



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **27514** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 1/16
C12R 1/645 (2006.01)
C12P 23/00
C07C 403/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ ДРІЖДЖІВ PHAFFIA RHODOZYMA ІМВ Y-5026 - ПРОДУЦЕНТ КАРОТИНОЇДУ АСТАКСАНТИНУ

1

2

(21) u200703848

(22) 06.04.2007

(24) 12.11.2007

(72) ВЛІЗЛО ВАСИЛЬ ВАСИЛЬОВИЧ, UA, ШАХ ЄВГЕН СТЕПАНОВИЧ, UA, КАПЛІНСЬКИЙ ВАСИЛЬ ВАСИЛЬОВИЧ, UA, КАМІНСЬКА МАРТА ВОЛОДИМИРІВНА, UA, БОРЕЦЬКА НАТАЛІЯ ІВАНІВНА, UA, КОЛІСНИК МАР'ЯНА ІВАНІВНА,

UA, НЕЧАЙ ГАЛИНА ІГОРІВНА, UA, ГУРАЛЬ СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА, UA

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УААН, UA

(56)

(57) Штам дріжджів *Phaffia rhodozyma* ІМВ Y-5026 - продуцент каротиноїду астаксантину, який синтезує 14-16 г астаксантину/кг сухої маси клітин.

Корисна модель відноситься до біотехнології і мікробіологічної промисловості, а саме до штамів, які є продуцентами каротиноїдів, зокрема, астаксантину. Новий штам може бути використаний в сільському господарстві, медицині, ветеринарії, косметології, харчовій промисловості та інших галузях народного господарства.

Відомі дріжджі і нижчі гриби, які використовують в годівлі с/г тварин з метою збагачення раціонів білково-вітамінними речовинами, зокрема:

- дріжджі *Candida krusei* ВКПМ Y-398 - продуцент кормового білку [АС СССР №1387396 C12N 1/16 \ (C12N 1/16, C12R 1:72)]

- дріжджі *Candida parapsilosis* ВСБ-908-продуцент білкової біомаси [АС СССР №925114 C12N 15/00]

- дріжджі *Hansenula polymorpha* - продуцент білку на гідролізованих рослинних субстратах [АС СССР №1405297 C12N 1/16, C12N 1/22 \ (C12N 1/16, C12R 1:78)]

- гриби *Penicillium jensenii* - продуцент білково-ферментного концентрату [АС СССР №1427818 C12N 1/14, 1/22 \ (C12N 1/14, C12R 1:80)] - гриби *Aspergillus carbonarius* - продуцент білково-ферментного комплексу [АС СССР №1400062 C12N 1/14, A23J 1/18]

- дріжджі *Rhodotorula glutinis* - продуцент каротиноїдів [АС СССР C12N 001/16 C12P 023/00]

Недоліком вказаних штамів мікроорганізмів є нездатність їх до синтезу високих концентрацій каротиноїдів, в тому числі й астаксантину.

Найбільш близьким по суті до штаму, що заявляється є штам дріжджів *Phaffia rhodozyma* ІМВ Y 5021 з колекції Інституту біології тварин УААН, який синтезує 0,8-1,0 мг каротиноїдів/г сухої маси. Недоліком цього штаму є низька продуктивність за ознакою синтезу каротиноїдів.

Заявлений нами штам дріжджів забезпечує надсинтез каротиноїдів в 20-25 разів більше порівняно з штамом *Phaffia rhodozyma* ІМВ Y-5021 і нагромаджує 20-25 мг каротиноїдів/г сухої маси, 67% яких складає астаксантин.

В основу корисної моделі покладено завдання: селекціонувати високопродуктивний штам дріжджів *P. rhodozyma*, який здатний синтезувати і нагромаджувати в клітинах високі концентрації каротиноїдів, в тому числі й астаксантину.

Одержаний штам *P. rhodozyma* ІМВ Y-5026 синтезує 20-25 мг каротиноїдів/г сухої маси (67% з них складає астаксантин) при нагромадженні біомаси 3-4 г/л середовища.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості селекціонованого штаму:

Веgetативні клітини штаму, вирощені в рідкому середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 - 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; сахароза - 15; пивне сусло - 20; дріжджовий екстракт - 2; біотин - 2×10^{-6} при 20°C мають еліпсоїдну форму, розміром 3,6-7,5x5,5-10,5 мкм,

(13) **U**
(11) **27514**
(19) **UA**

містяться поодинокі, парами, інколи короткими ланцюжками чи невеликими гронами, в товщі агару утворюють псевдоміцелії. На агаризованому середовищі колонії віком 7 діб круглі, розміром 3-4мм, профіль припіднятий, поверхня гладка матова, інтенсивного червоно-оранжевого кольору.

