



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80795** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 9/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 14824	(72) Винахідник(и): Древаль Костянтин Григорович (UA), Бойко Михайло Іванович (UA)
(22) Дата подання заявки: 24.12.2012	(73) Власник(и): ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.06.2013	вул. Університетська, 24, м. Донецьк, 83055 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2013, Бюл.№ 11	

**(54) ШТАМ DAEDALEOPSIS CONFRAGOSA F. CONFRAGOSA (BOLTON) J. SCHROT ANSC-1 -
ПРОДУЦЕНТ ЕНЗИМІВ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ**

(57) Реферат:

Штам *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt AnSc-1 - продуцент ензимів целюлозолітичного комплексу.

UA 80795 U

Корисна модель належить до біотехнології, мікробіологічної промисловості та мікології і може бути використана у процесах виробництва ензимів або деструкції відходів різних галузей сільського господарства і промисловості, що містять целюлозу.

Целюлозовмісні речовини відіграють дуже важливу роль у природі як складові частини деревини, паперу, одягу, пластику тощо. Нещодавно було відкрито можливість використання цих речовин як перспективного джерела енергії, хімічного та мікробного протеїну. Основною перевагою такого джерела є велика його частка у органічній біомасі планети, яка до того ж постійно поповнюється [17]. Лігноцелюозна біомаса дуже цікава як дешеве відтворювальне джерело сировини для отримання різноманітних продуктів та палива [9, 11].

Целюлозовмісна біомаса реутилізується великою кількістю різноманітних мікроорганізмів з різних екологічних груп [3, 18]. Зі всього різноманіття організмів, що існують у сучасній біосфері, лише гриби мають необхідні ферментні системи, що дозволяють їм здійснювати повну біохімічну конверсію сполук деревини [5, 7].

Біологічні технології забезпечують спрямоване отримання корисних продуктів для різноманітних напрямків людської діяльності [1]. Ферментативне перетворення целюлози як одного з найпоширеніших природних полімерів перспективне не тільки з точки зору створення самостійних маловідходних технологій, але й з позиції зниження екологічної небезпеки різноманітних підприємств, що переробляють рослинну сировину та утворюють велику кількість відходів. Сировинні ресурси для ферментативного отримання вуглеводів з целюлози дуже великі та постійно поповнюються [6, 10].

Велика роль дереворуйнівних грибів у розкладанні лігніноцелюлоз деревини у наш час не викликає сумніву [1, 4]. У багатьох країнах ведеться активний пошук ефективних продуцентів целюлаз, проводяться роботи із вдосконалення існуючих штамів мікроорганізмів з метою збільшення секреції різноманітних целюлаз та зниження вартості їх виробництва [11, 12]. Однак можливості різних видів використовувати лігнін або целюлозу неоднакові. У зв'язку з цим необхідно вивчити велику кількість культур грибів з пошуку перспективних штамів - продуцентів ензимів [4, 13].

Серед нині відомих та детально досліджених продуцентів ензимів целюлозолітичної дії є представники родів *Trichoderma*, *Penicillium* та ін. [14, 16, 17, 18, 19], однак такі організми незручні у роботі через свою властивість спороносити у культурі, що може призводити до забруднення оточуючого середовища, а також викликати алергічні реакції у людей.

Отже, існує необхідність пошуку штамів саме серед дереворуйнівних базидіоміцетів, які мають здатність до активного синтезу целюлозолітичних ензимів та водночас не спричиняють забруднення оточуючого середовища [12].

Найбільш близький за технічною суттю і досяжності результату є штам *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et. Cain, 258, що синтезує ензими целюлозолітичного комплексу [8]. Однак вказаний штам має ряд недоліків, а саме: порівняно низькі значення активності окремих компонентів целюлозолітичного комплексу, висока температура культивування, що вимагає додаткових витрат сировини. Крім того, для вказаного штаму не досліджено супутніх ензиматичних активностей, що є значним недоліком, оскільки природні сполуки, які містять целюлозу, найчастіше пов'язані з цілою низкою інших сполук - лігніном, пектином тощо - які ускладнюють утилізацію та переробку целюлозовмісних матеріалів.

