



УКРАЇНА

(19) UA (11) 55331 (13) C2
(51) МПК (2006)
C12N 1/14
C12P 23/00
C12R 1/645 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ (ТКС) BLAKESLEA TRISPORE IMB F-100022 - ПРОДУЦЕНТ В-КАРОТИНУ

1

(21) 20021210432
(22) 23.12.2002
(24) 17.07.2006
(46) 17.07.2006, Бюл. №7, 2006р.
(72) Тюренов Олексій Олександрович, Туриянський Юрій Давидович, Кунцинова Євгенія Олександрівна, Кунцинова Інна Сергіївна, Стенько Алла Степанівна, Безкоровайна Надія Карпівна, Горна Маргарита Степанівна
(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "НАУКОВО-ВИРОБНИЧЕ ПІДПРИЄМСТВО "ВІТАН"

2

(56) RU C2 2177505, 27.12.2001
RU C2 2177506, 27.12.2001
RU C1 2053301, 27.01.1996
EP 0587872, 31.05.2000
US 5422247, 06.06.1995
(57) Штам (ТКС) Blakeslea trispora IMB F-100022 - продуцент β-каротину, продуктивність якого складає 0,032-0,041 кг/м³/1год.

Винахід відноситься до медицини, різних галузей харчової промисловості та сільського господарства.

Найбільш активними природними антиоксидантами є пігменти каротиноїди, серед яких унікальним - β-каротин. Це антиоксидант №1 і найбільш біологічно активний: наявність спарених подвійних зв'язків С=С обумовлює поглинання вільних радикалів різного походження, захищаючи клітину від мутагенів і канцерогенів, іонізуючої радіації та хімічних сполук, знижує окислення ліпідів мембран та захищає від пошкодження мембранозв'язані ферменти, систему ендоплазматичного ретикулу, цитохром-459. β-каротин - імуномодулятор, має протизапальну дію, та володіє вітамінними властивостями.

В харчовій промисловості широко застосовується в таких галузях: кондитерській, м'ясомолочній, парфумерній, хлібобулочній та макаронній, як добавка в дитячому харчуванні. В сільському господарстві - як добавка в раціон молочного та відгодівлі м'ясного тваринництва, в птахівництві, пушному звіриводстві та рибоводстві.

β-каротин мікробіологічного походження біологічно виправданий (96%-98% β-каротину має найактивнішу транс-форму). Він не токсичний, що показано на тваринах різних видів. Стан дихальної, серцево-судинної системи, печінки, нирок - в нормі; стан крові за показниками: кількості гемоглобіну, еритроцитів, лейкоцитів, лейкоцитарній фор-

мулі, згортувальних здатностей крові за часом утворення фібрину, вмісту загального білку в сироватці крові в нормі. Кумулятивний ефект, тератогенні та ембріотоксичні дії відсутні.

Промислове виробництво β-каротину починалось із штамів 64(+) і 490(-) Blakeslea trispora. Активність цього штаму (за паспортом) становила 70000 -100000 од/100мл культуральної рідини. За характером росту штам відзначався "закочуванням" в шарики, що в значній мірі погіршувало масообмін і зниження активності.

Пізніше був одержаний штам 8А (+) і 8А (-), активність його була на 24% вище прототипу. Потім були селекціоновані штами К1 (+) і К1 (-); К2 (+) і К2 (-), що значно відрізнялись від штаму-прототипу. Активність їх була в 1,5-2 рази вище активності 8А (+) і 8А(-), а тривалість процесу біосинтезу з 112 годин скоротилась до 72 годин. Крім того, клітинна стінка цих штамів мала менше хітинів і була більш доступною до дії екстрагуючих β-каротин речовин, тобто вони були більш технологічними. Нарешті був отриманий штам ВСД-1, селекціонований за допомогою 30% олійної суспензії кристалічного β-каротину та рифампіцину -в концентрації 500мкг/мл. Штам мав вищу активність β-каротину на фоні деяких технологічних змін в процесі ферментації.

Традиційною оцінкою ефективності штаму є його біосинтетична активність, виражена в вагових одиницях цільового продукту на 100мл культури-

(13) C2

(11) 55331

(19) UA

льної рідини в г/л або в мг/100мл. Адже цей показник не зовсім відображає об'єктивну картину ефективності, і ряд важливих біотехнологічних показників залишались поза увагою. Зокрема не враховували здатність до накопичення біомаси та тривалості процесу біосинтезу, що суттєво впливає на кінцеві техніко-економічні показники промислового виробництва. В зв'язку з вище зазначеними та підвищеними вимогами кон'єктури зовнішнього ринку оцінка ефективності нових штамів зміщена в бік продуктивності штаму.

