



(51) МПК
C12N 1/14 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010125306/10, 18.06.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 18.06.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.06.2010

(45) Опубликовано: 27.06.2011 Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: BURTSEVA YU.V. ET AL. O-
Glycosylhydrolases of Marine Filamentous Fungi: b-1,3- Glucanases of Trichoderma aureoviride // Applied Biochemistry and Microbiology, Vol.39, No. 5, 2003, p.475-481. BURTSEVA YU.V. ET AL. Filamentous marine fungi as producers of O-glycosylhydrolases. (β -1,3-Glucanase from Chaetomium indicum // Mar. Biootechnol. 2003. (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-т 100-летия
 Владивостока, 159, Учреждение Российской
 академии наук Тихоокеанский институт
 биоорганической химии ДВО РАН, зав.
 патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

**Пивкин Михаил Викторович (RU),
 Бурцева Юлия Валериевна (RU),
 Сова Виктория Васильевна (RU),
 Звягинцева Татьяна Николаевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Учреждение Российской академии наук
 Тихоокеанский институт биоорганической
 химии Дальневосточного отделения РАН
 (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)**

(54) **ШТАММ ГРИБА Trichoderma aureoviride Rifai - ПРОДУЦЕНТ 1,3- β -D-ГЛЮКАНАЗ**

(57) Реферат:

Штамм гриба Trichoderma aureoviride Rifai выделен из морского грунта, собранного на глубине 25 м в Южно-Китайском море. Депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под регистрационным номером ВКМ F-

4115D. Для выращивания штамма используют питательную среду, не содержащую сахаров. Штамм характеризуется высокой продуктивностью 1,3- β -D-глюканаз. Суммарный выход 1,3- β -D-глюканаз составляет 13,5-16 ед./мг белка. 1 табл.

(56) (продолжение):

Vol. 5. P.1-11. SOVA V.V. ET AL. b-1,3-Glucanase from Unfertilized Eggs of the Sea Urchin Strongylocentrotus intermedius. Comparison with (β -1,3-Glucanases of Marine and Terrestrial Mollusks // Biochemistry, Vol.68, No. 5, 2003, p.529-533.. BURTSEVA YU. ET AL Comparative characterization of laminarinases from the filamentous marine fungi Chaetomium indicum Corda and Trichoderma aureoviride Rifai // Journal of Applied Phycology (2006) 18:375-380.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 1/14 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010125306/10, 18.06.2010**

(24) Effective date for property rights:
18.06.2010

Priority:

(22) Date of filing: **18.06.2010**

(45) Date of publication: **27.06.2011 Bull. 18**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-t 100-letija
Vladivostoka, 159, Uchrezhdenie Rossijskoj
akademii nauk Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Pivkin Mikhail Viktorovich (RU),
Burtseva Julija Valerievna (RU),
Sova Viktorija Vasil'evna (RU),
Zvjagintseva Tat'jana Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk
Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii
Dal'nevostochnogo otdelenija RAN (TIBOKh
DVO RAN) (RU)**

(54) **Trichoderma aureoviride Rifai FUNGUS STRAIN - 1,3-β-D-GLUCANASE PRODUCER**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: *Trichoderma aureoviride* Rifai fungus strain is recovered from sea ground collected at depth 25 m in the South China Sea. It is deposited in the Russian National Collection of Microorganisms of G.K.Skryabin Institute of Microbial Biochemistry and Physiology of the Russian Academy of Sciences,

registration No. VKM F-4115D. The strain is cultivated with using a nutrient medium not containing sugars. Total yield of 1,3-β-D-glucanase is 13.5-16 units/mg of protein.

EFFECT: strain is characterised by high yield of 1,3-β-D-glucanase.

1 tbl, 2 ex

Изобретение относится к биотехнологии и касается нового штамма гриба - продуцента 1,3-β-D-глюканазы (ламинариназы).

Известен штамм *Acremonium persicinum*, продуцирующий 1,3-β-D-глюканазы [Pitson S.M., Seviour R.J., McDougall B.M. Effect of carbon source on extracellular (1→3)- and (1→6)-β-glucanase production by *Acremonium persicinum*. // Can. J. Microbiol. 1997. Vol.43. P. 432-439]. Недостатком известного штамма является низкий выход целевого продукта.

