



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **84836**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2012 15112**

(22) Дата подання заявки: **28.12.2012**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **11.11.2013**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **11.11.2013, Бюл.№ 21**

(72) Винахідник(и):

**Древаль Костянтин Григорович (UA),  
Бойко Михайло Іванович (UA),  
Кузнєцова Ірина Анатоліївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ,  
вул. Університетська, 24, м. Донецьк, 83001  
(UA)**

**(54) ШТАМ СОМАТИЧНИХ СТРУКТУР МАКРОМІЦЕТУ IRPЕХ LACTEUS (FR.) FR. A-ДОН-02 -  
ПРОДУЦЕНТ ЦЕЛЮЛАЗ**

(57) Реферат:

Штам соматичних структур макроміцету Irpex lacteus (Fr.) Fr. A-Дон-02 - продуцент целюлаз.

**UA 84836 U**



Корисна модель належить до ферментативної галузі мікробіологічної промисловості та стосується одержання нового штаму соматичних структур макроміцету (вищого базидіального гриба) *Irrex lacteus* (Fr.) Fr. А-Дон-02 - продуцента ензимів комплексу целюлаз, який може бути використаний у процесах виробництва ензимів та/або деструкції відходів різних галузей сільського господарства і промисловості, що містять целюлозу.

Біоконверсія відтворювальної рослинної сировини у паливо, кормові та харчові продукти, напівпродукти для хімічної та мікробіологічної промисловості розглядаються у наш час як одна з ключових галузей біотехнології [3]. Щорічне виробництво деревини для виготовлення паперу досягає 150 млн. т. [9] та постійно зростає, створюючи тим самим великий тиск на оточуюче природне середовище. Таким чином, непотрібні сировинні ресурси для ферментативного отримання вуглеводів з целюлози дуже великі та постійно відтворюються [4, 6]. На практиці широко розповсюджена технологія хімічної конверсії целюлігніну, що переслідує таку ж мету, як і технологія біоконверсії - перетворення целюлози у сахаристі речовини [7]. Знання механізмів ферментативної деструкції деревини та її компонентів необхідні для прийняття заходів щодо попередження дії дереворуйнівних організмів. Крім цього ферментативні реакції використовують для виділення з деревини її компонентів та для вивчення зв'язків між ними [10].

Важливі досягнення у галузі ферментативного гідролізу целюлози проаналізовано А.А. Клесовим (1987), який детально розглянув склад та властивості поліферментних целюлазних комплексів у різних організмів, а також питання щодо генетичної інженерії целюлаз. Однак незважаючи на досягнення у вивченні целюлаз, все ще не з'ясовано, які ферменти та в яких співвідношеннях необхідні для забезпечення ефективного гідролізу целюлози; є лише окремі робочі гіпотези відносно механізму дії целюлаз [9].

Сучасна біотехнологія відчуває гостру нестачу активних продуцентів ензимів целюлозолітичної дії з метою їх використання в процесах промислової утилізації целюлозовмісних відходів та отримання біопалива [13]. Саме тому останнім часом у світі проводяться активні дослідження з пошуку нових продуцентів целюлаз серед бактерій, грибів відділів *Zygomycota* та *Ascomycota* [1,2, 14].

Найбільш близький за технічною суттю і результатом, що досягається, є штам *Trichoderma longibrachiatum* ВКМ F-3865D, що синтезує ензими целюлозолітичного комплексу та низку інших гідролаз [5]. Однак вказаний штам має ряд недоліків, а саме: багатокомпонентний та коштовний склад живильного середовища, необхідність безперервного додавання лактози як джерела вуглецю протягом всього терміну культивування та додаткового внесення мінеральних компонентів у другій фазі культивування штаму - продуценту. Крім цього для целюлаз вказаного штаму не досліджено основні фізико-хімічні властивості, що є значним недоліком, оскільки низькі термо- та рН-стабільність можуть значно обмежити використання целюлозолітичних ензимів, синтезованих цим продуцентом. Крім цього значним недоліком штаму *Trichoderma longibrachiatum* ВКМ F-3865D є властивість спороносити у культурі, що може призвести до забруднення оточуючого середовища або викликати алергічні реакції у персоналу.