Наразі дійшли висновку, що основним критерієм оцінки нового штаму повинен бути показник продуктивності, що виражається в кілограмах (кг) цільового продукту, виробленого на одиницю геометричного об'єму ферментера (m^3) в одиницю часу (одна год): (кг/ m^3 /1год). Це можна представити формулою:

$$q = \frac{Q}{V \cdot \tau}, \text{ де}$$

Q - кількість β -каротину в висушеній біомасі, кг;
V - геометричний об'єм ферментера, m^3 ;
 τ - тривалість ферментації, год.

Штами ТКСТ (+) і ТКСТ (-) мають родослівну від K1(+) і K1 (-) і отримані шляхом селекції гриба за допомогою 20% діфеніламіну (м.м. 169,2 Sigma) з наступною обробкою натрієвою сіллю нікотинової кислоти 1000 - 1300мг/мл (м.м. 145,1 Sigma - Aldrich). Селекція проводилась паралельно на двох (+) і (-) статевих формах.

Штам має такі культурально - морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості:

(+) форма - з добре розвинутим повітряним міцелієм від сіруватого до жовтого кольору, субстратний міцелій добре розвинутий, щільний, жовтого кольору з інтенсивним спороношенням (стилоспорангії - 50-100мкм; спорангії - еліптично-шаровидні, 12-16 -10-14мкм, трьохспорові; спорангіоспори - еліптичні, 14-18мкм світло-тютюнового кольору з подовженою смугастістю.

(-) форма - повітряний міцелій розвинутий, жовтуватого кольору; субстратний міцелій щільний, має інтенсивний жовтий до помаранчового колір. Спороношення менш виражене ніж у (+) статевої форми.

При сумісному вирощуванні (+) і (-) статевих форм на чашках Петрі на місцях дотику субстратний міцелій має широку (3-3,5см) зону інтенсивного помаранчевого до помаранчо - малинового кольору з відсутніми фенотиповими ознаками статевої взаємодії (Zyg⁻) та яскраво вираженими ознаками (Car⁺).

При глибинному культивуванні міцелій має велику кількість плодівих виростів, добре розвинений з характерним апікальним ростом (фізіологічно активна культура). Міцелій заповнений жовтими краплями β -каротину, розчиненого в жиру, та кристалами β -каротину. Міцелій добре фарбується

метиловим синім: молода культура - синього кольору, стара - темно-синього.

Оптимальними живильними середовищами є сусло - агар та 5-6% кукурудзяний агар; гірше росте на муковому агарі, середовищі Чапека, МПА. Для глибинного культивування використовуються посівні та ферментаційні середовища наступного складу, відповідно в (%):

мука соєва	2,3
мука кукурудзяна	4,7
KH ₂ PO ₄	0,05
вітамін В ₁ (тіамін)	0,0002
вода водопровідна	
pH = 6,2-6,4	
зелена патока	2,5-4,5
кукурудзяний екстракт	4,0-8,0
олія	3,0-5,0
вода водопровідна	
pH = 6,2-6,4	

Режим стерилізації середовищ в автоклаві при температурі 120-122°C 40 хвилин.

Посівні середовища розливаються в колби ємністю 750мл по 150мл для (+) форм, засіваються і вирощуються 48 год на качалках (200-240об/хв) при 28°C. Після цього визначається накопичення біомаси, і в залежності від нього в співвідношеннях 1:1,5-1:9 засіваються ферментаційні середовища. Ферментаційні середовища розливаються також в 750 мл колби в кількості 50мл і вирощуються в таких же умовах. Активності визначались на ФЕКу - 56М, КФЛ -УХЛ - 42; КФК - 3 при синьому світофільтрі ($\lambda=451nm$) в кюветах 1см. Біомаса фільтрувалась, промивалась і висушувалась. Продуктивність визначалась за формулою, що наведена раніше.

Таблиця

Приклади одержаних результатів в, промисловому виробництві (дані 10 операцій), q, кг/ m^3 /1год

Штам прототип	Штам ТКСТ
0,01	0,034
0,0089	0,035
0,011	0,039
0,013	0,041
0,016	0,036
0,018	0,037
0,005	0,039
0,008	0,037
0,012	0,032
0,011	0,036

Отже, одержані результати в промисловому виробництві на штамі ТКСТ свідчать, що продуктивність його складає від 0,032 до 0,041кг/ m^3 /1год, що в 3-3,5 рази перевищує продуктивність штаму прототипу (0,011-0,018кг/ m^3 /1год).