В качестве прототипа был выбран известный продуцент 1,3-β-D-глюканазы - штамм гриба *Chaetomium indicum*, поскольку этот штамм, как и заявляемый штамм, получают в культуре [Burtseva Yu.V., Verigina N.S., Sova V.V., Pivkin M.V., Zvyagintseva T.N. Filamentous marine fungi as producers of O-glycosylhydrolases: β-1,3-glucanase from *Chaetomium indicum*. // Mar. Biotechnol. 2003. Vol.5. P. 349-359]. К недостаткам известного штамма можно отнести его низкую продуктивность в отношении ферментов - 0,02 мг/л среды с удельной активностью 4,1±0,55 ед./мг белка.

В связи с тем, что 1,3-β-D-глюканазы представляют значительный интерес для получения глюкозы из природного сырья, содержащего β-D-глюканы, для разрушения клеточных стенок растений и микроорганизмов с целью более полной экстракции полезных веществ и для утилизации отходов микробиологических производств, ставится задача получения продукта с более высокой активностью фермента.

Поставленная задача решена выявлением нового штамма гриба *Trichoderma aureoviride*, эффективно продуцирующего 1,3-β-D-глюканазы.

Штамм *Trichoderma aureoviride* выделен из морского грунта, собранного на глубине 25 м в Южно-Китайском море, и хранится в Коллекции Морских Микроорганизмов (КММ) Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН под номером 4636.

Штамм *Trichoderma aureoviride* Rifai депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под регистрационным номером ВКМ F-4115D.

Штамм характеризуется следующими свойствами.

Культуральные и морфологические признаки.

Колонии, выращенные на среде Чапека, приготовленной на морской воде, со слабым белым ватообразным воздушным мицелием. Конидии желто-зеленые образуются на конидиеносцах, собранных в компактные подушечки. Обратная сторона колонии желтая. Конидиеносцы древовидно разветвленные. Фиалиды удлинено-кеглевидные, часто асимметричные, 7-15×2-2,5 мкм. Конидии яйцевидные, с усеченным основанием, 3-5×2-3 мкм, с каплями масла, желто-зеленые.

Колонии гриба при выращивании на среде «сусло-агар на натуральной морской воде» со слабым белым ватообразным воздушным мицелием. Конидальные подушечки от лимонно-салатных до желто-зеленых. Реверзум желто-коричневый. Микроскопические признаки те же, что и на среде Чапека.

Новый штамм продуцирует суммарное количество ферментов с активностью 13,5±0,55 ед./мг белка.

Физиолого-биохимические признаки.

Штамм хорошо растет и образует конидии как на агаризованных средах (картофельно-сахарозный (глюкозный), приготовленной на натуральной морской воде агар, агар Чапека), так и на жидких средах того же состава (в стационарной культуре и на качалке). На среде Чапека максимальный рост отмечен на среде с мальтозой, на втором месте по усвояемости находятся сахароза и глюкоза. Из источников азота лучше всего усваиваются нитрат натрия и пептон. Среди источников

углерода наибольшая интенсивность конидиообразования ($5,6-6,8 \times 10^5$ конидий/см²) отмечена на средах с мальтозой сахарозой и глюкозой. Однако наибольшая продуктивность конидиообразования зарегистрирована на средах с пептоном в качестве источников азота (таблица).

