



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **39760** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
**C12N 9/52**  
**A23C 19/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ШТАМУ P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. - ПРОДУЦЕНТА КАТАЛАЗИ

1

(21) u200812035  
(22) 10.10.2008  
(24) 10.03.2009  
(46) 10.03.2009, Бюл.№ 5, 2009 р.  
(72) ФЕДОТОВ ОЛЕГ ВАЛЕРІЙОВИЧ, UA, БРУС-  
НИЦИНА ОЛЬГА МИХАЙЛІВНА, UA  
(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИ-  
ТЕТ, UA  
(57) Живильне середовище для вирощування  
штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. -  
продуцента каталази, що містить глюкозу, пептон,  
калій фосфорнокислий однозаміщений, калій фо-  
сфорнокислий двозаміщений, магній сірчанокис-

2

лий, кальцій хлористий, цинк сірчанокисний і воду,  
яке **відрізняється** тим, що додатково містить ліг-  
носульфонат при наступному співвідношенні ком-  
понентів, г/л:

глюкоза	12
пептон	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,5
CaCl <sub>2</sub>	0,05
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,001
дистильована вода	до 1 літра.

Корисна модель відноситься до біотехнології і може бути використана у науково-дослідних і промислових мікологічних лабораторіях для одержання ферменту каталази на основі культивування штамів-продуцентів.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) використовується для детоксикації H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у харчовій, текстильній, шкіряній, електронній промисловості, у медицині в якості діагностичного засобу [5].

Оптимізація умов штучного культивування та вивчення фізіологічно активних речовин базидіоміцетів - перспективних об'єктів біотехнології є одним з важливих напрямків розвитку сучасної мікології [1, 4].

Відоме живильне середовище для виділення і пересівів чистих культур вищих базидіоміцетів - продуцентів фізіологічно активних речовин, що містить агар-агар, воду і відвар зерна ячменю від 500 до 250 мл, який отримують як побічний продукт при приготуванні зернового міцелію і містить цукристих речовин на рівні 3,6-3,8° за Баллінгом і водорозчинних білкових речовин - 48,0-62,0 мг/мл. Не надаються данні про можливості використання цього живильного середовища для культивування штамів-продуцентів біологічно активних речовин [6].

Відоме живильне середовище для діагностики кератолітичних мікроскопічних грибів, створене на основі існуючого середовища Григоракі, яке відріз-

няється тим, що воно додатково містить подрібнений копитний ріг і не містить молока та цукру у наступному співвідношенні компонентів, мас %: копитний ріг - 5,0; пептон - 5,0; агар - 18,0; дистильована вода - до 1000,0. Не надаються данні про можливості використання цього живильного середовища для культивування штамів базидіоміцетів - продуцентів біологічно активних речовин [3].

Найбільш близьким за технічною суттю і досяжності результату є живильне середовище для вирощування штамів M-81 *Hirschioporus laricinus* - продуцента молокозсідального ферменту, яке включає глюкозу, пептон, калій фосфорнокислий однозаміщений, калій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчанокисний, кальцій хлористий, воду і цинк сірчанокисний, яке відрізняється тим, що додатково містить натрій хлористий при наступному співвідношенні компонентів г/л: глюкоза - 18-20, пептон - 8-10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,6; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,4; MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - 0,9-1,1; CaCl<sub>2</sub> - 0,11-0,13; NaCl - 0,18-0,20; ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - 0,001; дистильована вода - до 1 л. Не надаються данні про можливості використання цього живильного середовища для культивування штамів базидіоміцетів - продуцентів каталази [4].

В основу корисної моделі поставлено завдання удосконалення глюкозо-пептонного живильного середовища для вирощування штамів P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. - продуцента ката-

(13) **U**(11) **39760**(19) **UA**

лази, в якому шляхом оптимізації концентрації компонентів та введення додаткової хімічної сполуки досягають значного підвищення активності ферменту каталази, яка може бути використана у харчовій, текстильній, шкіряній, електронній промисловості, у медицині в якості діагностичного засобу.

