



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВО(19) UA (11) 22477 (13) A  
(51) 6 C 12 N 15/00; C 12 Q 1/68ОПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті  
на підставі Постанови Верховної Ради України  
№ 3769-XII від 23 XII 1993 рПублікується  
в редакції заявника(54) ШТАМ ГРИБА *THIELAVIA TERRESTRIS* (APINIS) MALLOCH ET CAIN, 258-ПРОДУЦЕНТ  
ЦЕЛЮЛАЗНОГО КОМПЛЕКСУ З НУКЛЕОДЕПОЛІМЕРАЗНОЮ АКТИВНІСТЮ

1

(21) 95062987  
(22) 26.06.95  
(24) 03.03.98  
(46) 30.06.98. Бюл. № 3  
(47) 03.03.98  
(72) Сирчін Сергій Олександрович, Айзенберг Вікторія Леонідівна, Захарченко Валентина Олексіївна, Капичон Анна Павлівна, Седіна Світлана Анатоліївна, Шинкаренко Любов Миколаївна  
(73) Сирчін Сергій Олександрович, Айзенберг Вікторія Леонідівна, Захарченко Ва-

2

лентина Олексіївна, Капичон Анна Павлівна, Седіна Світлана Анатоліївна, Шинкаренко Любов Миколаївна  
(57) Штамм гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258 (коллекция отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, коллекционный номер - 258) - продуцент целлюлазного комплекса с нуклеодеполимеразной активностью.

Изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к производству ферментов, и представляет собой штамм гриба, отобранный по признакам внеклеточного синтеза целлюлаз и нуклеодеполимераз и может быть использован в сельском хозяйстве для улучшения качества грубых кормов, обогащения их белком и повышения их переваримости, для переработки различного рода целлюлозосодержащих отходов, а также благодаря наличию нуклеодеполимеразной активности - в качестве безвредного (экологически чистого) удобрения, средства защиты растений, стимулятора роста растений.

Истощение пищевых и энергетических мировых запасов обуславливает постоянное стремление исследователей к поиску неиспользованных ресурсов

Целлюлоза, составляющая треть растительной ткани, является одним из возобновляемых источников углерода [1, 2].

Ферментативный гидролиз целлюлозы осуществляется целлюлазами и имеет ряд преимуществ перед химическим гидролизом [2, 3].

Его эффективность в основном обуславливается активностью компонентов целлюлазного комплекса, в том числе эндо- и экзо-глюканаз неупорядоченно воздействующих на внутренние  $\beta$ -1,4-связи [4] и экзоглюканаз.

Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья (например, соломы) в значительной степени зависит от активности эндо- и экзо-глюканаз [2], биосинтез которых продуцентом происходит под влиянием индуктора - целлюлозы.

(19) UA (11) 22477 (13) A

В то же время использование целлюлаз при силосовании и облагораживании грубых кормов облегчает гидролиз растительных материалов и увеличивает их переваримость [12].

Обсуждается также возможность использования штаммов грибов с повышенным синтезом целлюлаз при глубинном культивировании на среде, содержащей пшеничную солому (2%), для прямой ферментации целлюлозных материалов в этанол [5].

Среди требований, предъявляемых к ферментам целлюлазного комплекса (цит. по [6]) особая роль принадлежит стабильности целлюлаз при температурах порядка 65°C, так как это позволяет интенсифицировать процесс гидролиза и в значительной мере снять проблему стерильности. К сожалению, традиционные промышленные продуценты – лизофильные микромицеты – секретируют ферменты целлюлазного комплекса, с термостабильностью, недостаточной для их использования выше 60°C [6].

Поэтому понятен интерес биотехнологов к термофильным и термотолерантным продуцентам целлюлаз, синтезирующих, как правило, термостабильные ферменты.

Внеклеточные нуклеодеполимеразы грибов выполняют экстраклеточную пищеварительную функцию [7], проявляют противовирусную активность, благоприятствуют утилизации субстратов и способствуют накоплению белка.

Известными продуцентами комплекса целлюлолитических ферментов являются представители родов: *Aspergillus*, например, *Aspergillus terreus* [8], *Aspergillus niger* [9]; *Penicillium* в частности *Penicillium pinophilum* (*funiculosum*) [4]; *Humicola*–*Humicola insolens* [9]; *Geotrichum*–*Geotrichum candidum* [9] и др.