В основу корисної моделі поставлена задача отримання нового штаму гриба - продуцента целюлозолітичних ензимів з високою активністю компонентів целюлазного комплексу та низкою супутніх активностей.

Поставлена задача вирішується тим, що як продуцент целюлозолітичного комплексу ензимів з супутніми дереворуйнівними активностями використовується штам *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt AnSc-1.

Штам грибу *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt AnSc-1 виділено за загальноприйнятими методиками з дикорослих плодівих тіл, що зібрані на ушкодженому пні невизначеного виду листяної породи дерева у м. Донецьку у 2010 р. Штам зберігається у колекції культур кафедри фізіології рослин Донецького національного університету під назвою AnSc-1. Чисту культуру штаму AnSc-1 підтримують за температури 4±1 °C на агаризованому картопляно-глюкозному середовищі шляхом пересівів кожні 5-6 місяців.

Штам AnSc-1 характеризується культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними ознаками.

Культурально-морфологічні ознаки.

Штам AnSc-1 атоксичний, мезофільний, швидко росте. На агаризованому середовищі міцелій розповсюджується рівномірно. Субстратні і повітряні гіфи розвиваються одночасно. Краще розвинуті субстратні гіфи. Колонія гриба має округлу форму, незначно щільна в центрі.

Колір молодшої колонії сніжно-білий, з віком, на 7-10 добу, починаючи з центра колонії, забарвлюється до світло-жовтого кольору. Субстрат не забарвлює. Текстура міцелію вовняна.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

Аероб. Ростає за температури 24-34 °С, оптимум для синтезу целюлаз - 32 °С. Оптимум pH для накопичення біомаси на рідкому глюкозо-пептонному середовищі 6,0-6,2 од, а для продукції целюлозолітичних ензимів - 7 од. За біосинтетичними показниками найкращими джерелами вуглецевого живлення є глюкоза, сахароза, лактоза, мікрокристалічна целюлоза, фільтрувальний папір. Відношення до джерел азоту: для росту використовує пептон, амонійний та нітратний азот.

Культивування штаму *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt AnSc-1 проводять у аеробних умовах у поверхневій або глибинній культурі на живильному середовищі, що містить один субстрат - джерело вуглецю, яке є індуктором біосинтезу целюлаз. Штам здатний за відповідних умов проведення процесу культивування секретувати у середовище комплекс ензимів - целюлаз, які мають ряд супутніх активностей по відношенню до рослинних біополімерів, які входять до складу рослинної сировини та ускладнюють процес її гідролізу.

Активність целюлаз визначають за здатністю до гідролізу фільтрувального паперу (Whatman № 1, щільність 80 г/м²) - загальна целюлозолітична активність (ФПА), На-карбоксиметилцелюлози (C5678, Sigma, Німеччина) - ендоглюканазна активність та целобіози (22150, Sigma, Німеччина) - целобіазна активність [15]. За одиницю активності (од) приймають таку кількість ензиму, яка утворює 1 мкмоль редуруючих цукрів (для полімерних субстратів) або 1 мкмоль глюкози (для целобіози) протягом 1 хв за стандартних умов. Загальну лігнолітичну та лакказну активності визначають за здатністю до знебарвлення розчинів барвника ремазол брильянтовий блакитний Р та сирингалдазину відповідно. Пектинестеразну, полігалактуроназну, мальтазну, інвертазну α - та β -амілазну активності ензимів визначають відповідно до розчинів пектину, мальтози, сахарози та крохмалю.

Ферментні препарати, отримані за допомогою запропонованого штаму, можуть бути використані у вигляді культуральної рідини, у вигляді рідких концентрованих препаратів, або у вигляді сухих препаратів, що отримуються ліофілізацією або виморожуванням.

Можливість використання корисної моделі ілюструється прикладами, які не обмежують її об'єм та суть.

