



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30576 (13) C2
(51) 6 C12N1/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПРОДУЦЕНТ ФІТОГОРМОНІВ АУКСИНОВОГО ТИПУ

1

2

(21) 96031054

(22) 20.03.1996

(24) 15.04.2002

(46) 15.04.2002, Бюл. № 4, 2002 р.

(72) Антонюк Владислав Петрович, Башмакова
Світлана В'ячеславівна, Євницька Галина
Сергіївна, Кошель Михайло Іванович, Яворська
Вікторія Казимірівна, Драгозов Ігор Володимиро-

вич

(73) Український науково-дослідний інститут спир-
ту і біотехнології продовольчих продуктів

(56) Авторське свідоцтво СРСР №1098279

(57) Применение штамма бактерий *Pseudomonas*
stutzeri ВКПМ В-4792 в качестве продуцента фито-
гормонов.

Изобретение относится к микробиологической промышленности и может быть использовано для микробиологического синтеза фитогормонов.

Известны продуценты фитогормонов, в частности, цитокининов, которые продуцируются культурами *Pseudomonas savastanoi* (Surico L. Cytokininlike activity in extractes from culture filtrates of *Pseudomonas savastanoi* "Experientia", 1975, 31, 8, P.829 - 930), *Calotrix*, *Nostoc*, *Synechocystis*, *Anabaena* (Романова Н.И. и др. Природные и мутантные штаммы цианобактерий - стимуляторы роста растений, Тезисы конференции "Интродукция микроорганизмов в окружающую среду", 1994, С.87 - 87).

Известен также штамм *Pseudomonas stutzeri* 136 (Мишке И.В., Тевелева М.К. Институт микробиологии им. Августа Кирхгештейна, АС. СССР №1098279, С 12 N 1/00), синтезирующий фитогормоны только цитокининового типа.

При выращивании штамма *Pseudomonas stutzeri* 136 на агаризованной минеральной среде выход целевого продукта составляет 4,5мкг/г СВ.

Причиной, препятствующей дальнейшему использованию штамма *Pseudomonas stutzeri* 136 для получения фитогормонов, является наряду с низкой биосинтетической активностью, образование им фитогормонов только цитокининового типа.

Задачей изобретение является расширение арсенала продуцентов фитогормонов, прежде всего, способных продуцировать фитогормоны ауксинового типа.

Технический результат от реализации изобретения - увеличение выхода целевого продукта за счет повышенной биосинтетической активности штамма-продуцента и продуцирования фитогор-

монов ауксинового типа.

Достигается технический результат применением штамма *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 в качестве продуцента фитогормонов ауксинового типа.

Штамм *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 имеет специфические физиологические свойства, обеспечивающие синтез фитогормонов при высокой удельной скорости роста на средах, содержащих сточные воды спиртовых и дрожжевых заводов.

Штамм *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 отселектирован в производственных условиях Лужанского экспериментального завода при получении микробной биомассы на отходах спиртовой промышленности - послеспиртовой мелассной барде.

Отселекционированный штамм наряду с другими микроорганизмами, применяемыми в спиртовой технологии, а также для очистки и доочистки сточных вод спиртового производства (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Torulopsis pinus*, *Trichosporon cutaneum*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Azomonas species*), а также цианобактерия *Spirulina platensis* исследовали в институте физиологии и генетики растений АН Украины на способность синтезировать регуляторы роста растений (цитокинины и ауксины).

Определение фитогормонов осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии и спектроденситометрии. Биотесты проводили на чувствительных культурах (кресс-салат и др.). Результаты исследований приведены в табл. 1.

(13) C2

(11) 30576

(19) UA

Таблица 1

Продуценты	Фитогормоны, мкг/г СВ		
	Ауксинового типа	Цитокининового типа	
		Зеатин	Зеатинрибозид
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	1,6	2,0
<i>Candida utilis</i> Л-35	-	1,1	0,9
<i>Azomonas species</i> ВКПБ В-4685	-	-	1,1
<i>Torulopsis pinus</i> Л-30	0,1	0,6	0,8
<i>Trichosporon cutaneum</i> Л-52	0,3	1,9	1,7
<i>Spirulina platensis</i>	3,2	1,9	2,7
<i>Pseudomonas mendocina</i> ВКПМ В-4145	2,7	2,9	1,3
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> ВКПМ В-4684	3,5	6,1	5,5
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ВКПМ В-4792	13,8	31,1	51,2

Из данных таблицы видно, что наибольшей синтезирующей способностью в отношении как цитокининов, так и ауксинов обладает штамм *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792

Именно это свойство указанного штамма позволило использовать его как продуцент фитогормонов ауксинового типа.

