



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 90403

(13) C2

(51) МПК (2009)

C12P 39/00

C12N 1/06

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІЛКОВО-ВІТАМІННОГО ПРОДУКТУ НА ОСНОВІ ГРИБІВ FUSARIUM SAMBUCINUM IMB F-100011 І MYCELIA STERILIA (WHITE) IMB F-100014

1

2

(21) а200814529

(22) 17.12.2008

(24) 26.04.2010

(46) 26.04.2010, Бюл.№ 8, 2010 р.

(72) ДОНЧЕНКО ГЕОРГІЙ ВІКТОРОВИЧ, ПАРХОМЕНКО ЮЛІЯ МИХАЙЛІВНА, СУПРУН СВІТЛАНА МИХАЙЛІВНА, КУЧМЕРОВСЬКА ТАМАРА МУРАТІВНА, ХАРКЕВИЧ ОЛЕНА СИГІЗМУНДІВНА, КУРЧЕНКО ІРИНА МИКОЛАЇВНА, АРЕТИНСЬКА ТЕТЯНА БОРИСІВНА

(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДИНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОННОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) UA C2 49548, 15.12.2004.

UA A 10494, 25.12.1996.

RU C2 2259209, 27.08.2005.

UA C1 15475, 26.02.1999.

RU C2 2286066, 27.10.2006.

RU C1 2268620, 27.01.2006.

RU C1 2092179, 10.10.1997.

WO A1 2007027121, 08.03.2007.

(57) 1. Спосіб одержання білково-вітамінного продукту на основі грибів шляхом одержання іноку-

люмів двох штамів грибів та їх сумісного культивування при співвідношенні 1:1 в умовах аерації зі специфічною термічною обробкою та наступним виділенням продуктів культивування, який **відрізняється** тим, що сумісно культивують два нові штами-продуценти - *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 (вітамінний продуцент) та *Mycelia sterilia* (white) F-100014 (білково-ферментний продуцент).2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що культивування проводять протягом 44-46 годин.3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що після фільтрації до рідкої фракції додають висівки у об'ємному співвідношенні 2:1 та висушують.4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при сумісному культивуванні двох штамів *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 та *Mycelia sterilia* (white) IMB F-100014 утворюється біомаса грибів із підвищеним вмістом вітамінів - B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>9</sub>, E, Q<sub>10</sub>, у порівнянні з використанням відповідних монокультур.5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що можливе одержання трьох білково-вітамінних продуктів: твердого, рідкого та наповненого висівками.

Винахід відноситься до біотехнології, а саме, до способу одержання білково-вітамінного продукту, який може бути використаний у харчовій промисловості, сільському господарстві та косметології.

Відомо спосіб для одержання білково-вітамінного препарату на основі спільного культивування двох видів продуцентів - *Fusarium sambucinum* ВКМ F-139 і *Rhodotorula gracilis* V-1724 із вмістом каротиноїдів 8,7-10,46мг/л [UA, 10494, 25.12.96]. Недоліком цього способу є низька біологічна цінність білково-вітамінного продукту, що пов'язано з відсутністю незамінних амінокислот, найбільш важливих вітамінів, за виключенням присутнього в препараті β-каротину та підвищено-

го вмісту нуклеїнових кислот за рахунок використання дріжджової культури.

Відомо спосіб виділення нуклеїнових кислот з біомаси дріжджів, де використовують спеціальні методи обробки [US, 43304664, 18.05.82; RU, 462500, 10.05.2000], які відсутні в наведеному вище способі. Недоліком даних о методів є тривалість процесу ферментації (72 години та більше).

Відомо спосіб одержання білково-вітамінного кормового продукту на основі спільного культивування мезофільного штаму *Fusarium sambucinum* ВКП-Р-199 - продуцента пектолітичних ферментів і комплексу водорозчинних вітамінів і термофільного штаму - *Thielavia terrestris* ВКПМ F-308 - продуцента білка [A.c. СРСР, 1389038, 15.12.87]. Недоліком даного способу є невисока біологічна цінність

(13) C2

(11) 90403

(19) UA

кормового продукту, незначний вміст водорозчинних і жиророзчинних вітамінів, відсутність каротиноїдів, убіхінону та інших біологічно активних речовин, у тому числі хітину та його похідних, а також досить значна тривалість процесу ферментації (до 72 годин) та значні енергетичні витрати за рахунок використання в способі термофільного продуцента.

Відомо штам - *Fusarium sambucinum* ВКПМ F-867 - продуцент комплексу біологічно активних речовин, для одержання яких рекомендовано використовувати поживне середовище, яке містить молочну сироватку [RU, 2259209, 20.08.2004]. Недоліком цього способу є використання дефіцитної в харчовій промисловості молочної сироватки, витрати на її попередній гідроліз, тривалість процесу вирощування посівного матеріалу. В отриманому продукті низький вміст білка та деяких вітамінів, відсутність ряду коферментів, у тому числі убіхінону Q<sub>10</sub>, хітину та його похідних, а також інших важливих біологічно активних речовин.