Приклад конкретного виконання 1. Для отримання посівного матеріалу (інокулюму) штам гриба *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt AnSc-1 вирощують поверхневим способом на агаризованому глюкозо-картопляному середовищі за температури 32 °С протягом 7 діб. Для дослідження целюлозолітичної активності готують рідке живильне середовище наступного складу (г/л): NaNO₃-2, K₂HPO₄-1, MgSO₄×7H₂O-0,5, KCl-0,5, FeSO₄×7H₂O-0,01, дистильована вода до 1 л, яке розливають по 25 мл у колби Ерленмейєра об'ємом 100 мл. Як єдине джерело вуглецю використовують фільтрувальний папір марки Whatman № 1, щільністю 80 г/м², який вносять у кількості 8 г/л. Кислотність середовища після стерилізації становить 4,95-5,05 рН. Інокуляцію проводять шматочками агару з міцелієм розміром приблизно 5×5 мм. Культивування здійснюють у стаціонарному стані протягом 7 діб за температури 32 °С. Культуральний фільтрат відділяють від біомаси шляхом сепарації. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 6,21; ендоглюканазна - 3,26; целобіазна - 105,18.

Приклад конкретного виконання 2. Культивування здійснюють у колбах Ерленмейєра на живильному середовищі, як описано у прикладі 1, але за початкової кислотності живильного середовища 6,95-7,05 рН. Культивування здійснюють у стаціонарному стані протягом 7 діб за температури 32 °С. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 9,40; ендоглюканазна - 5,01; целобіазна - 51,83.

Приклад конкретного виконання 3. Культивування здійснюють у колбах Ерленмейєра на живильному середовищі, як описано у прикладі 2, але як єдине джерело азоту до живильного середовища вносять сірчаноокислий амоній в концентрації 1,65 г/л. Культивування здійснюють у стаціонарному стані протягом 7 діб за температури 32 °С. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 11,74; ендоглюканазна - 82,88; целобіазна - 15,74.

Приклад конкретного виконання 4. Готують ферментаційне середовище наступного складу (г/л): фільтрувальний папір - 8; (NH₄)₂SO₄-1,65; K₂HPO₄-1; MgSO₄×7H₂O-0,5; KCl-0,5; FeSO₄×7H₂O-0,01; дистильована вода до 1 л. Культивування проводять глибинним способом за температури 32 °С протягом 7 діб у колбах об'ємом 2000 мл.

Культуральний фільтрат відділяють від біомаси центрифугуванням або сепарацією. Осадження ензимів із культурального фільтрату проводять на холоді сульфатом амонію при 100 % насиченні. Осад сепарують та проводять діаліз проти дистильованої води. Отриманий діалізат пропускають через колонку, заповнену Sephadex G-75, розміром 10×300 мм (швидкість потоку - 20 мл/год., об'єм фракції - 2 мл) та об'єднують фракції 5-14. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 5,60; ендоглюканазна - 174,90; целобіазна - 481,53. Супутні ензиматичні активності ферментного препарату целюлаз штаму AnSc-1 представлено в таблиці.

Таблиця

Супутні активності ензиматичного препарату целюлоз
штаму *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt AnSc-1 (од/мг білка)

Ензиматична активність, що вимірювалась									
Загальна лігно-літична активність	Лакказа (КФ 1.10.3.2) (субстрат-сирін-галдазин)	Лакказа (КФ 1.10.3.2) (субстрат-гваякол)	Лакказа (КФ 1.10.3.2) (субстрат-пірокатехін)	Пекти-нестеараза (КФ 3.1.1.11)	Ендополі-галактуроназа (КФ 3.2.1.1)	Маль-таза (КФ 3.2.1.20)	Інвертаза (КФ 3.2.1.26)	α-амілаза (КФ 3.2.1.1)	β-амілаза (КФ 3.2.1.2)
72,5	1,0	8928,6	33,8	2,1	36,8	4,9	29,4	0,1	0,1

Таким чином, запропонований штам AnSc-1 базидіального гриба *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt є високоактивним продуцентом целюлаз із низкою супутніх дереворуйнівних активностей і може бути використаний в промисловому грибівництві, мікробіологічному виробництві та екології для деструкції целюлозовмісних відходів різних галузей промисловості і сільського господарства.

