



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **89940** (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**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2013 11914</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Древаль Костянтин Григорович (UA),</b> <b>Бойко Михайло Іванович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>10.10.2013</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>12.05.2014</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Древаль Костянтин Григорович,</b> вул. Університетська, 67, кв. 8, м. Донецьк-48, 83048 (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>12.05.2014, Бюл.№ 9</b>	

**(54) ШТАМ СОМАТИЧНИХ СТРУКТУР БАЗИДІОМІЦЕТУ IRPEX LACTEUS (FR.) FR. K- 1 - ПРОДУЦЕНТ ДЕРЕВОРУЙНІВНИХ ФЕРМЕНТНИХ СИСТЕМ**

**(57)** Реферат:

Штам соматичних структур базидіоміцету Irpex lacteus (Fr.) Fr. K-1 - продуцент дереворуйнівних ферментних систем.

**UA 89940 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 лігноцелюлозу.

Зі всього різноманіття організмів лише гриби мають необхідні ферментні системи, що дозволяють їм здійснювати повну біохімічну конверсію сполук деревини. Найбільш лабільний і різноманітний ферментативний апарат характерний для дереворуйнівних базидіальних грибів, що зумовлено складною та різноманітною структурою субстратів, які розщеплюються під дією певних екзоферментів та утилізуються завдяки відповідним ендоферментам. Біодеструкція природних субстратів - це поліензимний процес, в якому основну роль відіграють позаклітинні целюлази, лігнінази, пектинази та амілази, більша частина яких знаходить практичне застосування людиною [8]. Пектолітичні та амілолітичні ферменти використовують при виготовленні вин та соків, при обробці різноманітних рослинних продуктів, наприклад при екстрагуванні крахмалу, вітамінів, лікарських речовин, при заготовці кормів у тваринництві, для оцукрювання карбоновмісних відходів, у текстильній промисловості тощо [1, 16]. Не менш важливим є їх використання в біотехнології рослин, разом із комплексом целюлаз вони утворюють ферменти мацеруючої дії, що використовуються під час отримання протопластів клітин [1, 2]. Пошук активних продуцентів целюлаз серед базидіальних дереворуйнівних грибів є актуальним питанням у багатьох країнах [10, 15].

Нині найбільш широко вивченими об'єктами-продуцентами целюлаз є нижчі гриби та бактерії [3, 4, 12, 13]. В той же час, основною групою живих організмів у природі, яка приймає участь у процесах деструкції деревини, є базидіоміцети [6]. Саме тому в процесах пошуку активних продуцентів ензимів особливу увагу слід звертати саме на групу Basidiomycetes [9]. Однак майже відсутні відомості про наявність у таких продуцентів целюлозолітичних ензимів супутніх ензиматичних активностей, в першу чергу щодо основних супутників целюлози - лігніну, пектину та крохмалю.

Найбільш близький за технічною суттю і досяжності результату є штам *Myceliophthora fergusii* UV-64 BKM F-3932D що синтезує ензими целюлозолітичного комплексу, а також ксиланази [5]. Однак вказаний штам має ряд недоліків, а саме: багатокомпонентний склад живильного середовища як за джерелом вуглецевого, так і за джерелом азотного живлення, необхідність постійного додавання глюкози протягом другої фази культивування, порівняно невисокі значення активності компонентів целюлозолітичного комплексу. Крім того, для вказаного штаму не досліджено здатність до продукції ензимів мацеруючого комплексу, що є значним недоліком, оскільки відсутність здатності до конверсії таких сполук, як лігнін, пектин та крохмаль може значно обмежити використання целюлаз, синтезованих цим продуцентом. Значним недоліком штаму *Myceliophthora fergusii* UV-64 BKM F-3932D є також і природна здатність до спороношення, що може призвести до забруднення оточуючого середовища та/або викликати алергічні реакції у людей.

Задача корисної моделі - отримання нового штаму гриба - продуцента целюлозолітичних ензимів, що проявляють також здатність до конверсії природних супутників целюлози - лігніну, пектину та крохмалю.

Поставлена задача вирішується тим, що як продуцент целюлозолітичного комплексу ензимів із низкою супутніх ензиматичних активностей використовується штам *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. K-1.

Штам гриба *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. K-1 виділено за загальноприйнятими методиками з дикорослих плодових тіл, зібраних на деревині листяної породи у штучному лісонасадженні м. Донецька у 2002 р. Штам зберігається у колекції культур кафедри фізіології рослин Донецького національного університету під назвою K-1.

Чисту культуру штаму K-1 підтримують за температури  $4 \pm 1$  °C шляхом пересівів кожні 5-6 місяців на агаризованому картопляно-глюкозному середовищі наступного складу (г/л) [7]: картопля - 250, глюкоза - 15, агар-агар - 10.

Штам K-1 характеризується наступними культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними ознаками.

Культурально-морфологічні ознаки.