Найбільш близьким аналогом до способу, що заявляється, є спосіб одержання хітинвмісного вітамінного препарату на основі грибів шляхом спільного культивування двох штамів грибів *Fusarium sambucinum* ВКПМ F-139 - продуцента вітамінів з високим вмістом тіаміну, біотину, нікотинової кислоти та хітину (12-14,3%) та *Penicillium sclerotiorum* IMB F-100015 - продуцента каротиноїдів (1-2мг/г) [UA, 49548 15.12.2004].

Процес культивування передбачає одержання посівного матеріалу (1 стадія) і ферментації (2 стадія), яку ведуть на середовищі Чапека, що містить як джерело вуглецю відходи цукрового виробництва (1%-ну мелясу), в умовах аерації при температурі 24-26°C з одночасним засівом двох штамів грибів *Fusarium sambucinum* ВКПМ F-139 та *Penicillium sclerotiorum* IMB F-100015, (при співвідношенні 1:1), протягом 48-60 годин. Після закінчення ферментації проводять термічну обробку отриманої суміші протягом 50-55 хвилин і в подальшому розділяють на рідку та тверду фазу шляхом фільтрації. В рідкому або висушеному стані отримана хітинвмісна вітамінна добавка може бути використана як кормова. Недоліком цього способу є невисока біологічна цінність одержуваного препарату, який характеризується незначним вмістом водорозчинних та жиророзчинних вітамінів, відсутністю ряду найбільш важливих вітамінів (фолієвої кислоти (B<sub>9</sub>), E та B<sub>12</sub>), похідних нікотинової кислоти (НАД), а також коензиму А, мікроелементів, есенціальних жирних кислот, низьким вмістом білка (36,4%), тривалістю процесу ферментації (2-стадія до - 60 годин).

В основу винаходу поставлено задачу розробки способу для одержання високоякісного білково-вітамінного продукту на основі нових штамів грибів з високим вмістом вітамінів та скороченням тривалості процесу ферментації.

Поставлена задача вирішена тим, що в способі, який заявляється, застосовується сумісне культивування двох нових видів штамів-продуцентів: *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 - білково-вітамінного продуцента з широким спектром вітамінів, у тому числі з високим вмістом нікотинової

кислоти (вітаміну B<sub>3</sub>) та її похідних, біотину (вітаміну B<sub>7</sub>), убіхінону (Q<sub>10</sub>), каротиноїдів і штаму *Mycelia sterilia* (white) IMB F 100014 - білково-ферментного продуцента, з високим вмістом білка [Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України, реєстраційний номер - *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 від 04.06.1998. Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України, реєстраційний номер - *Mycelia sterilia* (white) IMB F 100014 від 08.07.2001].

У результаті сумісного і культивування штамів-продуцентів *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 і *Mycelia sterilia* (white) IMB F 100014 забезпечується значне збагачення одержуваного білково-вітамінного продукту біологічно активними речовинами, в тому числі вітамінами, білком, ненасиченими жирними кислотами, мікроелементами.

Отриманий заявленим способом продукт характеризується високим вмістом білка (52,0-54,0%), ліпідів (4,4-4,6%), вітамінів (у мкг/г: тіаміну (B<sub>1</sub>) - 25,0-30,0, B<sub>3</sub> - 800,0-1200,0, пантотенової кислоти (B<sub>5</sub>) - 1250,0-1400,0, B<sub>7</sub> - 18,0-20,5, B<sub>9</sub> - 17,0-17,5, каротиноїдів - 9700-12000, коферменту НАД (НАД) - 450-600, E - 38,0-40,0, Q<sub>10</sub> - 28,0-32,0), хітину - 7,2-7,8% (Таблиця), а також містить есенціальні жирні кислоти й мікроелементи.

Штам *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 (Anamorphic fungi, Tuberculariales, Tuberculariaceae), використаний у способі, що заявляється, має наступну морфологічну та фізіологічну характеристики. Штам *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 - атоксигений, має швидкий ріст, слабе спороношення. Конідієносці прості, типу фіалід, макроконідії з 2-3 перегородками, серповидної форми розміром 16-40×3,0-4,0мкм. Штам *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 утворює хламідоспори, Гіфи міцелію потовщені - 4,5-5,0мк, зібрані в тяжі, заповнені жирними краплями. Штам *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 утворює хламідоспори. Штам *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 росте добре на природних і синтетичних середовищах, засвоює широкий спектр вуглеводів: сахарозу, мальтозу, інозит, маніт, етанол, метанол, сорбіт, лактозу та органічні кислоти. Із джерел азоту добре засвоює: нітратний, амонійний азот, сечовину. Штам *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 росте в широких межах рН - 3,5-8,5. Штам *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 мезофільний, оптимальна температура 26-28°C, при температурі понад 37°C не росте. Ознаки штаму *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 стійкі. Штам *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 - продуцент комплексу вітамінів, коферменту НАД, Q<sub>10</sub>, містить: білок - 38,0-40,0%, аміний азот - 4,0-4,2%, ліпіди - 4,3-4,5%, вітаміни (в мкг/г: B<sub>1</sub> - 8,0-12,0, B<sub>3</sub> - 850,0-1000,0, піридоксин (B<sub>6</sub>) - 18-20, B<sub>7</sub> - 15,5-18,0; B<sub>9</sub> - 15,5-16,5, каротиноїди 9000-10000, НАД - 400-450, E - 25-30, Q<sub>10</sub> - 20-30), есенціальні жирні кислоти, незамінні амінокислоти, з перевагою лізину, триптофану.