Однако, при характеристике, указанных продуцентов целлюлаз нуклеодеполимеразная активность у них не фиксируется.

Большинство известных в настоящее время продуцентов целлюлолитических ферментов принадлежит к роду *Trichoderma* [2, 10, 11].

Известен продуцент целлюлаз – мутантный штамм гриба *Trichoderma reesei* [10], синтезирующий комплекс целлюлаз с незначительной целлюлолитической активностью при культивировании на гидролизатах пшеничной соломы. Однако у наиболее активного варианта гриба образование такого компонента комплекса как эндо-1,4 – глюконаза повысилось после мутагенной обработки только на 45%.

Недостаток штамма состоит в том, что он получен при помощи мутагенного воздействия следствием чего является неустойчивость его признаков, склонность к их реверсии, необходимость дорогостоящего поддержания стабильности его свойств.

Наиболее близкий к предлагаемому – продуцент целлюлаз *Trichoderma lignorum* штамм 88; селекционированный в Институте микробиологии и вирусологии АН Украины [12, 13].

Однако серьезным недостатком как самого штамма, так и представителей всего рода грибов *Trichoderma*, является способность к обильному спорообразованию, что приводит к загрязнению окружающей среды, к аллергическим заболеваниям у людей.

К недостаткам штамма *Trichoderma lignorum* 88 следует также отнести сравнительно низкие величины активностей эндо- и экзоглюканаз, отсутствие нуклеодеполимеразной активности, узкий диапазон температурных границ роста по сравнению с предлагаемым. Будучи мезофильной культурой, *Trichoderma lignorum* 88 уступает предлагаемому в способности к росту при повышенных температурах.

Задача изобретения – получение нового штамма гриба – продуцента целлюлазного комплекса с высоким выходом эндо- и экзонуклеаз, обладающего нуклеодеполимеразной активностью и растущего в широком диапазоне температур.

Поставленная задача решается тем, что в качестве продуцента целлюлазного комплекса с нуклеодеполимеразной активностью используется штамм термофильного гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258.

Штамм гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258 выделен в отделе физиологии и систематики микромицетов ИВМ АН Украины в 1993 году В. А. Захарченко из древесных отходов.

Штамм многократно пассировался на субстрате, содержащем солому, а наиболее активные варианты по эндо- и экзонуклеазе, обладающие нуклеодеполимеразной активностью, пересеивались на сусло-агаровые косяки.

Культура обладает стабилизированной устойчивостью по активности вышеуказанных ферментов.

Штамм хранится в коллекции культур отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины под № 258.

Штамм гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258 характеризуется более высокими по сравнению с прототипом вели-

чинами активности эндоглюканазы 1 (в 2,5–3,0 раза), эндоглюканазы II (в 2 раза), экзоглюканазы (в 2,2 раза).

Разнообразные целлюлозосодержащие субстраты оказывают селективное воздействие на активность отдельных компонентов целлюлаз.

Одно из преимуществ заявляемого гриба заключается в том, что активность синтезируемых им компонентов целлюлолитического комплекса, включая целлобиазу, варьирует в зависимости от среды культивирования.

Будучи способным к синтезу активных эндо- и экзоглюканаз, обладая нуклеодеполимеразной активностью, заявляемый продуцент отличается специфичностью по отношению к ферментативному гидролизу соломы, что выражается в интенсивном росте на указанном субстрате с образованием значительного количества белка (сырого протеина до 10–15 г/л).

Штамм *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258 характеризуется следующими культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими свойствами.

Культурально-морфологические особенности.

Штамм *Thielavia Terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258 атоксичный, термофильный, быстро растущий, образует хорошее конидиальное спороношение типа *Acromonium* при выращивании на агаризованных средах.

На агаризованном пивном сусле на 7-й день роста при 42°C колонии достигают 78 мм в диапазоне хлопьевидно-пушистые, белые, светло-серые, с нижней стороны светло-соломенные до светло-коричневых.

Гифы мицелия неокрашенные, септированные, до 3,5 мкм толщиной. Фиакиды лотеральные или терминальные на гифах, с поперечной перегородкой или без нее, иногда вздутые в базальной части, сужены к вершухе, простые или слабоветвистые, 8–20х2–3 мкм.

Конидии обратно яйцевидные до продолговато-цилиндрических, с усеченным основанием, 3,0–4,5х1,8–2,5 мкм, гладкие, неокрашенные, в цепочках, сплюснутых в головки.

