

Dozavka

МКВ С 12 N9/52

**ШТАМ СОМАТИЧНИХ СТРУКТУР МАКРОМІЩЕТУ *IRPEXLACTEUS* Fr.
С-11 - ПРОДУЦЕНТ ТРОМБОЛІТИЧНОГО ФЕРМЕНТУ.**

Винахід належить до ферментативно] галузі мікробіологічної промисловості та стосується отримання нового штаму соматичних структур макроміщету (вищого базидіального гриба) *I zrex lade us* Fr. - продуцента тромболітичного ферменту (ТФ), який може бути використаний у медицині як тромболітичний препарат.

Відомий штам 5 *Aspergillus terricola* [1] - продуцент ТФ, який належить до недосконалих грибів та характеризується рясним спороутворенням у культурі, що може викликати різного роду професійні захворювання при його промисловому культивуванні. Склад середовища не наведено, не показана динаміка зміни тромболітичної активності (ТА) при культивуванні продуцента.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатом, який досягається» є гриб *Trichotecium roseum* [2], рівень активності культуральної рідини якого складає 2664 питомих одиниць на міліграм. Результати, що їх представлено, досягаються при використанні середовища, склад якого не наведено, не показана динаміка зміни тромболітичної активності (ТА) при культивуванні продуцента та зазначено» що повний лізис експериментальних тромбів відбувається у 80% випадків.

Розвиток біотехнології ферментів пов'язаний з подальшим пошуком нових штамів - продуцентів, які б мали високі виробничі властивості [3],

В основу винаходу поставлена задача отримання нового штаму соматичних структур афілофорального макроміщету */. lacteus*, який здатний до активного біосинтезу екзоферменту тромболітичної дії.

Поставлена задача вирішується тим, що інтродукований штам С-11І. *lacteus* показує високу ТА в культурі на живильних середовищах, які містять доступні та дешеві компоненти (мінеральні солі, пептон, вода),

Штам, що його пропонують, зберігається в колекції чистих культур кафедри фізіології рослин Донецького держуніверситету та депонований у спеціалізовану колекцію культур інституту ботаніки ін. Н.Г. Холодного НАН України, колекційний номер 1631.

Отриманий штам С-117. *lacteus* має наступні характеристики.

Культурально-морфологічні ознаки.

Штам досліджували на сусло-агарі, глюкозо-картопляному агарі та агарі Чапека-Докса

На сусло-агарі колонія ватоподібна, міцелій повітряний та стелиться по поверхні. Колір колонії білий, субстрат не забарвлює. На глюкозо-картопляному середовищі колонія має вигляд як і на сусло-агарі. На агаризованому середовищі Чапека-Докса колонія представлена головним чином зануреним міцелієм. Швидкість росту міцелію на сусло-агарі при температурі $30 \pm 1^\circ\text{C}$ складає $13,17 \pm 0,75$ мм за добу, на глюкозо-картопляному агарі- $13,34 \pm 0,56$ мм за добу, на агаризованому середовищі Чапека-Докса - $9,67 \pm 1,48$ мм за добу. Плодоношення на середовищах культивування, що їх було застосовано, не спостерігали. Мікроскопічні дослідження показують, що міцелій складається з гіллястих гіф, що тісно переплітаються, з перегородками. Пряжки не виявлені.

Ріст міцелію можливий в інтервалі температур $2-50^\circ\text{C}$. Температурний оптимум росту грибу знаходиться у межах $25-37^\circ\text{C}$, біосинтетичний - $25-32^\circ\text{C}$. При 45°C ріст грибу різко знижується до $0,25 \pm 0,04$ мм за добу, а при 50°C ріст припиняється.

На рідких глюкозо-пептоновому та сусло-пептоновому середовищах утворює у рівному ступені поверхневий та занурений міцелій. Повітряних гіф мало. Культуральний фільтрат (КФ) не забарвлює.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

При відборі джерел вуглецевого та азотного живлення критерієм придатності було значення ТА КФ» скорочення термшу росту грибу та отримання ферменту.

Утилізація кислот, ноно-, ді-» полішукрів та спиртів відбувається з різною швидкістю. Найбільше накопичення біомаси спостерігається на крохмалі» дуже слабке - на аспарагіновій кислоті.

Штам С-11 /. *lacteus*, зростаючи на рідкому живильному середовищі з зазначеними джерелами вуглецю, виявляє різну тромболітичну та біосинтетичну активність у культурі. Максимальні значення ТА спостерігаються при вирощуванні гриба у 250 мл колбах на 50 мл живильного середовища з глюкозою при віці культури 10 діб. Вивчення придатності неорганічного (амонійного та нітратного) та органічного азоту (ферментативний пептон, сечовина, амінокислоти) показало, що лише на середовищах з пептоном відбувається активне ферментотворення тависоке накопичення біомаси.