Поставлене завдання вирішується тим, що живильне середовище для вирощування штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. - продуцента каталази, яке включає глюкозу, пептон, калій фосфорнокислий однозаміщений, калій фосфорнокислий двоаміщений, магній сірчанокислий, кальцій хлористий, цинк сірчанокислий і воду, відповідно корисної моделі додатково містить лігносульфонат у такому співвідношенні компонентів, г/л: глюкоза - 12; пептон - 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,8;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5;  $\text{CaCl}_2$  - 0,05;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001; лігносульфонат - 8-10; дистильована вода - до 1 літра.

Приклад конкретного виконання 1. Динаміка росту і каталазної активності штаму P-6v *Pleurotus ostreatus*.

Готують вихідне живильне середовище наступного складу, г/л:

глюкоза	10
пептон	3
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,6
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{CaCl}_2$	0,05
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001
дистильована вода	до 1 літра [4]

Живильне середовище розливають по 50 мл в конічні колби Ерленмейєра на 250 мл, стерилізують в автоклаві при  $121 \pm 2$  °C протягом 40 хвилин.

Кислотність середовища після стерилізації становить 6,0-6,5 pH.

Середовище, після охолодження, інокують шматочком міцелію розміром 5X5 мм. Інокулюмом є чиста культура штаму P-6v, яка росла 7-10 діб на агаризованому суслі (4° за Баллінгом) або на картопляно-глюкозному агарі (КГА) [1].

Штам P-6v культивують протягом 20 днів при температурі 27,5°C.

Каталазну активність (КА) міцеліального гомогенату (МГ) та ростові показники: pH культурального фільтрату (КФ) і накопичення біомаси фіксують на 5, 10, 15 і 20-ту добу культивування.

Для визначення активності каталази в міцелії штаму P-6v використовують спектрофотометричний метод, принцип якого заснований на здатності перекису водню утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення розчинів вимірюють на спектрофотометрі, наприклад СФ-26, при довжині хвилі 410 нм проти нульової проби з дистильованою водою. Активність каталази визначають за формулою [5]:

$$E = (A_k - A_d) \cdot V \cdot t \cdot k \cdot p,$$

де  $A_k$  та  $A_d$  - екстинкція контрольної та дослідної проб,  $V$  - об'єм проби (0,1 мл),  $t$  - час інкубації (600 секунд),  $k$  - коефіцієнт мілімолярної екстинкції перекису водню ( $22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $p$  - коефіцієнт розведення.

pH розчинів вимірюють потенціометричним методом на pH-метрі. Накопичення біомаси встановлюють зважуванням повітряносухого міцелію (звільненого від культурального фільтрату і висушеного при 105 °C) та перерахунком його ваги на один літр живильного середовища.

Результати динаміки росту і каталазної активності представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Динаміка росту і каталазної активності штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm.

Вік культури, доба	Біомаса, г/л	pH КФ	Каталазна активність МГ, мкат/л $10^3$
5	0,152±0,149	6,10	429,983±3,875
10	2,068±0,207	6,35	416,240±5,451
15	2,977±0,208	6,09	446,220±8,026
20	3,206±0,280	6,19	269,797±4,039

Дані дослідів (табл. 1) свідчать про наступне. Протягом терміну культивування спостерігається постійний ріст штаму P-6v. Значення pH КФ має два максимуми на 10 та 20-ту добу росту. Каталазна активність міцелію має вірогідний максимум на 15-ту добу культивування.

Приклад конкретного виконання 2. Оптимізація складу живильного середовища для росту штаму P-6v *Pleurotus ostreatus*.

Удосконалення вихідного середовища, згідно поставленої задачі, проводять за методом повного факторного експерименту ( $\text{ПФЕ-}2^4$ ) [2]. Варіювання (X) вмісту у живильних середовищах глюкози і пептону - факторів  $x_1$ ,  $x_2$  складає 2 г/л, а сірчанокислого магнію і хлористого кальцію - факторів  $x_3$  і  $x_4$  - 0,2 г/л, інші компоненти мають постійну концентрацію (таблиця 2).