Задача корисної моделі - отримання нового штаму гриба - продуцента целюлозолітичних ензимів, здатного до синтезу целюлаз за культивування на простих живильних середовищах та встановлення біохімічних характеристик ензимів целюлозолітичного комплексу цього штаму.

Поставлена задача вирішується тим, що як продуцент целюлозолітичного комплексу ензимів використовується штам *Irrex lacteus* (Fr.) Fr. А-Дон-02.

Штам грибу *Irrex lacteus* (Fr.) Fr. А-Дон-02 виділено за загальноприйнятими методиками з дикорослих плодових тіл, що зібрані на деревині абрикосу (*Prunus armeniaca* L.) у м. Донецьку у 2002 р. Штам зберігається у колекції культур кафедри фізіології рослин Донецького національного університету під шифром А-Дон-02.

Чисту культуру штаму А-Дон-02 підтримують за температури  $4\pm 1$  °С шляхом пересівів кожні 5-6 місяців на агаризованому картопляно-глюкозному середовищі наступного складу (г/л) [8]: картопля -250, глюкоза - 15, агар-агар- 10.

Штам А-Дон-02 характеризується культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними ознаками.

Культурально-морфологічні ознаки.

Штам А-Дон-02 атоксичний, мезофільний, швидко росте. На агаризованому середовищі міцелій розповсюджується рівномірно. Субстратні і повітряні гіфи розвиваються неодноразово, краще розвинуті субстратні гіфи. Колонія гриба має округлу форму, без ущільнень у центрі або на периферії колонії. Колір молоді колонії сніжно - білий, з віком, на 7-10 добу, починаючи з центра колонії, забарвлюється до ледь сіруватого кольору. Субстрат не забарвлює. За культивування на рідких середовищах добре розвивається та займає значну частину вільного простору повітря колби, високо підіймаючись над поверхнею середовища.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

Аероб. Ростає за температури 24-36 °С, оптимум для синтезу целюлаз - 34 °С. Оптимум рН для накопичення біомаси на рідкому глюкозо-пептонному середовищі 5,4-5,6 од, а для продукції целюлозолітичних ензимів - 7 од. Утворює ферментні системи, які дозволяють рости на відповідних комплексних субстратах: целюлозі, крохмалі, пектині, тирсі різних порід деревини, в тому числі хвойних, відходах целюлозно-картонної промисловості. Відношення до джерел азоту: для росту використовує пептон, амонійний та нітратний азот.

Культивування штаму *Irrex lacteus* (Fr.) Fr. А-Дон-02 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 (лігніну, пектину, крохмалю), а також проявляють ензиматичну активність щодо дисахаридів - мальтози та сахарози.

Активність целюлаз визначають за здатністю до гідролізу фільтрувального паперу (Whatman №1, щільність 80 тім<sup>2</sup>) - загальна целюлозолітична активність (ФПА), Na-карбоксиметилцелюлози (C5678, Sigma, Німеччина) - ендоглюканазна активність та целобіози (22150, Sigma, Німеччина) - целобіазна активність [11]. 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 (t=40 °С, рН=4,8). Вміст редуруючих цукрів визначають за методикою Шомодї-Нельсона [12].

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 *Irrex lacteus* (Fr.) Fr. А-Дон-02 вирощують поверхневим способом на агаризованому глюкозо-картопляному середовищі за температури 34 °С протягом 5 діб. Для дослідження целюлозолітичної активності готують рідке живильне середовище наступного складу (г/л): NaNO<sub>3</sub> - 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,5, KCl - 0,5, FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,01, дистильована вода до 1л, 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/м<sup>2</sup>, 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 - 5,45; ендоглюканазна - 3,12; целобіазна - 27,58.