Штам *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt AnSc-1 зберігається в колекції культур шапинкових грибів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету.

Джерела інформації, які використані при складанні заявки

1. Бойко С.М., Древаль К.Г. Вплив температури на активність целюлозолітичних ферментів грибів *Ipex lacteus* Fr. *Coriolus sinuosus* Fr. // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, вип. 3, 2008. - с. 107-113

2. Волова Т.Г. Биотехнология - Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Рос. Ак. Наук, 1999-252 с.

3. Воробьев Г.И. Лесная энциклопедия: в 2-х томах. - М.: Советская энциклопедия, 1985.- 563 с.

4. Золотарев Ф.Н., Головина Г.И., Сивочуб О.А. Деградация лигнина базидиомицетами. // Микология и фитопатология.-1990. - Т. 246, вып. 1.

5. Исаева Е.В., Рязанова Т.В., Чупрунова Н.А. Биоконверсия твердого остатка вегетативной части тополя и топиамбура. // Химия растительного сырья.-2002. - № 2. - С. 149-150.

6. Кухар В.П. Біоресурси - потенційна сировина для промислового органічного синтезу // Біотехнологія.-2008. - Т. 1. - № 1. - С. 12-27.

7. Мухин В.А. Грибы и их роль в природе и развитии цивилизации. // Известия Уральского государственного университета.-1999. - Т. 12, вып. 6.

8. Патент 22477 України. Штам гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et. Cain, 258 - продуцент целюлазного комплексу з нуклеодеполимеразною активністю / Сирчін С.О., Айзенберг В.Л., Захарченко В.О. та ін. Заявка № 95062987, від 26.06.1995, кл. C12N 1/14, C12P 21/00, A23K 3/02, Бюл. № 3/1998, від 03.03.1998 (найближчий аналог).

9. Рабинович М.Л. Производство этанола з целлюлозосодержащих материалов: потенциал российских разработок // Прикл. биохим. микробиол.-2006. - Т. 42. - № 1. - С. 5-32.

10. Семичаевский В.Д. Целлюлазы высших базидиальных грибов. // Микология и фитопатология.-1989. - Т 23, вып. 6.

11. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В. и др. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы. // Прикладная биохимия и микробиология.-2006. - Т.42, вып. 6. - С. 674-680.

12. Banerjee G., Scott-Craig J.S., Walton J.D. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective // Bioen. Res.-2010. - N 3. - P. 82-92.

13. Demain A.L Biosolution to the energy problem // J. Ind. Microbiol. Biotechnol.-2009. - N 36. - P. 319-332.

14. Eriksen J., Goksøyr J. Cellulases from *Chaetomium thermophile* var. *dissitum* // Eur. J. Biochem.-1977. - V. 77-P. 445-450.

15. Ghose T.K. Measurement of cellulase activity // Pure Appl. Chem.-1987. - Vol. 59, N 2. - P. 257-268.

5 16. Gum E.K., Brown R.D. Comparison of four purified extracellular 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase enzymes from *Trichoderma viride* // Biochim. Biophys. Acta.-1977. - V. 492, N 1. - P. 225-231.

17. Halliwell G., Vincent R. The action on cellulose and its derivatives of a purified 1,4- β -glucanase from *Trichoderma koningii*. // Biochem J.-1981. - V. 199-p. 409-417.

10 18. Juy M., Amrt A., Alzari P. etc. Three-dimensional structure of a thermostable bacterial cellulase // Nature.-1992. - V. 357-p. 89-91.

19. Nidetzky B., Steiner W., Claeysens M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis // Biochem. J.-1994. - N 303. - P. 817-823.

15

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt AnSc-1 - продуцент ензимів целюлозолітичного комплексу.

20

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601