Таблиця 2

Склад живильних середовищ для оптимізації росту і біосинтезу каталази штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm

№ живильного середовища	Фактори				
	$x_1$ (глюкоза)	$x_2$ (пептон)	$x_3$ ( $\text{KH}_2\text{PO}$ )	$x_4$ ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Взаємодія факторів
	Вміст у живильному середовищі, г/л				
1	8	1	0,4	0,2	1
2	12	1	0,4	0,2	$x_1$
3	8	5	0,4	0,2	$x_2$
4	12	5	0,4	0,2	$x_1 x_2$
5	8	1	0,8	0,2	$x_3$
6	12	1	0,8	0,2	$x_1 x_3$
7	8	5	0,8	0,2	$x_2 x_3$
8	12	5	0,8	0,2	$x_1 x_2 x_3$
9	8	1	0,4	0,6	$x_4$
10	12	1	0,4	0,6	$x_1 x_4$
11	8	5	0,4	0,6	$x_2 x_4$
12	12	5	0,4	0,6	$x_1 x_2 x_4$
13	8	1	0,8	0,6	$x_3 x_4$
14	12	1	0,8	0,6	$x_1 x_3 x_4$
15	8	5	0,8	0,6	$x_2 x_3 x_4$
16	12	5	0,8	0,6	$x_1 x_2 x_3 x_4$
17	10	3	0,6	0,4	0

Всі операції по приготуванню живильних середовищ; культивуванню штаму P-6v проводять за прикладом конкретного виконання 1. Штам P-6v культивують упродовж 15 діб при температурі 27,5

°C. Визначення накопичення біомаси штамом P-6v проводять за прикладом конкретного виконання 1.

Вплив складу живильного середовища на ріст штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* представлено в таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив складу живильного середовища на ріст штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm

№ живильного середовища	Взаємодія факторів	Біомаса, г/л
1	1	2,275±1,246
2	$x_1$	2,859±0,801
3	$x_2$	5,358±0,849
4	$x_1 x_2$	4,573±0,381
5	$x_3$	2,428±0,688
6	$x_1 x_3$	2,767±0,621
7	$x_2 x_3$	5,111±0,675
8	$x_1 x_2 x_3$	5,035±1,018
9	$x_4$	3,184±0,824
10	$x_1 x_4$	3,501±0,599
11	$x_2 x_4$	4,835±0,539
12	$x_1 x_2 x_4$	5,773±0,720
13	$x_3 x_4$	2,235±0,862
14	$x_1 x_3 x_4$	2,850±0,655
15	$x_2 x_3 x_4$	4,582±0,800
16	$x_1 x_2 x_3 x_4$	3,798±0,953
17	0	2,977±0,208

Дані дослідів (табл. 3.) свідчать про наступне. Найбільше накопичення біомаси спостерігалося при 15-ти добовому культивуванні штаму P-6v на живильному середовищі № 12, а також на середовищах № 3, 7, 8 в порядку убутання. Середовище

№ 12 мало максимальний вміст глюкози, пептону і  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Для культур штаму P-6v, що росли на середовищі № 13, де вміст глюкози і пептону були мінімальними, а вміст  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  і  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - максима-

льним зареєстровано мінімальне накопичення біомаси.

Отже, живильне середовище наступного складу, г/л: глюкоза - 12; пептон - 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,4;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,6;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5;  $\text{CaCl}_2$  - 0,05;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001; дистильована вода до 1 літра є найбільш придатним для росту штаму P-6v.

Приклад конкретного виконання 3. Оптимізація складу живильного середовища з метою підвищення каталазної активності штаму P-6v *Pleurotus ostreatus*.

Готують живильні середовища для вивчення впливу  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  і  $x_4$  факторів - компонентів живильного середовища на каталазну активність штаму P-6v відповідно до матриці ПФЕ-2<sup>4</sup> за прикладом конкретного виконання 2.

Штам P-6v культивують упродовж 15 діб при температурі 27,5 °C.

Визначення активності каталази в міцелії штаму P-6v проводять за прикладом конкретного виконання 1.

Дані досліду (табл. 4.) свідчать про наступне. Найбільша КА зафіксована при культивуванні штаму P-6v на живильному середовищі № 6, а також на середовищах № 9, 5, 14 в порядку убывання.

Середовище № 6 мало максимальний вміст глюкози і  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Отже, при культивуванні штаму P-6v на живильному середовищі наступного складу, г/л: глюкоза - 12; пептон - 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,8;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,2;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5;  $\text{CaCl}_2$  - 0,05;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001; дистильована вода - до 1 літра, зареєстрована найвища активність міцеліальної каталази.

