



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14943 (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 P-01
БАЗИДІОМІЦЕТУ PLEUROTUS OSTREATUS (JACQ.: FR.) KUMM.

1	2
(21) u200508674	ізолейцин 3,66 та 3,41
(22) 12.09.2005	пролін 3,31 та 3,94
(24) 15.06.2006	фенілаланін 9,20 та 9,73
(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.	метіонін 1,62 та 1,87
(72) Федотов Олег Валерійович	гліцин 3,93 та 2,79
(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ	серин 4,09 та 3,28
(57) Амінокислотний склад ферментних препаратів	треонін 3,44 та 3,65
пероксидаз штаму P-01 базидіоміцету Pleurotus	цистеїн 1,07 та 0,29
ostreatus (Jacq.: Fr.) Kumm., які містять фермент,	тирозин 8,76 та 9,09
який відрізняється тим, що як ферментом є	аспарагінова кислота
пероксидази позаклітинного та	(аспарагін) 15,56 та 15,38
внутрішньоклітинного походження і містять,	глутамінова кислота
відповідно, мг %:	(глутамін) 13,11 та 12,40
аланін 3,21 та 2,67	лізин 8,12 та 9,73
валін 3,78 та 3,93	аргінін 4,78 та 5,98
лейцин 9,32 та 8,51	гістидин 3,04 та 3,35.

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

Фізіологічно активні речовини грибного походження представлені різноманітними за хімічною природою сполуками первинного і вторинного метаболізму, які в низьких концентраціях виконують з високим ступенем активності і специфічності каталітичні, біотичні, абіотичні і інші функції в життєдіяльності цих організмів [1]. Базидіоміцети здатні до біосинтезу всіх класів ферментів. Така ферментативна озброєність пов'язана з великим різноманіттям природних умов життєдіяльності базидіальних грибів та відображає універсальність їх життєвої системи, здатної до адаптації, атаки і реалізації субстратів. Вивчення структури та функцій біологічно активних речовин грибів, що беруть участь у метаболічних перетвореннях представляє науковий і практичний інтерес [3, 6, 8].

Глива звичайна Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) Kumm. відноситься до екологічної групи грибів деструкторів деревини - ксилотрофів. Встановлено, що за вмістом активних речовин

протиопухлинної дії Pleurotus ostreatus стоїть на третьому місці після сїтакє Lentinus edodes (Berk.) Sing. й опенька літнього Kuehneromyces mutabilis (Schff. ex Fr.) Sing. et A.H. Sm., має антивірусну, антифунгальну, радіопротекторну та імуномодулюючу лікарську дію, містить антиоксиданти, покращує роботу м'язів [2, 5, 9]. Швидко розвивається штучне вирощування їстівних грибів, отже глива звичайна представляє інтерес як для грибовництва, так і для фармакологічної і харчової промисловостей.

Пероксидази (КФ 1.11.1.7.) каталізують окиснення різних поліфенолів, амінів, а також жирних кислот, цитохрому, глутатіону. Ферменти розкладають H_2O_2 зі звільненням активного атомарного кисню, який бере участь в окисненні. 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 [4, 5]. Виділені в чистому виді ферменти при визначених умовах каталізують різноманітні перетворення, які мають велике значення в різних галузях практичної діяльності.

(19) UA (11) 14943 (13) U

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*, *Rychnoporus 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 [3].

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 Р-01 базидіоміцету *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm., 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 Р-01 базидіоміцету *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm., які містять фермент, згідно корисної моделі в якості ферменту є пероксидази позаклітинного та внутрішньоклітинного походження і містять в собі, відповідно мг %:

аланін	3,21 та 2,67;
валін	3,78 та 3,93 ;
лейцин	9,32 та 8,51;
ізолейцин	3,66 та 3,41;
оксипролін	0,00 та 0,00;

пролін	3,31 та 3,94;
фенілаланін	9,20 та 9,73;
метіонін	1,62 та 1,87;
гліцин	3,93 та 2,79;
серин	4,09 та 3,28;
треонін	3,44 та 3,65;
цистеїн	1,07 та 0,29;
тирозин	8,76 та 9,09;
аспарагінова кислота (аспарагін)	15,56 та 15,38;
глутамінова кислота (глутамін)	13,11 та 12,40;
лізин	8,12 та 9,73;
аргінін	4,78 та 5,98;
гістидин	3,04 та 3,35.