Штамм хорошо растет и спороносит на искусственных и синтетических агаризованных питательных средах (крахмально-дрожжевом агаре, видоизмененной агаризованной среде Чапека с пептоном вместо  $\text{NaNO}_3$ , картофельно-глюкозном, сусловом агаре, агаре Сабуро).

Колонии на большинстве изученных сред высокопушистые, белые на среде Сабу-

ро – с образованием чередующихся секторов с хорошо развитым воздушным и субстратным мицелием. На агаризованной среде Чапека колонии тонкие со слабо развитым воздушным мицелием, на картофельном агаре – слабый рост с образованием погруженного мицелия. На агаризованных средах с добавлением целлюлозосодержащих субстратов (соломы,  $\text{Na-KMЦ}$ ) – колонии войлочнопушистые с обильным конидиеобразованием (14–16) (рис. 1).

Физиолого-биологические свойства гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258.

Отношение к источнику углерода: усваивает глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу, рамнозу, сахарозу, крахмал. Целлюлозу гидролизует.

Усваивает янтарную и яблочные кислоты. Усваивает сорбит, маннит.

В качестве источника азота использует пептон, аммонийный азот, нитраты.

Протеолитическая и -амилазная активности обнаружены в следовых количествах; пектолитическая и липолитическая активности отсутствуют.

Аэроб, атоксичный, быстрорастущий, термофил. Температурный диапазон роста культуры от 22 до 55°C с оптимумом для роста – при 42–45°C, для конидиеобразования – при 37°C, для синтеза комплекса целлюлаз – около 40°C.

Штамм является адаптивным природным мутантом, характеризуется повышенной способностью к биосинтезу целлюлазного комплекса и его ведущих компонентов эндо- и экзоглюканаз, обладает нуклеодеполимеразной активностью, трансформируя природные трудноразлагаемые целлюлозосодержащие субстраты (например, солому), образует белок (сырого протеина – до 10–15 г/л).

Благодаря наличию нуклеодеполимеразной активности, а также способности штамма к оптимальному росту и развитию при повышенной температуре, снижается вероятность заражения среды посторонней микрофлорой, что особенно важно в случае использования продуцента при приготовлении кормовых смесей в животноводстве.

Штамм получен методом накопительной культуры. Штамм хранится в пробирках на скошенных агаризованных средах; на фильтровальной бумаге, на зерне с периодическим пересевом 2 раза в год; пересевается на твердые питательные среды (сусло-агар, крахмально-дрожжевой агар, картофельно-глюкозный агар).

ПДК в воздухе рабочей зоны около 0,3 мг/м<sup>3</sup>. (Культура депонирована в коллекции чистых культур отдела физиологии и систематики микромицетов ИМБ АН Украины под номером 258).

Данные по активности компонентов целлюлазного комплекса (ед/мл) у заявляемого штамма в сравнении с известным при росте грибов-продуцентов на минеральной среде с 1% пшеничной соломы в условиях глубинного культивирования приведены в таблице.

Максимум образования комплекса целлюлаз в культуральной жидкости *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258 на жидкой минеральной среде с пшеничной соломой в качестве индуктора ферментов отмечен на 36-ом часу глубинного культивирования (рис. 2); нуклеодеполимеразная активность, достигнув максимума к 48-ому часу культивирования (500 ед/мл) к 72-ому часу плавно снижается (до 300 ед.-мл). Максимум биомассы достигается к 72-ому часу культивирования.

Внеклеточную целлюлолитическую активность определяли согласно [17]. Активность осаживающей эндоглюканазы I/КФ 3.2.1.4, 1.4 (1,3;1,4)-Д-глюкан-4 глюканогидролазы) определяли по методу Логиновой с соотр. [18]. В качестве субстрата использовали КМЦ (1%-ный раствор) степень замещения 180-200. За единицу активности принимали количество фермента, которое за 30 мин, действия на КМЦ при температуре 50°C и pH 5,0 образует 1 мг глюкозы за 1 мин (метод Сомоджи-Нельсона [18]).