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 34 °С. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 6,70; ендоглюканазна - 20,79; целобіазна - 0,00.

Приклад конкретного виконання 3. Культивування здійснюють у колбах Ерленмейєра на живильному середовищі, як описано у прикладі 2, але як єдине джерело вуглецю до живильного середовища вносять фільтрувальний папір в концентраціях 6, 7, 8, 9 або 10 г/л. Величини активностей целюлозолітичного комплексу, які отримуються на вказаних живильних середовищах, наведено в таблиці 1 (у таблиці наведено середні арифметичні значення, відхилення від середнього арифметичного не перевищує 5 %).

Таблиця 1

Ензиматичні активності целюлозолітичного комплексу  
штаму *Irrex lacteus* (Fr.) Fr. A-Дон-02 за культивування на середовищах  
з різним вмістом єдиного джерела вуглецю - фільтрувального паперу (од/мг білка)

Концентрація джерела вуглецю, г/л	Ензиматичні активності, од/мг білка		
	Загальна целюлозолітична	Ендоглюканазна	Целобіазна
6	3,56	19,46	25,57
7	4,09	21,60	27,07
8	6,70	25,77	33,62
9	2,31	17,26	29,39
10	2,35	13,59	26,12

Приклад конкретного виконання 4. Культивування здійснюють у колбах Ерленмейєра на живильному середовищі, як описано у прикладі 3 з використанням фільтрувального паперу в концентрації 8 г/л як єдиного джерела вуглецю, але як єдине джерело азоту до живильного середовища вносять азотнокислий амоній в концентрації 1,5 г/л. Культивування здійснюють у стаціонарному стані протягом 7 діб за температури 34 °С. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 18,21; ендоглюканазна - 114,37; целобіазна - 0,00.

Приклад конкретного виконання 5. Готують ферментаційне середовище наступного складу (г/л): фільтрувальний папір - 8;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  - 1,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5;  $\text{KCl}$  - 0,5;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,01; дистильована вода до 1л. Культивування проводять глибинним способом за температури 34 °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 за температури  $4 \pm 1$  °С. 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 6-11. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 4,19; ендоглюканазна - 590,00; целобіазна - 912,09.

При визначенні термолабільності ензиматичного препарату реакційну суміш витримують за температур від 30 до 80 °С з інтервалом 5-10 °С. Таким чином встановлюють оптимальну температуру, за якої визначають термостабільність целюлаз, витримуючи їх за цієї температури та відбираючи проби через 10, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 та 420 хв.

При визначенні рН-лабільності ензиматичного препарату розчини субстратів готують, використовуючи як розчинник 0,1 М цитратний або фосфатний буферні розчини із значенням кислотності від 3 до 9 од. з інтервалом рН 1. Реакційну суміш витримують за стандартної температури для визначення активностей целюлозолітичних ензимів. Таким чином встановлюють оптимальне значення рН, за якого визначають рН-стабільність ензиматичних препаратів, витримуючи їх за цих значень рН та відбираючи проби через 10, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 та 420 хв. Визначення рН-стабільності ензиматичних препаратів проводять за 25 °С щоб уникнути впливу температури на активність ензимів.

Лабільність та стабільність ферментних препаратів штаму *Irrex lacteus* (Fr.) Fr. A-Дон-02, отриманого таким способом, наведено у таблицях 2 та 3 відповідно.

Таблиця 2

Лабільність целюлаз штаму *Irpeh lacteus* (Fr.) Fr. А-Дон-02

Температура, °C	Залишкова активність, %				рН, од.
	Термолабільність		рН-лабільність		
	Ендо-глюканаза	Целобіаза	Ендо-глюканаза	Целобіаза	
30	58,57	40,00	68,94	50,00	3
40	61,08	50,00	100,00	66,67	4
45	87,45	60,00	89,65	100,00	5
50	100,00	60,00	68,94	83,33	6
55	93,72	80,00	43,06	56,67	7
60	63,60	100,00	22,36	50,00	8
65	58,57	80,00	12,01	33,33	9
70	56,06	40,00			
80	46,02	20,00			