Таблиця 4

Вплив складу живильного середовища на каталазну активність міцелію штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm

№ живильного середовища	Взаємодія факторів	Каталазна активність мг, м кат/л $10^3$
1	1	326,340±14,652
2	$x_1$	470,197±33,618
3	$x_2$	339,660±19,980
4	$x_1, x_2$	481,740±68,028
5	$x_3$	497,283±15,553
6	$x_1, x_3$	530,580±69,320
7	$x_2, x_3$	270,840±10,766
8	$x_1, x_2, x_3$	333,003±13,321
9	$x_4$	508,380±55,854
10	$x_1, x_4$	468,420±76,614
11	$x_2, x_4$	483,960±12,376
12	$x_1, x_2, x_4$	390,720±10,766
13	$x_3, x_4$	472,860±66,600
14	$x_1, x_3, x_4$	486,180±64,227
15	$x_2, x_3, x_4$	344,100±90,912
16	$x_1, x_2, x_3, x_4$	222,000±14,611
17	0	446,220±8,026

Приклад конкретного виконання 4. Вплив лігносульфоната на ріст та каталазну активність штаму P-6v *Pleurotus ostreatus*.

Внесення лігносульфонату здійснювали у оптимізоване за прикладом конкретного виконання 3 глюкозо-пептонне живильне середовище у концентраціях 0,1; 0,4; 0,7; 1,0; 1,3 та 1,6 %.

Всі операції щодо приготування живильних середовищ, їх інокуляція, визначення ростових

показників та активності каталази в міцелії штаму P-6v виконують за прикладом конкретного виконання 1. Штам P-6v культивують упродовж 15 діб при температурі 27,5 °C.

Вплив лігносульфонату на ріст та каталазну активність міцелію штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* представлено в таблиці 5.

Таблиця 5

Вплив лігносульфонату наріст та каталазну активність міцелію штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm

Концентрація лігносульфонату, %	Біомаса, г/л	Каталазна активність мг, м кат/л 10 <sup>3</sup>
0,1	3,025±0,098	390,000±12,02
0,4	5,601±0,011	428,675±10,09
0,7	8,781±0,052	850,291±6,83
1,0	9,065±0,310	869,065±7,81
1,3	6,705±0,281	500,340±14,00
1,6	6,054±0,118	387,670±4,92

Таким чином оптимізоване глюкозо-пептонне живильне середовище, яке містить у своєму складі лігносульфонат в концентрації 0,7-1,0 % є оптимальним для синтезу штамом P-6v міцеліальної каталази. Оптимізація живильного середовища для росту і каталазної активності штаму P-6v дозволяє вести його вирощування, направлене на отримання міцеліальної біомаси чи ферменту каталази, що спрощує і здешевлює їх виробництво.

Джерела інформації, які використані при складанні заявки:

1. Бухало А.С. Высшие базидиомицеты в чистой культуре. -К.: Наук. думка, - 1988. - 144с.

2. Максимов В.Н., Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н. Оптимизация состава питательной среды методом математического планирования эксперимента/ Практикум по микробиологии. Изд-во Москов. ун-та. 1976. - С.153-163.

3. Патент 19340 У України. Середовище для діагностики кератолітичних мікроскопічних грибів//

Іздепський В.Й., Кулинич С.М., Глуценко С.Г. Заявка №u200606280 від 05.06.2006, кл. C12N 1/20, C12Q 1/4, Бюл. № 12, від 15.12.2006.

4. Патент 22915 А України. Живильне середовище для вирощування штаму M-81 *Hirschioporus laricinus* - продуцента молокозгортаючого ферменту / Бойко М.І., Негруцький С.Ф., Федотов О.В., Борисенко О.О. Заявка № 96031179 від 27.03.1996, кл. C12N1/38, Бюл. № 3, від 30.06.1998. (прототип).

5. Патент 39243 А України. Спосіб визначення каталазної активності базидіомицетів / Федотов О.В., Гавриленко Г.В. Заявка № 2000116560, від 21.11.00, кл. 7C12N9/58, Бюл. № 5, від 15.06.2001.

6. Патент 63177 А України. Живильне середовище для виділення і пересівання чистих культур вищих базидіомицетів / Федотов О.В., Бугрім Є.Ю., Крюков О.А. Заявка № 2003021394, від 17.02.2003, кл. 7C12N9/54, A23C19/032, Бюл. № 1, від 15.01.2004.