Активность разжижающей эндоглюканазы II определяли вискозиметрически (субстрат 0,45%-ный раствор КМЦ средней вязкости). Активность эндоглюканазы II выражали в микромолях глюкозидных связей, расщепленных под действием фермента за 1 мин (18). Активность экзоглюканазы (КФ 3.2.1.91, 1, 4 - Д-глюканцеллобиогидролазы) определяли методом Мандельс-Вебера [18]. В качестве субстрата использовали фильтровальную бумагу. За единицу активности принимали количество фермента, которое в стандартных условиях за 1 мин образует 1 мг глюкозы, определяемой методом Сомоджи-Нельсона.

Активность целлобиазы (КФ) 3.2.1.2.1, - Д-глюкозид-глюкогидролазы) определяли по способности фермента гидролизовать целлобиозу (глюкоза определяется глюкозо-оксидазно-пероксидазным методом [18]). За единицу активности принимали количество фермента, которое в стандартных условиях вызывает образование 1 мг глюкозы за 1 мин.

Содержание сырого протеина определяли согласно [19].

**Пример 1** Для получения посевного материала (инокулюма) культуру гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258 выращивают глубинным способом при 40 ± 1°C в колбах объемом 750 мл на качалках с 220 об/мин в течение 24 час. на минеральной среде состава, 0: сахар - 2,0; аммоний азотнокислый - 0,2; калий фосфорнокислый однозамещенный - 0,1; калий хлористый - 0,1; кальций углекислый - 0,05; магний сернокислый - 0,1; вытяжка из пшеничных отрубей - 10; Ферментационную среду состава, %: солома - 1,0; аммоний азотнокислый - 0,2; калий фосфорнокислый однозамещенный - 0,1; калий хлористый - 0,1, кальций углекислый - 0,05; магний сернокислый - 0,1, засеянную 10% инокулюма культивируют глубинным способом при 40 ± 1°C в течение 36 час в колбах объемом 750 мл на качалке с 220 об/мин или в производственных ферментерах при 40 ± 1°C со скоростью вращения мешалки 200 об/мин и аэрацией 1,0 объема воздуха на 1 л среды в 1 мин.

Культуральный фильтрат отделяют от биомассы центрифугированием или сепарацией. При этом величины активности компонентов целлюлолитического комплекса составляют, ед/мл: экзоглюканазы - 2,0; эндоглюканазы I - 8,2; эндоглюканазы II - 38; целлобиазы - 1,8.

Осаждение фермента из культуральной жидкости проводят на холоде сульфатом аммония при 70%-ом насыщении (либо тремя объемами ацетона). Осадок сепарируют и ставят на диализ против дистиллированной воды (либо сушат). После обессоливания сушат лиофильно. Величины активности компонентов целлюлазного комплекса ферментного препарата составляют: экзоглюканазы - 1500 ед/г; эндоглюканазы I - 6500 ед/г; эндоглюканазы II - 32000 ед/г; целлобиазы - 1000 ед/г.

Для получения биомассы с содержанием сырого протеина около 15 г/л гриб выращивают в течение 72 час.

**Пример 2.** Посевной материал (инокулюм) готовят аналогично примеру 1. Ферментационную среду состава, %: солома - 2,0; аммоний азотнокислый - 0,2; калий фосфорнокислый однозамещенный - 0,1; калий хлористый - 0,1; кальций углекислый - 0,05; магний сернокислый - 0,1, засеянную 10-ью % инокулюма, культивируют глубинным способом при 40 ± 1°C в течение 36 час в колбах 750 мл на качалке с 220 об/мин или в производственных ферментерах при 40 ± 1°C со

скоростью вращения мешалки 200 об/мин и аэрацией 1 объем воздуха на 1 л среды в 1 мин. Культуральный фильтрат отделяют от биомассы центрифугированием или сепарацией. При этом величины активности компонентов целлюлолитического комплекса составляют, ед/мл: экзоглюканазы – 2,5; эндоглюканазы I – 10; эндоглюканазы II – 40; целлобиазы – 2,0.

Осаждение фермента из культуральной жидкости проводят на холоду сульфатом аммония при 70%-ом насыщении (либо тремя объемами ацетона). Осадок сепарируют и ставят на диализ против дистиллированной воды (либо сушат). После обессоливания сушат лиофильно. Величины активности компонентов целлюлазного комплекса ферментного препарата составляют: экзоглюканазы – 1800 ед/г; эндоглюканазы I – 8000 ед/г; эндоглюканазы II – 35000 ед/г; целлобиазы – 1200 ед/г.