Культурально-морфологическая характеристика.

При выращивании в течении 24 часов на жидкой питательной среде (послеспиртовая барда 7% СВ, меласса - 10г/дм³, мочевины - 1,3г/дм³, ортофосфорная кислота - 0,85см³/дм³, дрожжевой автолизат - 10см³/дм³, рН среды - 7,0), при температуре 34 - 36°C, культура образует подвижные Грамположительные палочки средних размеров, иногда вытянутые в длинные клетки - нити, длина которых превышает ширину более, чем в 25 - 30 раз.

После 48 часов роста при температуре 34 - 36°C на твердой питательной среде - мясопептонном агаре (МПА): мясной бульон, пептон 10г/дм³, агар-агар-20г/дм³ - культура дает штрих желтовато кремового цвета, плоский, со слегка извилистым краем, мелко-бугристой блестящей поверхностью.

Колонии на МПА слегка сферические, с ровным краем, гладкой пористой поверхностью, мягкой консистенции.

Физиолого-биохимическая характеристика

В качестве единственного источника углерода культура ассимилирует глюкозу, трегалозу, L-валин. Не ассимилирует 2-кетоглюконат, мезоинозит, β-анилин, DL-аргинин.

Рост на среде Эшби отсутствует. Дает хороший рост на среде с (NH₄)₂SO₄, использует бетаин. Облигатный аэроб.

Культура не разжижает желатин, не вызывает изменения молока, гидролизует крахмал, способная расти при 41°C.

Технологические и продуктивные свойства

штамма иллюстрируются следующим примером.

Пример. Штамм *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 хранят на твердой питательной среде следующего состава: послеспиртовая барда - 7% СВ, меласса - 10г/дм³, мочевины - 1,3г/дм³, ортофосфорная кислота - 0,85см³/дм³, дрожжевой автолизат - 10см³/дм³, агар-агар - 20г/дм³, рН среды - 7,0, а также на мясопептонном агаре и мясопептонном бульоне (МПА, МПБ).

Для размножения культуры используют жидкую питательную среду следующего состава: послеспиртовая барда - 7% СВ, меласса - 10г/дм³, мочевины - 1,3г/дм³, ортофосфорная кислота - 0,85см³/дм³, дрожжевой автолизат - 10см³/дм³, рН среды - 7,0.

Разведение посевного материала из музейных культур, хранящихся на твердых питательных средах, осуществляют в дальнейшем на жидких средах в колбах на качалке и аппаратах чистой культуры (АЧК).

В качестве питательной среды используют послеспиртовую барду с 7% СВ, обогащенную источниками азота и фосфора (в соответствии с технологическим регламентом). Температура выращивания в АЧК - 37°C.

Процесс выращивания посевного материала прекращают при достижении рН среды 7,5 и накоплении биомассы 40г/дм³ по АСВ. Далее разведение ведут в промышленных ферментерах при тех же параметрах. Полученную массу направляют на выделение фитогормонов. Фитогормоны экстрагируют из культуральной жидкости водно-спиртовым раствором и затем подвергают микрофильтрации. Очищенную фракцию упаривают, высушивают и сухой продукт проверяют на биологическую активность.

Данные по количественному содержанию фитогормонов у штаммов *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ 136 (прототип) и *P. stutzeri* ВКПМ В-4792 представлены в таблице 2.

Таблица 2

Продуценты	Фитогормоны, мкг/г СВ		
	Ауксинового типа	Цитокининового типа	
		Зеатин	Зеатинрибозид
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 136	-	1,01	3,5
<i>P. stutzeri</i> ВКПМ В-4792	13,8	31,11	51,2

Из данных таблицы видно, что применение штамма *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 для получения фитогормонов ауксинового типа с одновременным в 15 - 30 раз повышенным содержанием фитогормонов цитокининового типа является оправданным и высокоэффективным по содержанию продуцируемого им целевого продукта.

Суммарное содержание фитогормонов в штамме *Pseudomonas stutzeri* 136 составляет - 4,5мкг/см³ СВ, а в штамме *Pseudomonas stutzeri*

ВКПМ В-4792 - 96,1мкг/см³. Таким образом, указанный штамм бактерий характеризуется повышенным содержанием фитогормонов (в 25 раз по сравнению с прототипом), что дает возможность использовать его в качестве продуцента фитогормонов.

Концентрат фитогормонов, полученный при выращивании штамма *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792, не токсичен и не патогенен для растительных и животных организмов.

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сім'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71