot p,$$

де, X - активність ферменту пероксидази; E - екстинкція; V₁ - об'єм забарвленої проби; V₂ - об'єм культурального фільтрату (КФ) або гомогенату міцелію (МГ); E₁ - коефіцієнт мікромолярної екстинкції (0,0128); K - коефіцієнт для перерахунку з міліметрів у літри (1000); t - час інкубації (5хв.); p - коефіцієнт розведення культурального фільтрату чи ФП.

Приклад конкретного виконання 2. Фракціонування пероксидаз проводять сульфатом амонію. Використовують цей метод завдяки великій розчинності у воді та стабілізуючій дії на білкову молекулу (NH₄)₂SO₄ [4, 7]. Культуральну рідину відділяють від міцелію шляхом

фільтрування. Отриманий міцелій додатково підсушують на фільтрувальному папері і охолоджують до $0\pm 1^\circ\text{C}$. Підготовлений міцелій гомогенізують шляхом розтирання з абразивним порошком у ступці за допомогою товкачика, суспендіують охолодженою дистильованою водою в співвідношенні 1:20. Осад відділяють центрифугуванням на рефрижераторній центрифугі при $5\pm 1^\circ\text{C}$, відцентровому прискоренні $2000g$ протягом 15 хвилин. Осаджень білків по фракціям з гомогенату міцелію та культурального фільтрату здійснюють при $5\pm 1^\circ\text{C}$ шляхом поступового збільшення концентрації сульфату амонію. Відповідно до обраного насичення, у культуральний фільтрат чи супернатант додають сульфат амонію. Фракцію білку, яка утворила осад, відділяють центрифугуванням на рефрижераторній центрифугі при $5\pm 1^\circ\text{C}$, відцентровому прискоренні $2000g$ протягом 15 хвилин. Наступним етапом проводять первинну очистку отриманої білкової фракції за допомогою діалізу проти охолодженої до $5\pm 1^\circ\text{C}$ дистильованої

води протягом 24 годин. Прилад для діалізу мистився в холодильнику

Отримані розчини фракцій білків піддають подальшим дослідженням. Зокрема - ліофільний сушці, наприклад на приладі "Іней-3-2" та визначають пероксидазну активність ферментних препаратів, які мають вид порошку від світло-кремового до світло-коричневого забарвлення, добре розчинні у воді.

Пероксидазна активність ферментного препарату з культурального фільтрату штаму 523 базидіоміцету *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. дорівнює $X_{\text{КФ}}=2,18\cdot 10^{-2}$ од/г; активність ФП міцеліальних пероксидаз дорівнює $X_{\text{МГ}}=2,32\cdot 10^{-2}$ од/г.

Приклад конкретного виконання 3. Амінокислотний склад ФП пероксидаз штаму 523 базидіоміцету *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. та вміст білку у препараті визначають за допомогою амінокислотного аналізатора, наприклад моделі ААА-881, після кислотного гідролізу білків (табл.).

Таблиця

Вміст білку і амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз штаму 523 базидіоміцету *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.

№ з/п	Амінокислота	Вміст амінокислот, мг %	
		ФП _{КФ}	ФП _{МГ}
1.	Ала	6,88	6,74
2.	Вал	5,63	7,20
3.	Лей	8,74	8,91
4.	Іле	3,58	5,53
5.	О-про	0,00	0,00
6.	Про	8,34	2,12
7.	Фен	6,47	5,08
8.	Мет	0,09	1,24
9.	Глі	7,79	5,01
10.	Сер	7,64	4,76
11.	Тре	6,85	5,20
12.	Цис	3,43	0,35
13.	Тир	5,58	4,10
14.	Асп	12,52	11,07
15.	Глу	8,78	15,74
16.	Ліз	4,35	9,05
17.	Арг	1,37	7,62
18.	Гіс	1,96	0,28
% білка в ФП		20,0547	39,7189

Дані таблиці подаються без зазначення похибки, оскільки представляють точні результати амінокислотного аналізу одного зразка ферментного препарату, отриманого з культурального фільтрату і одного - з міцелію. Амінокислоти розташовані залежно від природи радикалів (амфотерності) білкових молекул. З групи неполярних, гідрофобних амінокислот на увагу заслуговує оксипролін (О-про), який на відміну від ФП прототипу не виявлено у складі білків пероксидаз штаму 523 сїтаке. Вміст в ФП гліцину (Глі) з полярних, гідрофільних амінокислот, пояснюється, скоріше всього, внесенням у живильне середовище ферментативного пептону, що має у складі до

2,22% цієї амінокислоти від вмісту азоту. Високий вміст негативно заряджених аспарагінової (Асп) і глутамінової (Глу) амінокислот у ферментних білках може свідчити про їх кислу природу. Але це припущення вірне в тому разі, коли в білках вони не знаходяться у вигляді глутаміну і аспарагіну, що при кислотному гідролізі довести не можливо. Побічним показником переваги у структурі білків ФП кислих амінокислот може бути те, що 0,1%-ні водні розчини ферментних препаратів виявили низький рівень рН, так цей показник для ФП_{КФ} дорівнював 4,85; а ФП_{МГ} - 5,10. Вміст у досліджених білках основних, позитивно заряджених амінокислот аргініну (Арг) та гістидину (Гіс) є

значно нижчим, ніж попередніх і не може суттєво впливати на природу протеїну. Незначний вміст білка в ФП штаму 523 сїїтаке, скоріше за все пояснюється наявністю в них високополімерних полісахаридів.

Таким чином, отримані грибні ферментні препарати пероксидаз ендо- і екзогенного походження штаму 523 базидіоміцету *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., які мають індивідуальні характеристики вмісту амінокислот і білка. Встановлено кількісне співвідношення амінокислот ФП пероксидаз, яке свідчить про їх кислу природу. Відпрацьований спосіб отримання та визначений склад ферментних препаратів пероксидаз штаму 523 базидіоміцету *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. відкривають перспективи їх використання у харчовій і фармацевтичній промисловостях.

Джерела інформації:

1. Бухало А.С., Соломко Е.Ф., Митропольська Н.Ю. Базидіальні макроміцети з лікарськими властивостями // Укр. ботан. журн. - 1996. - 53, №3. - С.192-201.

2. Денисова Н.П. Протеолитические ферменты базидиальных грибов, таксономические и экологические аспекты их изучения: Автореф. ... дис. д-ра биол. наук. - Л., 1991. - 31с.

3. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. Методы экспериментальной микологии. Справочник. - К.: Наук. думка, 1982. - 550с.

4. Каталог культур шапинкових грибів (IBK) / А.С. Бухало, Н.Ю. Митропольська - К.: Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, 2001. - 40с.

5. Соломко Э.Ф., Дудка И.А. Перспективы использования высших базидиомицетов в микробиологической промышленности // ВНИИСЭНТИ: Обзорная информация. Сер. 3. - М., 1985. - 48с.

6. Федотов О.В. Вміст продуктів перекисного окислювання ліпідів в міцелії грибів родів *Pleurotus* (Fr.) Kumm. та *Lentinus* (Berk.) Sing. / Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. - Луганськ: ЛНАУ, 2003. - №22 (34). Сер. "Біологічні науки". - С.79-81.

7. Федотов О.В. Активні продуценти молокозгортаючих ферментів серед гіменомицетів, їх біологічні особливості та перспективи застосування: Автореф. дис. ... к-та біол. наук. - К., 1995, - 20с. (прототип).

8. Tardif A. La Mycotherapie ou Les proprietes Medicinales des Champignons. - Paris, 2000. - 167p.