Приклад І.

Штам С-11 /. *lacteus* отриманий методом первинного відбору. Плодові тіла зібрані з засохлої деревини дубу (*Quercus robur*). Чисту культуру штаму підтримують шляхом пересівів через 3-5 місяців на агаризованоиу пивному суслі» чи інших агаризованих живильних середовищах.

Для виявлення ТА штам С-11 /. *lacteus* культивують на рідкому глюкозо-пептоновому середовищі, яке містить (г/л): глюкозу - 10; пептон - 3; СаСЬ - 0,05; КН₂РО₄ - 0,6; К₃НРО₄ - 0,4; MgSO₄-7H₂O - 0,5; ZnSO₄-7H₂O - 0,001; дистильовану воду - до 1 літру. Кислотність середовища після стерилізації - 4-5 рН. Культуру вирощують у колбах на 250 мл, об'єм середовища - 50 мл, поверхневим способом при температурі 32°±1°С. Посівним матеріалом служить 7-Ю добова культура грибу з агаризованих середовищ.

ТА КФ визначають на 5,10,15, 20, 25 та 30 добу культивування.

Тромболітичну активність культурального фільтрату визначають за методом, запропонованим Імшенецьким та Броцькою [4].

Метод оснований на урахуванні часу лізису штучних тромбів донорської крові.

У пробірки Відаля вносять 0,4 мл розчину тромбіну, розведеного фізіологічним розчином таким чином, щоб у 1 мл містилося 25 одиниць, та 0,1 мл донорської крові. До тромбу, що утворився, додають 2 мл культурального фільтрату. У контрольні пробірки додають 2 мл прокип'яченого КФ. Крім того, для контролю над спонтанним лізисом тромбів готують пробірку, яка містить тільки тромбін і донорську кров. Після внесення розчинів кожен пробірку обережно струшують та поміщають у термостат при 37°C. Розрахунок ТА в умовні одиниці проводять за прописом Псурцевої та Деннсової [5]:

$$TA = \frac{24 - t}{t} \times 50, \text{ де } t - \text{час повного лізису тромбу (годин).}$$

Результати представлені у таблиці 1:

Таблиця 1.

Вік культури, діб	5	10	15	20	25	30
ТА, умовних одиниць	52	68	54	66	10	0

Отримані результати свідчать про те, що штам С-11 *I. lacteus* синтезує у середовищі фермент тромболітичної дії. Його кількість поступово збільшується і вже на 10-у добу культивування у 250 мл колбах з 50 мл живильного середовища складає 68 у.о.

Таким чином, штам С-11 *I. lacteus* є активним продуцентом протеїназ тромболітичної дії та у порівнянні з прототипами (штамом 5 *A. terricola* та грибом *T. roseum*) не утворює спорової маси, яка може при промисловому культивуванні викликати професійне захворювання.

Джерела інформації, що були використані при складанні заявки.

1. А. с. 464617 СССР, М. Кл. С 12 d 13/10. Штамм 5 *Aspergillus terricola* - продуцент протеолитического фермента, обладающего фибринолитическим и тромболитическим действием / А.А. Иншенецкий, С.З. Броцкая, В.В. Коршунов. - Оpubл. 23.01.75, Бюл. № 11.
2. А. с. SU 1421348 А 1, М. Кл.⁴ А 61 К 37/48, С 12 N 9/58. Способ получения тромболитического фермента из гриба *Trichotecium roseum* штамп D / Н.С. Мурашов, ИВ. Иванова, М.А. Козлова, А.В. Сиротенко, Р.А. Максимова, Г.В. Андреевко, Е.В. Макарова, В.И. Данилина. - Оpubл. 07.09.1988, Бюл. № 33 (прототип).
3. Белки, ферменты и стерны базиднальных грибов / Под ред. О.П. Низковской Л; Наука, 1979. 72 с.
4. Имшенецкий А.А., Броцкая С.З. Селекция микроорганизмов, обладающих тромболитической активностью //Микробиология. - 1969. - Т. 38. - № 6. - С. 1403-1409.
5. Псурцев а Н.В., Денисова Н.П. Тромболитическая активность культур *Flammulina velutipes* (Fr.) Karst. //Микология и фитопатология. - 1982. - Т. 16. -» б. - С. 518-521. -----