Для получения биомассы с содержанием сырого протеина около 15 г/л гриб выращивают в течение 72 часов.

Штамм гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258 проверен на токсичность в Украинском научно-исследовательском Институте экогигиены и токсикологии химических веществ.

Штамм гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et Cain, 258 с повышенной способностью к биосинтезу ведущих компонентов целлюлазного комплекса – эндо- и экзоглюканаз, обладающий нуклеополимеразной активностью, представляет собой новую культуру гриба, перспективную для промышленного производства, которую можно будет использовать в качестве продуцента целлюлаз для биоконверсии целлюлозосодержащего сырья.

Источники информации:

(56) 1. Entri T. M., Markkaenen P. Production of cellulolytic enzymes by fungi. – *Adv. Biochem. Eng.*, 1977, 5, p. 1–24.

2. Кастельянос П. С., Окунев О. Н. Подбор штаммов-продуцентов целлобиаз и оптимизация питательной среды для биосинтеза культурами *Aspergillus niger*. – *Прикл. биохимия и микробиология*, 1986, т. 22, вып. 1, с. 80–85.

3. Wood T. M. Cellulase mechanisms. – *Biodeteriorat. Symp.*, Cambridge, 6–11 Sept., 1987. – London, New York, 1988. – p. 333–346.

4. Bhat K. M., Mc-Crae S. I., Wood T. M. Characterization of the major endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases from the cellulase of *Penicillium pinophilum*/ *funiculosum*. – *Biochem. Soc. Trans.* – 1989, – 17, 1, p. 103–104.

5. Macriz B. I., Christakopoulos P., Kekos D., Evangelidou X. Enhanced cellulase

activities of *Fusarium oxysporum* grown on straw for ethanol production. – *Biomass Energy and Ind.: Proc. Int. Cons.*, Orleans, 11–15 May, 1987. – London, New York, 1987, p. 699–703.

6. Клесов А. А. и др. Биотехнология. – 1987, т. 3, 2, с. 162–168.

7. Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М., "Наука", 1979, с. 1–294.

8. Горкича Н. Б., Луста К. А., Хромина С. И., Фихте Б. А. Продукция целлюлаз грибов *Aspergillus terreus* 17 Р, иммобилизованным на композитных носителях. – *Биотехнология*. – 1991, 1, с. 61–64.

9. Родионова Н. А., Капрельянц Л. В., Середницкий П. В., Килимник А. Ю. Гемичеселлюлозы зерна злаков и ферменты, катализирующие их расщепление (Обзор). – *Прикл. биохимия и микробиол.*, 1992, т. 28, вып. 5, с. 645–665.

10. Szczodrak Janusz. The use of cellulases from a  $\beta$ -glucosidase – hyperproducing mutant of *Trichoderma reesei* in simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw. – *Biotechnol. and Bioeng.* – 1989, – 33, 9, p. 1112–1116.

11. Sternberg D. Production of cellulase by *Trichoderma*. – In: *Enzymatic conversion of cellulose materials: Technology and applications*. – *Biotechnol. Symp.*, 6/Eds., Gaden et al., New York, London, Wiley, 1976, p. 35–53.

12. Стрижевская А. Я., Мусич Е. Г., Дреймане М. А. и др. Образование целлюлолитических ферментов грибами, *Микробиол. журн.*, 1983–45, 2, с. 34–37.

13. Билай Т. И. Термофильные грибы и их ферментативные свойства. – Киев, Наукова думка, 1985, с. 171.

14. Билай Т. И., Захарченко В. А. Определитель термофильных грибов. – Киев, Наукова думка, 1987, с. 57–59.

15. Arx J. A. On *Thielavia* and some similar genera of Ascomycetes. 11. *Stud. Mycol.* – 1975, – № 8, – p. 1–29.

16. Tansey M. R. Observation on the thermophilic ascomycete *Thielavia terrestris*. II *Trans. Brit. Mycol. Soc.* – 1977, – 69, № 3, – p. 417–423.

17. Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. (Итоги науки и техн. Сер. биотехнол.) ВИНТИ, 1990, 25, с. 3–147.

18. Сиверс В. С., Мусич Е. Г., Лизак Ю. В. Определение активности целлюлаз. – В кн.: *Методы экспериментальной микологии*. – Справочник. Киев, Наукова думка, 1982, с. 180–187.