На скошеному сусло-агарі 3-х добовий штрих гладкий, матовий, червоно-оранжевого забарвлення.

Клітини штаму асимілюють сахарозу, мальтозу, рафінозу, проте не використовують лактозу і гліцерол. При культивуванні в середовищі вищевказаного складу, температурі 20°C і аерації 0,6л повітря/л середовища на ферментері АНКУМ - 2М спостерігається дві фази росту: перша - дихальна-ферментативна, під час якої утворюється етанол і друга - дихальна фаза росту, коли використовується етанол, утворений у першій фазі росту. Біомаса клітин на четверту добу вирощування досягає 4г/л. Каротиноїди синтезуються протягом усього періоду культивування, однак найбільша їх кількість синтезується у дихальній та стаціонарній фазах.

Як джерело азоту клітини використовують сульфат амонію, діамоній-фосфат, сечовину але не нітрат калію і етиламін.

Відношення до кисню. Штам *P. rhodozyma* IMB Y-5026 відноситься до факультативних аеробів.

Штам росте при температурі 18-26°C, оптимум температури 20°C, оптимум pH становить 4,0-6,0.

Штам зберігається на агаризованому сусло-агарі в холодильнику. Клонується 2 рази на рік і відсівається 3-4 клони на 7-10 день вирощування.

Каротиноїди є важливим компонентом неферментативної системи антиоксидантного захисту в організмі тварин. Особливої уваги заслуговує астаксантин, антиоксидант, який є ефективнішим у 10-12 раз ніж β-каротин і в 500 раз, порівняно з вітаміном Е. Астаксантин захищає клітини організму від пошкоджуючої дії активних форм кисню, вільнорадикального окислення поліненасичених жирних кислот, білків, нуклеїнових кислот, що приводить до передчасного старіння, серцево-судинних захворювань, атеросклерозу та інших захворювань. Астаксантин у невеликих кількостях міститься у деяких видів риб, ракоподібних та водоростей Гематококкус. Дослідження вчених США, Японії та Канади свідчать про пряму залежність між рівнем споживання астаксантину і зниженням рівня онкологічних, серцево-судинних захворювань, а також підвищенням стійкості до вірусних бактерійних і грибкових інфекцій. Захисні властивості астаксантину направлені на посилення імунної системи за рахунок підвищення активності Т-лімфоцитів та синтезу γ-інтерферону. Астаксантин, виділений з біомаси дріжджів може використовуватися в медицині і ветеринарії, як сильний антиоксидант, з метою профілактики і лікування онкологічних та нейродегенеративних захворювань, захисту від ультрафіолетових та рентгенівських променів. Одержані з його допомогою каротиноїди і астаксантин можуть бути застосовані як харчові добавки, а також для

розробки лікувальних препаратів у ветеринарії і медицині.

Селекціонований нами штам *P. rhodozyma* IMB Y-5026, клітини, якого містять 14-16мг астаксантину/г сухої маси можна використовувати при промисловому виробництві дріжджів з метою створення кормових препаратів каротиноїдів, також для розробки антиоксидантних рецептур для корекції оксидативного стресу, який виникає при різних патологічних станах.

Приклади конкретного використання

Одержання штаму.

Штам дріжджів *P. rhodozyma* 1MB Y-5026 був одержаний з штаму *P. rhodozyma* IMB Y-5021, який синтезує 0,8-1,0мг каротиноїдів/г сухої маси, шляхом ступінчастого мутагенезу з наступним відбором найпродуктивніших клонів.

Для індукції мутацій у дріжджів хімічним мутагеном суспензію двохдобової культури (3×10^6 кл/мл) обробляли 0,02%-ним розчином N-метил-N-нітро-N-нітрозоганідину при температурі 23°C та постійному перемішуванні протягом 10 хвилин. Дію мутагена зупиняли центрифугуванням і наступним відмиванням дистильованою водою. Суспензію оброблених клітин висівали на чашки Петрі з сусло-агаром та вирощували у термостаті при 20-22°C протягом 7 діб.