Таблица

Влияние источников азота и углерода на рост штамма <i>Trichoderma aureoviride</i> ВКМ F-4115D			
Источники азота	Диаметр колонии, мм на 7 сутки роста	Продуктивность конидиообразования, конидий/см ²	Морфолого-культуральные особенности колоний
Без сахаров	3,2±2,8	1,9×10 ⁵	Паутинистые, белые с желто-зелеными подушечками спороношения
Мальтоза	8,5±0,0	6,8×10 ⁵	Войлочные, травянисто-зеленые
Сахароза	7,3±1,3	5,9×10 ⁵	Войлочные, желто-зеленые
Глюкоза	6,8±2,3	5,6×10 ⁵	Войлочные, желто-зеленые
Лактоза	4,7±1,5	4,8×10 ⁵	Войлочные, желто-зеленые
Галактоза	5,7±1,3	3,9×10 ⁵	Войлочные, желто-зеленые
Маниг	4,6±2,3	4,6×10 ⁵	Войлочные, желто-зеленые
NaNO ₃	7,2±1,4	4,9×10 ⁵	Войлочные, желто-зеленые
Мочевина	6,9±2,5	3,2×10 ⁵	Войлочные, желто-зеленые
Пептон	7,4±1,8	7,2×10 ⁵	Войлочные, желто-зеленые
Аспарагин	5,6±1,2	4,6×10 ⁵	Войлочные, желто-зеленые
NH ₄ NO ₃	6,5±1,7	3,9×10 ⁵	Войлочные, желто-зеленые

Штамм хранится на картофельно-морковной среде (20 г картофеля, 20 г моркови, 1 л натуральной морской воды. 10 г агар-агара) под минеральным маслом [Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1990. - 240 с.]. Время пересева - раз в три года.

Технический результат штамма гриба *Trichoderma aureoviride* заключается в его более высокой продуктивности, что проявляется как в более высоком выходе целевого продукта, так и в большей активности фермента. Продуктивность этого штамма превосходит продуктивность известного грибного штамма более чем в три раза. Кроме того, преимуществом заявляемого штамма по сравнению с прототипом является то, что для его выращивания требуется среда с меньшим числом компонентов и, что особенно важно, не включает в себя сахаров. Затраты на сахара составляют основную статью расходов на выращивание культур в промышленных масштабах. Таким образом, производство штамма гриба *Trichoderma aureoviride* с экономической точки зрения более выгодно по сравнению с производством штамма-прототипа.

Новый штамм может использоваться для промышленного получения 1,3-β-D-глюканаз.

Исследования свойств и механизма действия 1,3-β-D-глюканаз, выделенных нами из культуральной жидкости и мицелия морского гриба *T. aureoviride*, показали, что они осуществляют глубокий гидролиз смешанных 1,3;1,6-β-D-глюканов с образованием монопродукта - глюкозы. Обе 1,3-β-D-глюканазы отнесены к ферментам экзотипа действия (1,3-β-D-глюкан-глюканогидролазы КФ 3.2.1.58). Молекулярная масса 1,3-β-D-глюканаз *T. aureoviride*, согласно данным гель-хроматографии, составляет 56 кДа.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Штамм *Trichoderma aureoviride* Rifai ВКМ F-4115D выращивают методом глубинного культивирования на питательной среде следующего состава:

неочищенный пластинчатый агар 2 г, пептон 1 г, дрожжевой экстракт 0,5 г, K_2HPO_4 1 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 г, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 г, натуральная морская вода 1 л.

Культивирование осуществляют при 22°C в колбах на качалке 180-200 об/мин в течение 168 часов.

5

Комбинацией методов ультрафильтрации, гидрофобной хроматографии на фенилсефарозе 6 Fast Flow и ионообменной хроматографии на 15 Q PE и 15 S PE (FPLC) с выходом $13,5 \pm 0,55$ ед./мг белка получают препараты 1,3- β -D-глюканаз, не содержащие сопутствующих O-гликозилгидролаз.

10

Пример 2. Штамм *Trichoderma aureoviride* Rifai ВКМ F-4115D выращивают методом глубинного культивирования на питательной среде следующего состава: сухие бурые водоросли 2 г, пептон 1 г, дрожжевой экстракт 0,5 г, K_2HPO_4 1 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 г, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 г, натуральная морская вода 1 л. Культивирование осуществляют при 22°C в колбах на качалке 180-200 об/мин в течение 168 часов.

15

Выделение 1,3- β -D-глюканаз проводят описанным в примере 1 способом. Суммарный выход 1,3- β -D-глюканаз составляет $16 \pm 0,55$ ед./мг белка.

Формула изобретения

20

Штамм гриба *Trichoderma aureoviride* Rifai ВКМ F-4115D - продуцент 1,3- β -D-глюканаз.

25

30

35

40

45

50