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 гливи звичайної *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. Р-01 виділено за методом виділення чистих культур базидіоміцетів [4] з природної популяції, з плодівих тіл, які росли на пні тополі канадської (*Populus deltoides* Marsh.) у екологічно небезпечному районі м. Донецька [5]. Культивування штаму Р-01 базидіоміцету *Pleurotus ostreatus* 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 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 Р-01 *Pleurotus ostreatus* 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 Н₂О₂ 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. Фракціонування пероксидаз проводять сульфатом амонію. Використовують цей метод завдяки великій розчинності у воді та стабілізуючій дії на білкову молекулу $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [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 товчачика, 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. Осадження білків по фракціям з гомогенату міцелію та культурального фільтрату здійснюють при $5 \pm 1^\circ\text{C}$ шляхом поступового збільшення концентрації сульфату амонію у культуральному фільтраті до 40-60% насичення чи супернатанті - до 40-70%. 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 містився 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 Р-01 дорівнює $X_{\text{кф}} = 1,70 \cdot 10^{-2}$ од/г; активність ФП міцеліальних пероксидаз дорівнює $X_{\text{мг}} = 1,61 \cdot 10^{-2}$ од/г.

Приклад конкретного виконання 3. Амінокислотний склад ФП пероксидаз штаму Р-01 базидіоміцету *Pleurotus ostreatus* визначають за допомогою амінокислотного аналізатора, наприклад моделі ААА-881, після кислотного гідролізу білків. Дані аналізу надано у таблиці, де амінокислоти розташовані залежно від природи радикалів (амфотерності) білкових молекул. Таблиця, також, містить дані про вміст білка в ФП. Дані подаються без зазначення похибки, оскільки представляють точні результати амінокислотного аналізу одного зразка ферментного препарату, отриманого з культурального фільтрату і одного - з міцелію штаму Р-01.

Таблиця

Вміст білку і амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз штаму Р-01 базидіоміцету *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm.

№ з/п	Амінокислота	Вміст амінокислот, мг %	
		ФП _{кф}	ФП _{мг}
1.	Ала	3,21	2,67
2.	Вал	3,78	3,93
3.	Лей	9,32	8,51
4.	Іле	3,66	3,41
5.	О-про	0,00	0,00
6.	Про	3,31	3,94
7.	Фен	9,20	9,73
8.	Мет	1,62	1,87
9.	Глі	3,93	2,79
10.	Сер	4,09	3,28
11.	Тре	3,44	3,65
12.	Цис	1,07	0,29
13.	Тир	8,76	9,09
14.	Асп	15,56	15,38
15.	Глу	13,11	12,40
16.	Ліз	8,12	9,73
17.	Арг	4,78	5,98
18.	Гіс	3,04	3,35
% білка в ФП		37,8145	42,4115

Отже, на відміну від результатів аналізу амінокислотного складу ФП прототипу у складі білків пероксидаз штаму Р-01 гливи звичайної не виявлено оксипролін (О-про) з групи неполярних, гідрофобних амінокислот. Вміст в препаратах 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 5,38; 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. Вміст білку в міцеліальному препараті незначно вищий за такий у ФП, отриманого з культурального фільтрату.

Таким чином, отримані грибні ферментні препарати пероксидаз ендо- і екзогенного походження штаму Р-01 базидіоміцету *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm., 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 Р-01 базидіоміцету *P. ostreatus* відкривають перспективи їх використання у харчовій і фармацевтичній промисловостях.

Джерела інформації:

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

2. Бухало А. С., Соломко Е.Ф., Митропольська 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 46461А України. Штам соматичних структур їстівного базидіоміцета *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. Р-01 - продуцента плодових тіл і міцелію з антиокисними властивостями / Федотов О.В., Вовк Н.В. Заявка №2001075193, від 20.07.01, кл. 7 С12N 1/14, А01G 1/04, Бюл. №5, від 15.05.02.

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.