Таблиця 3

Стабільність целюлаз штаму *Irpeh lacteus* (Fr.) Fr. А-Дон-02

Час витримки, хв.	Залишкова активність, %			
	Термостабільність		рН-стабільність	
	Ендоглюканаза	Целобіаза	Ендоглюканаза	Целобіаза
0	100,00	100,00	100,00	100,00
10	100,00	100,00	100,00	100,00
30	100,00	100,00	89,15	90,00
60	89,95	88,00	81,92	90,00
120	75,60	80,00	71,08	80,00
180	61,24	80,00	67,46	75,00
240	58,37	80,00	60,23	75,00
300	56,93	68,00	60,23	75,00
360	54,06	60,00	60,23	60,00
420	54,06	48,00	56,62	60,00

Таким чином, запропонований штам А-Дон-02 соматичних структур базидіального гриба *Irpeh lacteus* (Fr.) Fr. є високоактивним продуцентом целюлозолітичних ензимів, здатний до росту на однокомпонентних за джерелом вуглецю живильних середовищах та синтезу целюлаз із високою термо- та рН-стабільністю і може бути використаний в промисловому грибівництві, мікробіологічному виробництві та екології для деструкції целюлозовмісних відходів різних галузей промисловості і сільського господарства.

Штам *Irpeh lacteus* (Fr.) Fr. А-Дон-02 зберігається в колекції культур шапинкових грибів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету.

Джерела інформації:

1. Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В и др. Скрининг штаммов бактерий с высокой целлюлазной активностью // Микробиологический журнал.-2009. - Т. 71, № 5. - С. 41-48.

2. Жданова Н.М., Олішевська СВ., Василевська А.І. та ін. Скрінінг штамів мікроміцетів, що здатні рости та руйнувати целюлозовмісний субстрат // Микробиологія і біотехнологія.-2008. - № 3. - С 58-64.

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

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

5. Патент 2287571 России. Штамм мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* - продуцент комплекса карбогидраз, содержащего целлюлазы, бета-глюканазы, ксиланазы, маннаназы и пектиназы. / Окунев О.Н., Сеницын А.П., Черноглазое В.М. и др. Заявка № 2004126994, от 09.09.2004, кл. C12N 1/14, C12N 9/42, C12R 1/885, Бюл. от 20.02.2006 (прототип).

6. Рабинович М.Л. Производство этанола з целлюлозосодержащих материалов: потенциал российских разработок // Прикл. биохим. микробиол.-2006. - Т. 42, № 1. - С. 5-32.
7. Селиванов А.С. Стабильность ферментных препаратов в условиях, моделирующих распылительную сушку. // Химия растительного сырья, 2002. - № 2. - С. 121-127.
- 5 8. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1999. - 240 с.
9. Семичаевский В.Д. Целлюлазы высших базидиальных грибов. // Микология и фитопатология, 1989. - Т. 23. - Вып. 6.
- 10 10. Фенгел Д., Вегенер Г. Древесина (химия, ультраструктура, реакции). - М.: Лесная промышленность, 1988. - 512 с.
11. Ghose T.K. Measurement of cellulase activity // Pure Appl. Chem.-1987. - Vol. 59, N2. - P. 257-268.
12. Nelson N.A Photometric Adaptation of the Shomogyi Method for the Determination of Glucose. // Journal of Biological Chemistry.-1944. - V.153,№2. - p. 375-379.
- 15 13. Shapiro T.H. America's Energy Future: Technology and Transformation. - Washington: The National Academies Press, 2009. - 650 p.
14. Zhang Y.-H. P., Himmel M.E., Mielenz J.R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies // Biotechnology advances.-2006. -№ 24. - P. 452-481.

20

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам соматичних структур макроміцету *Irrex lacteus* (Fr.) Fr. А-Дон-02 - продуцент целюлаз.

---

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

---

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