



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14942 (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 F-VV БАЗИДІОМІЦЕТУ FLAMMULINA VELUTIPES (CURT.:FR.) SING.

1	2
(21) u200508663	пролін 2,93 та 4,60
(22) 12.09.2005	фенілаланін 10,03 та 4,93
(24) 15.06.2006	метіонін 5,57 та 2,07
(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.	гліцин 4,80 та 7,01
(72) Федотов Олег Валерійович	серин 3,53 та 3,00
(73) Донецький національний університет	треонін 3,00 та 3,99
(57) Амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз штамів F-vv базидіоміцету Flammulina velutipes (Curt.: Fr.) Sing., які містять фермент, який відрізняється тим, що ферментом є пероксидази позаклітинного та внутрішньоклітинного походження, які містять в собі, відповідно, мг %:	цистеїн 1,37 та 1,45
аланін 2,32 та 2,15	тирозин 9,72 та 7,84
валін 5,34 та 4,06	аспарагінова кислота (аспарагін) 12,70 та 14,08
лейцин 8,87 та 8,91	глутамінова кислота (глутамін) 10,76 та 12,39
ізолейцин 5,56 та 6,25	лізін 6,86 та 8,58
	аргінін 4,04 та 5,74
	гістидин 2,60 та 2,95.

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

Вивчення структури та функцій ферментів вищих базидіальних грибів представляє значний інтерес для технічної мікробіології, тому що за характером живлення базидіоміцети - типові гетеротрофи, життєдіяльність яких значною мірою залежить від субстрату, а їх ферментативний апарат різноманітний і лабільний [1, 3]. Міцеліальні культури, що продукують окисні і гідролітичні ферменти можуть знайти широке застосування для біоконверсії лігніфікованих рослинних відходів з одночасним їх збагаченням грибним білком [6, 8].

Flammulina velutipes (Curt.: Fr.) Sing. - зимовий опеньок - дереворуйнівний сапротроф, який широко культивують. Гриб добре досліджено в культурі, вивчені його життєві цикли та потреби в живленні. Доведено його антибактеріальні, антивірусні, антифунгальні, протипухлинні, імуномодуючі, гіпоглікемічні, тромболітичні і антиоксидантні лікарські властивості [2, 5, 9].

Окиснення поліфенолів, амінів, а також жирних кислот, цитохрому і глутатіону каталізують

ферменти пероксидази (КФ 1.11.1.7.). Вони розкладають перекис водню зі звільненням активного атомарного кисню, який бере участь в окисненні [4]. З'ясовано, що пероксидази разом з каталазою відіграють відповідну захисну роль антиоксидантної системи організму на несприятливих умовах життєдіяльності і інфекції при утворенні токсичних сполук реакції перекисного окиснення ліпідів. Виділені в чистому виді ферменти при визначених умовах каталізують різноманітні перетворення, які мають велике значення в різних галузях практичної діяльності [1]. Отже, зростаючий дефіцит тваринної сировини - основного джерела промислових 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*. Од-

(19) UA (11) 14942 (13) U

нак, дослідження охоплюють достатньо вузьку систематичну групу грибів, надаються характеристики ферментних препаратів різного ступеня очистки, не наводяться дані з активності пероксидаз досліджених культур [3].

Найбільш близький за технічною суттю і досяжності результату є амінокислотний склад молокозсідальних ферментних препаратів (ФП) базидіальних ксилотрофів *Corticium laeve* Fr. (штам P-330); *Chaetoporus ambiguus* (Bres.) Bond. et Sing. (B-062); *Fibuloporia mollusca* (Pers.) Bond. et Sing. (A-020); *Tyromyces lacteus* (Fr.) Murr. (A-027); *Tyromyces revolutus* (Bres.) Bond. et Sing. (A-025); *Tyromyces undosus* (Peck.) Murr. (C-070, M-250); *Irpep lacteus* (Fr.: Fr.) Fr. (B-059, M-232, M-253); *Amiloporia lenis* (Karst.) Bond. et Sing. (A-004); *Hirschporus laricinus* (Karst.) Ryv. (M-81) і *Hydnum ochraceum* Pers. (B-046). Штами грибів вирощували поверхнево на рідкому суцільно-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 AAA-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 F-vv базидіоміцету *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) 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 F-vv базидіоміцету *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing., які містять фермент, згідно корисної моделі в якості ферменту є пероксидази позаклітинного та внутрішньоклітинного походження і містять в собі, відповідно мг %:

аланін	2,32 та 2,15;
валін	5,34 та 4,06;
лейцин	8,87 та 8,91;
ізолейцин	5,56 та 6,25;
оксипролін	0,00 та 0,00;
пролін	2,93 та 4,60;
фенілаланін	10,03 та 4,93;
метіонін	5,57 та 2,07;
гліцин	4,80 та 7,01;
серин	3,53 та 3,00;
треонін	3,00 та 3,99;
цистеїн	1,37 та 1,45;
тирозин	9,72 та 7,84;
аспарагінова кислота (аспарагін)	12,70 та 14,08;
глутамінова кислота (глутамін)	10,76 та 12,39;
лізін	6,86 та 8,58;
аргінін	4,04 та 5,74;
гістидин	2,60 та 2,95.