Штам K-1 атоксичний, мезофільний, швидко росте. На агаризованому середовищі міцелій розповсюджується рівномірно. Субстратні і повітряні гіфи розвиваються неодноразово, краще розвинені субстратні гіфи. Колонія гриба має близьку до округлої форму, із ущільненням від центру колонії. Колір молоді колонії сніжно-білий, з віком, на 14-18 добу, починаючи з центра колонії, забарвлюється до ледь сіруватого кольору. Інколи може забарвлювати субстрат у ледь жовтуватий колір. 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 24-38 °С, оптимум для синтезу целюлаз - 34 °С. Оптимум рН для накопичення біомаси на рідкому глюкозо-пептонному середовищі 4,8-5,0 од, а для продукції целюлозолітичних ензимів - 7,0 од. Утворює ферментні системи, які дозволяють рости на відповідних комплексних субстратах: целюлозі, крохмалі, пектині, лігносульфонаті, тирсі різних порід деревини, в тому числі хвойних, відходах целюлозно-картонної промисловості, а також побутових целюлозовмісних відходах та не кормових залишках сільського господарства.

Відношення до джерел азоту: для росту використовує пептон, амонійний та нітратний азот.

Культивування штаму *Irpeh lacteus* (Fr.) Fr. K-1 здійснюють у аеробних умовах поверхневої або глибинної культури, на живильному середовищі з монокомпонентними джерелами вуглецю та азоту, які є індукторами біосинтезу целюлаз із здатністю до перетворення лігніну, пектину та крохмалю.

Целюлази визначають за здатністю до гідролізу фільтрувального паперу (щільність 80 г/м<sup>2</sup>) - загальна целюлозолітична активність, 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 редукуючих цукрів (для полімерних субстратів) або 1 мкмоль глюкози (для целобіози) протягом 1 хв за стандартних умов. Вміст редукуючих цукрів визначають за методикою Шомодьї-Нельсона [14].

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

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

Приклад конкретного виконання 1. Для отримання інокулюму штам гриба *Irpeh lacteus* (Fr.) Fr. K-1 вирощують поверхневим способом на агаризованому глюкозо-картопляному середовищі за температури 32 °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 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/м<sup>2</sup>, який вносять у кількості 8 г/л. Кислотність середовища після стерилізації у автоклаві АГ-1 (40 хв за температури близько 120 °С та тиску 1,4-1,8 атм) становить 4,95-5,05 рН. Інокуляцію проводять шматочками агару з міцелієм розміром близько 5×5 мм. Культивування здійснюють у стаціонарному стані протягом 7 діб за температури 32 °С у термостатах ТС-80 або ТС-80-М-2. Культуральний фільтрат відділяють від біомаси шляхом сепарації або фільтрування. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 0,00; ендоглюканазна - 21,16; целобіазна - 56,19. За проведення культивування у стаціонарному стані протягом 14 діб за температури 32 °С величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: загальна целюлозолітична - 9,57; ендоглюканазна - 6,63; целобіазна - 19,21.

Приклад конкретного виконання 2. Культивування штаму K-1 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 - 9,74; ендоглюканазна - 74,02; целобіазна - 51,56.

Приклад конкретного виконання 3. Культивування здійснюють у колбах Ерленмейєра на живильному середовищі, як описано у прикладі 2, але активність ензимів визначають протягом 31 доби культивування на кожну непарну добу. Величини активностей целюлозолітичного комплексу протягом тривалого терміну культивування наведено в таблиці 1 (у таблиці наведено середні арифметичні значення, відхилення від середнього арифметичного не перевищує 5 %).

Таблиця 1

Динаміка целюлозолітичних активностей культурального фільтрату штаму K-1 *Irpex lacteus* протягом тривалого терміну культивування, од/мг білка

Доба культивування	Целюлозолітична активність		
	Загальна целюлозолітична активність	Ендоглюканазна	Целобіазна
1	0,00	2,92	66,79
3	0,89	16,56	89,60
5	1,13	12,14	28,17
7	9,70	14,21	50,19
9	0,77	10,77	21,99
11	0,57	12,52	66,95
13	1,87	12,88	58,17
14	0,00	19,50	51,65
15	1,01	15,36	14,88
17	1,13	11,63	22,09
19	0,51	3,30	15,11
21	0,79	9,60	18,88
23	0,14	10,20	9,94
25	0,59	11,37	0,00
27	0,70	8,40	0,00
29	0,38	16,09	0,00
31	0,00	9,10	11,71

5 Приклад конкретного виконання 4. Культивування здійснюють у колбах Ерленмейєра на живильному середовищі, як описано у прикладі 2, але як єдине джерело азоту до живильного середовища вносять азотнокислий кальцій в концентрації 1,50 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 - 12,40; ендоглюканазна - 44,31; целобіазна - 10,05.

10 Приклад конкретного виконання 5. Готують ферментаційне середовище наступного складу (г/л): фільтрувальний папір - 8; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> - 1,50; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,50; KCl - 0,50; FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,01; дистильована вода до 1 л. Культивування проводять глибинним способом за температури 34 °С протягом 7 діб у колбах об'ємом 2000 мл.

15 Культуральний фільтрат відділяють від біомаси сепарацією. Осадження ензимів із культурального фільтрату проводять за t=10±2 °С сульфатом амонію при 100 % насиченні. Осад центрифугують та проводять діаліз проти дистильованої води за t=6±2 °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 5-11. При цьому величини активностей компонентів целюлозолітичного комплексу складають, од/мг білка: ендоглюканазна - 1327,90; целобіазна - 1807,20.