19. Fahrlich P., Jrrgang K. Cellulase and protein production by *Chaetomium*, cellulolyticum strains grown on cellulosic substrates. – *Biotechnol. Zett.*, 1981, 3, № 5, p. 201–206;

20. Тихомиров Д. Ф., Столбова В. В., Светличный В. А., Клесов А. А. Высокотермостабильный целлюлазный комплекс новой экстремально термофильной бактерии. 5 Прикл. биохим. и микробиол., 1992, том 28, вып. 3. с. 339–347.

Активность компонентов целлюлазного комплекса (ед./мл) при росте грибов-продуцентов на синтетической среде с 1 % пшеничной соломы в условиях глубинного культивирования

Название гриба	Активности			
	Экзоглюканаза	Эндоглюканаза I	Эндоглюканаза II	Целлобиаза
<i>Trichoderma lignorum</i> 88	1,2	2,9	22	10,8
<i>Thielavia terrestris</i> 258	2,0–2,5	8,2–10,0	38–40	1,8–2,0

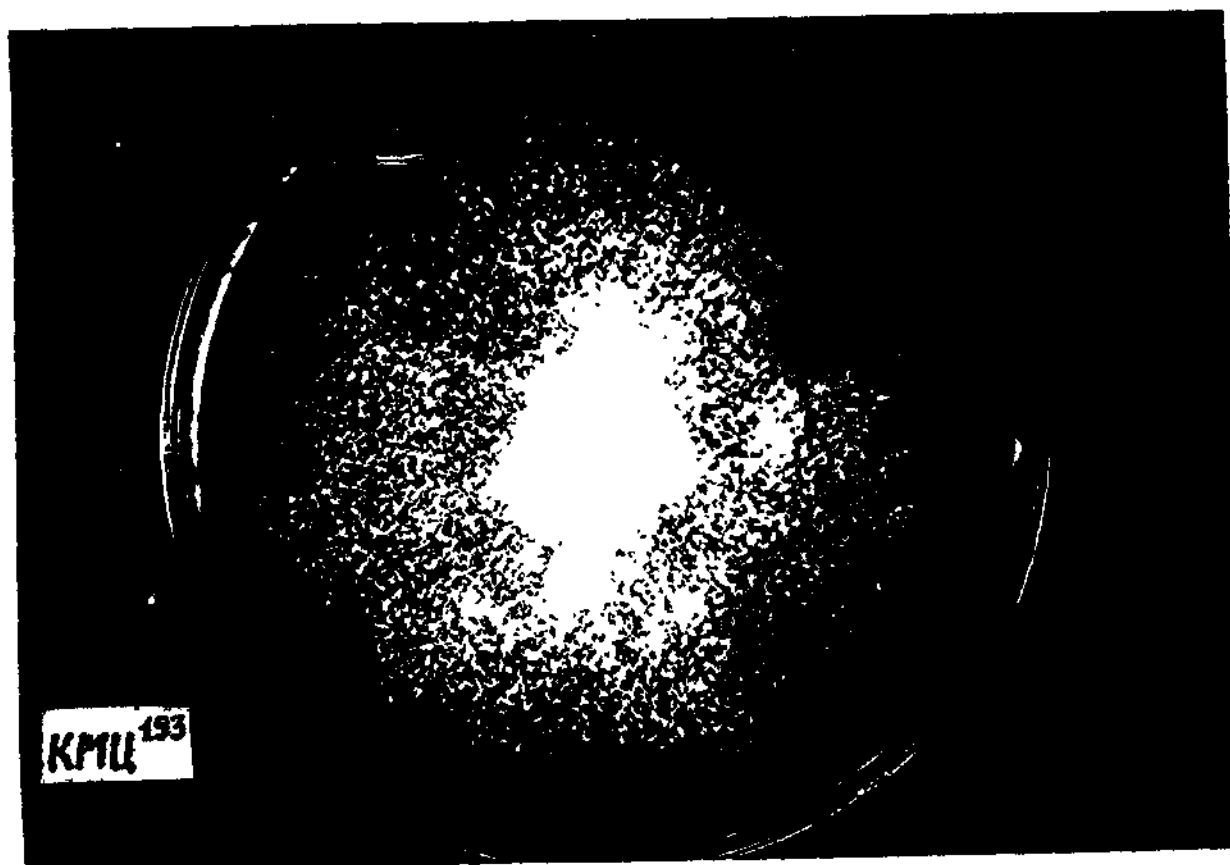
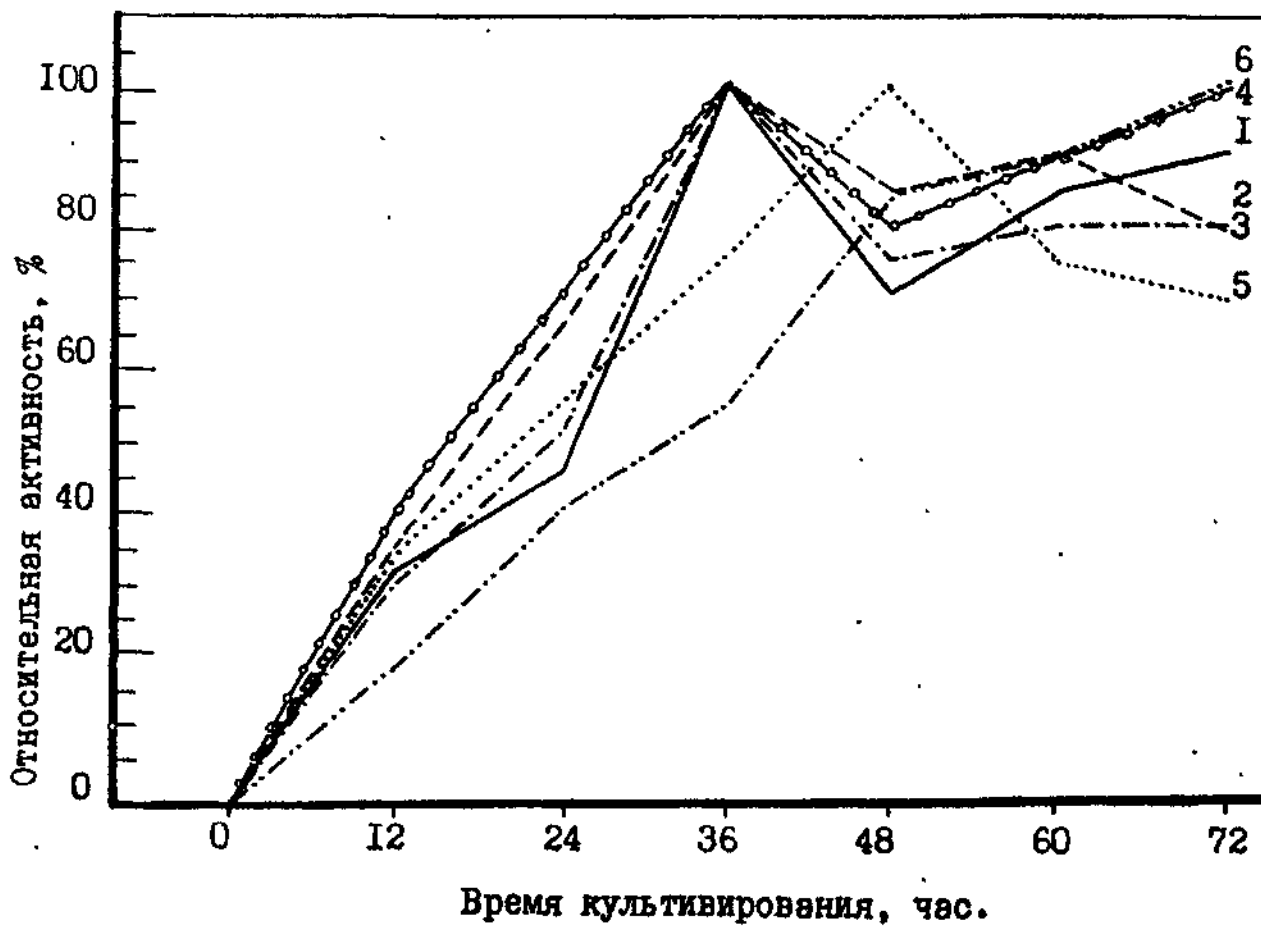


Рис. I



Условные обозначения: 1 - экзоглюканаз, 2 - эндоглюканаз I, 3 - эндоглюканаз II, 4 - целлобиоза, 5 - нуклеополимераза, 6 - белок (сырой протеин).

Рис. 2

Упорядник

Техред М.Келемеш

Коректор О.Кравцова

Замовлення 4489

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