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 F-vv зимового опенька *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. виділено за методом виділення чистих культур базидіоміцетів з природної популяції, з плодівих тіл, які росли на пні робінії [*Robinia pseudoacacia* L.] біля автомобільної траси м. Донецька [4, 5]. Культивування штаму F-vv *F. velutipes* проводять в колбах об'ємом 1 або 2 літри. Колби містять 350 чи 700мл, 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 1 л [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°C.

Визначають ПА культурального фільтрату, вегетативного міцелію і ферментного препарату (ФП) штаму F-vv *Flammulina velutipes* за методом, який базується на вимірі за допомогою фотоелектроколориметра (наприклад, приладу КФК-2-УХЛ 4,2) інтенсивності забарвлення продукту окиснення о-діанізідину перекисом водню, який утворився при дії пероксидази. Одиниця пероксидази відповідає кількості ферменту, що каталізує перетворення 1мкмольа H₂O₂ за одну хвилину в оптимальних умовах. Розрахунки проводять за формулою [4]:

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

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. Виділення пероксидаз проводять шляхом осадження білкових молекул 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±1°C. Підготовлений міцелій гомогенізують шляхом розтирання з абразивним порошком у ступці за допомогою товчачика, суспендіують охолодженою дистильованою водою в співвідношенні 1:20. Осад відділяють центрифугуванням на рефрижераторній центрифугі при 5±1°C, відцентровому прискоренні 2000 g протягом 15

хвилин. Осадження білків по фракціям з гомогенату міцелію та культурального фільтрату здійснюють при $5\pm 1^\circ\text{C}$ шляхом додавання сульфату амонію до 40-70% та 40-60% насичення відповідно. Фракцію білку, яка утворила осад, відділяють центрифугуванням на рефрижераторній центрифугі при $5\pm 1^\circ\text{C}$, відцентровому прискоренні 2000 g 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 мстився в холодильнику

Отримані розчини фракцій білків піддають подальшим дослідженням. Зокрема - ліофільній сушці, наприклад на приладі "Иней-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 F-vv дорівнює $X_{\text{КФ}} = 2,4 \cdot 10^{-2}$ од/г; активність ФП міцеліальних пероксидаз дорівнює $X_{\text{МГ}} = 4,6 \cdot 10^{-2}$ од/г.

Приклад конкретного виконання 3. Вміст білку і амінокислотний склад ФП пероксидаз штаму F-vv базидіоміцету *Flammulina velutipes* визначають за допомогою амінокислотного аналізатора, наприклад моделі ААА-881, після кислотного гідролізу білків. Дані з вмісту білка в ФП і аналізу надано у таблиці, де амінокислоти розташовані залежно від природи радикалів (амфотерності) білкових молекул. Дані подаються без зазначення похибки, оскільки представляють точні результати амінокислотного аналізу одного зразка ферментного препарату пероксидаз з культурального фільтрату і одного - з міцелію.

Таблиця

Вміст білку і амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз штаму F-vv базидіоміцету *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing.

№ з/п	Амінокислота	Вміст амінокислот, мг %	
		ФП _{КФ}	ФП _{МГ}
1.	Ала	2,32	2,15
2.	Вал	5,34	4,06
3.	Лей	8,87	8,91
4.	Іле	5,56	6,25
5.	О-про	0,00	0,00
6.	Про	2,93	4,60
7.	Фен	10,03	4,93
8.	Мет	5,57	2,07
9.	Глі	4,80	7,01
10.	Сер	3,53	3,00
11.	Тре	3,00	3,99
12.	Цис	1,37	1,45
13.	Тир	9,72	7,84
14.	Асп	12,70	14,08
15.	Глу	10,76	12,39
16.	Ліз	6,86	8,58
17.	Арг	4,04	5,74
18.	Гіс	2,60	2,95
% білка в ФП		39,6309	50,4938

Отже, отримані ферментні препарати відрізняються за вмістом білка, якого більше в препараті з міцелію. З групи неполярних, гідрофобних амінокислот на увагу заслуговує оксипролін (О-про), який на відміну від ФП прототипу не виявлено у складі білків пероксидаз штаму F-vv зимового опенька. 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 знаходять-

ся 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 ко дорівнював 5,75; а ФП мг - 5,80. 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.

Таким чином, грибні ферментні препарати по-заклітинних та міцеліальних пероксидаз штаму F-vv базидіоміцету *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. мають індивідуальні характеристики вмісту білка та склад амінокислот, що свідчить про їх ки-

слу природу. Застосований дешевий спосіб отримання та визначений склад ферментних препаратів пероксидаз F-vv базидіоміцету *Flammulina velutipes* відкривають перспективи їх використання на підприємствах мікробіологічної, фармацевтичної та інших галузей промисловості.

Джерела інформації, які використані при укладанні заявки

1. Билай В.И. Основы общей микологии. - К.: Вища школа, 1980. - 360с.

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

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

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

5. Патент 64129 А України. Штам соматичних

структур їстівного базидіоміцета *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. F-vv - продуцента плодових тіл і міцелію з антиокисними властивостями / Федотов О.В., Горяшник Ю.В. Заявка №2003020945, від 04.02.2003, кл. 7C12N1/14, A01G1/04, Бюл. №2, від 16.02.04.

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

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. Eriksson K.-E., Blanchette R.A., Ander P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1990.

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