20 Отримані таким чином ферментні препарати проявляють здатність до гідролізу не тільки вказаних субстратів, але й модельних сполук лігніну - барвника ремазолу бриліантового блакитного R (загальна лігнолітична активність), сирінгалдазину, гваяколу та пірокатехіну (лакказна активність), значення яких відповідно складає, од/мг білка: 772,90; 137,40; 47619,00 та 540,50. Отриманий в очищеному вигляді ферментний препарат целюлаз штаму K-1 здатен до утилізації пектину, що проявляється у активності пектинестерази (8,9 од/мг білка) та ендополігалактуронази (853,50 од/мг білка). Препарат целюлаз запропонованого штаму K-1 проявляє також α- та β-амілазну активності (0,3 та 0,4 од/мг білка відповідно), що вказує на його здатність до гідролізу крохмалю.

30 Таким чином, запропонований штам K-1 базидіального гриба *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. є високоактивним продуцентом ензимів комплексу целюлаз, які проявляють також і лігнолітичну, пектолітичну та амілазну активності, і може бути використаний у мікробіологічній або харчовій промисловості, у сільському та лісовому господарствах для переробки рослинної сировини.

Для отримання ензимів целюлозолітичного комплексу за культивування заявленого штаму немає потреби у застосуванні складних та коштовних живильних середовищ і відсутня необхідність постійного підживлення штаму K-1 протягом всього терміну культивування. Отриманий з заявленого штаму K-1 ензиматичний препарат целюлаз має комплексну дію при

гідролізі лігноцелюлозної маси, тому відсутня необхідність приготування багатокомпонентних ензиматичних сумішей при гідролізі лігноцелюлозної сировини.

Технічний результат, який отримується за реалізації запропонованої корисної моделі, полягає у суттєвому збільшенні ефективності дії ензиматичних препаратів за рахунок високої активності компонентів целюлозолітичного комплексу та розширенні спектра використання ферментних препаратів у різноманітних галузях біотехнології за рахунок здатності до активного перетворення лігніну, пектину та крохмалю.

Штам *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. K-1 зберігається в колекції культур шапинкових грибів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету.

Джерела інформації:

1. Волова Т.Г. Биотехнология/ Т.Г. Волова. - Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. - 252 с.

2. Михайлова Р.В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии/ Р.В. Михайлова. - Мн.: Бел. наука, 2007. - 407 с.

3. Патент 22477 України. Штам гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et. Cain, 258 - продуцент целюлазного комплексу з нуклеодеполімеразною 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.

4. Патент 2001949 России. Штамм гриба *Trichoderma reesei* - продуцент целлюлозолитических ферментов./ Кернс Г., Куде Е., Морозов А.М. и др. Заявка № 5027083, от 19.12.1991, кл. C12N 1/14, C12N 9/42, Бюл. от 30.10.1993.

5. Патент 2361915 России. Штамм мицелиального гриба *Myceliophthora fergusii* - продуцент нейтральных целлюлазы, бета-глюканазы и ксиланазы./ Синицын А.П., Окунев О.Н., Черноглазов В.М. и др. Заявка № 2008101252, от 21.01.2008, кл. C12N 1/14, C12N 9/42, Бюл. от 20.07.2009 (прототип).

6. Сафонов М.А. Скорость микогенной деструкции древесины в лесах Южного приуралья. //Вестник ОГУ № 2, февраль 2006. - Т. № 2. - С. 18-21.

7. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1999 - 240 с.

8. Ферментные системы высших базидиомицетов/ [Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Трутнева И.А.]. - К.: Наукова думка, 1989. - 280 с.

9. Eriksson K.E. Fungal degradation of wood components.// Pure&Appl. Chem. - 1981. - Vol. 53. - p. 33-43.

10. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw/ M. Taniguchi, H. Suzuki, D. Watanabe [et al.]/ Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2005. - V. 100, № 6. - P. 637-643.

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

12. Gibbons W.R. Integrated biorefineries with engineered microbes and high-value co-products for profitable biofuels production. /W.R. Gibbons, S.R. Hughes// In vitro cellular and developmental biology - Plant. - 2009. - № 45. - p. 218-228.

13. Gilkest N., Kilburn D., Miller R. etc. Structural and Functional Analysis of a Bacterial Cellulase by Proteolysis.// Journal of Biological Chemistry. - 1989. - V 264, № 30. - p. 17802-17808.

14. 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. Purification and Characterization of Exo-b-D-Glucosaminidase from a Cellulolytic Fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7/ N. Masahiro, T. Hiroya, K. Aya [et al.]/ Appl. Env. Microbiol. - 1998. - V.64, № 3. - P. 890-895.

16. Rai Inderpal. Application of biotechnology in the textile industry/ Inderpal Rai// Everyman's Science. - 2003. - № 1. - P. 25-30.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам соматичних структур базидіоміцету *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. K-1 - продуцент дереворуйнівних ферментних систем.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

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