Відбирали колонії інтенсивного оранжевого кольору і найпродуктивніші клони піддавали наступному мутагенезу шляхом обробки 0,02% розчину нітрозоганідину. Одержаний таким способом штам *P. rhodozyma* IMB Y-5026 синтезує і нагромаджує в клітинах 25-30мг/г сухої маси каротиноїдів. Екстракцію каротиноїдів із сирової біомаси проводили 96% етанолом.

Каротиноїди переводили у гексан та упарювали під струменем інертного газу. Сухий залишок розчиняли в хлороформі. Фракційний склад каротиноїдів визначали методом тонкошарової хроматографії, використовуючи систему розчинників петролейний ефір: діетиловий ефір (2:1). Як свідок використовували астаксантин (Sigma). Електронні спектри поглинання суміші та окремих фракцій пігментів записували на реєструвальному двохвильовому спектрофотометрі „Specord M-40”.

При розділенні суміші каротиноїдів встановлено, що екстракт каротиноїдів біомаси, вирощеної на синтетичному середовищі, складається з двох фракцій каротиноїдів, ідентифікованих як астаксантин, один з найсильніших природних антиоксидантів, та фоенікоксантин. На астаксантин припадає 66,7% від загальної кількості каротиноїдів (табл.1).

Фракційний склад каротиноїдів біомаси дріжджів *P. r*

Середовище	Загальний вміст каротиноїдів, мг/г сухої маси	% фракції від загальної кількості	Максимальна поглиненість фракції
Синтетичне	23,4±2,0	33,3 66,7	47 47
Синтетичне	32,9±2,80	33,3	46

+ патока (7%)		22,2 44,5	478,7 476,8	фоенікоксантин астаксантин
------------------	--	--------------	----------------	-------------------------------

Екстракт каротиноїдів із біомаси клітин, вирощених у середовищі з додаванням зеленої патоки, складається з трьох фракцій. Крім виявлених фракцій атаксантину та фоенікоксантину з'являється фракція з максимумом поглинання 465,9нм, ідентифікована нами як каротини. Поява нової фракції викликана присутністю у зеленій патоці деяких попередників каротинів, що зсувають шляхи каротиногенезу в бік утворення саме цих каротиноїдів.

Слід відмітити, що вміст атаксантину у біомасі дріжджів, вирощених на середовищі з добавкою зеленої патоки, складає 44,5%, що становить 14,6мг/г сухої маси, а на синтетичному середовищі відповідно 66,7% і 15,6мг/г сухої маси.

Штам дріжджів *P. rhodozyma* IMB Y-5026 пройшов лабораторне випробовування. При лабораторній перевірці одержаного штаму визначали показники біомаси в порівнянні до вихідного штаму і кормових дріжджів.

Приклад: Дріжджі вирощували в середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 - 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; сахароза - 15; пивне сусло - 20; дріжджовий екстракт - 2; біотин - 2×10^{-6} при температурі 20°C і аерації 0,6л повітря/л середовища на ферментері АНКУМ - 2М протягом 4-х діб при температурі 20°C Каротиноїди в екстрактах клітин визначали колориметричним методом. Порівняння складу якості біомаси кормових дріжджів і дріжджів *P. rhodozyma* вихідного і селекціонованого штамів приведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняльна характеристика біомаси кормових і каротинсинтезуючих дріжджів *Phaffia rhodozyma* вихідного та селекціонованого штамів

Показники	Дріжджі		
	Кормові	<i>P. rhodozyma</i> IMB Y-5021	<i>P. rhodozyma</i> IMB Y-5026
Сирий протеїн, %	44,2	24,6±0,15	23,8±0,05
Сирий жир, %	3,3	17,9±0,05	17,5±0,20
Сира клітковина, %	3,4	3,3	3,3
Каротиноїди, г/кг	сліди	0,8-1,0	23-32
Атаксантин, г/кг	не виявлено	0,5-0,6	14-16
Коефіцієнт перетравності, %	90,8	89,7	90,6

Як видно із даних таблиці, селекціонований штам дріжджів *P. rhodozyma* IMB Y-5026 нагромаджує в клітинах 25-30мг/г сухої маси каротиноїдів, що в 30 раз перевищує вміст цих речовин в клітинах вихідного штаму *P. rhodozyma* IMB Y-5021. Вміст атаксантину у біомасі селекціонованого штаму становить 16-20г/кг.

Штам дріжджів *P. rhodozyma* IMB Y-5026 зберігається в депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України.