Штам *Mycelia sterilia* (white) IMB F-100014, {Anamorphic fungi, Agonomycetales, Agonomycetaceae) використаний у способі, що

заявляється, відноситься до мезофільних штамів, характеризується добрим ростом, відсутністю спороношення. Росте добре як на штучному, так і на синтетичному середовищах. Гіфи міцелію розділені перегородками, тонкі 2-3мк у діаметрі. При глибинному культивуванні на рідкому середовищі Чапека гриб утворює характерні сплетення гіф - пелети розміром з горошину білого кольору. Засвоює широкий спектр вуглеводів: глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, органічні кислоти. Легко засвоює нітратний, амонійний азот, сечовину, амінокислоти та інші органічні джерела азоту. Штам

росте в широких межах рН - 3,0-9,0 при оптимальній температурі (26±2)°С. Штам *Mycelia sterilia* (white) IMF-100014 - білково-ферментний продуцент, містить білок -50,0-53,0%, незамінні амінокислоти, з перевагою лізину, триптофану, треоніну, вітаміни (в мкг/г: В<sub>1</sub> - 13,0-15,0, В<sub>5</sub> - 750,0-800,0, В<sub>7</sub> - 18,5-19,0, В<sub>9</sub> - 10,0-12,0, убіхінони (в тому числі Q<sub>10</sub> - 8,5-10,0), Е - 30,0-35,0), хітин - 6,6-6,8%. Мас сприятливий склад ліпідної фракції з високим вмістом ненасичених жирних кислот, загальний вміст ліпідів - 3,3-3,5%. Характеризується високою целюлозолітичною активністю.

Таблиця

Характеристика білково-вітамінного продукту, отриманого шляхом спільного культивування грибів за способом, що заявляється (n=5)

Варіанти способу	Білок, %	Ліпіди, %	Хітин, %	Вітаміни, мкг/г									
				В <sub>1</sub>	В <sub>3</sub>	В <sub>5</sub>	В <sub>6</sub>	В <sub>7</sub>	В <sub>9</sub>	Каротиноїди	НАД	Е	Q <sub>10</sub>
За найближчим аналогом: <i>Fusarium sambucinum</i> BKM F-139 + <i>Penicillium sclerotiorum</i> IMB F-100015	36,4	-	6,2	-	-	-	-	16,0-18,0	-	10000,0-20000,0	-	-	-
За заявленим способом: <i>Fusarium sambucinum</i> F-100011 + <i>Mycelia sterilia</i> (white) IMB F-100014	52,0-54,0*	4,4-4,6*	7,2-7,8	25,0-30,0*	850-1200*	1250-1400*	18,0-24,0	18,0-20,5	17,0-17,5*	9700,0-12000,0	500,0-600,0	38,0-40,0*	28,0-32,0*
Монокультура <i>Fusarium sambucinum</i> IMB F-100011	38,0-40,0*	4,3-4,5*	5,6-5,8	8,0-12,0*	850,0-1000,0*	850,0-1200,0*	18,0-20,0	15,5-18,0	15,5-16,5*	9000,0-10000,0	400,0-450,0	25,0-30,0*	20,0-30,0*
Монокультура <i>Mycelia sterilia</i> (white) IMB F-100014	50,0-53,0*	3,3-3,5*	6,6-6,8	13,0-15,0*	500,0-600,0*	750,0-800,0*	18,5-21,0	18,5-19,0	10,0-12,0*	6000,0-6500,0	510,0-560,0	30,0-35,0*	8,5-10,0*

\* - дані ймовірні (p<0,05)

Використання в способі, що заявляється, штамів *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 та *Mycelia sterilia* (white) IMB F-100014 підвищує біологічну цінність білково-вітамінного продукту, при сумісному їх засіві й культивуванні на середовищі Чапека з мелясою, забезпечує швидке накопичення біомаси, що скорочує строки ферментації до 44-46 годин замість 48-60 годин, як у найближчого аналога.

Спосіб одержання білково-вітамінного продукту на основі грибів шляхом сумісного культивування *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 і *Mycelia sterilia* (white) IMB F-100014 (аналогічно для всіх прикладів) на середовищі, що містить як джерело вуглецю мелясу та мінеральні компоненти, скла-

дається із двох стадій: одержання інокулюма та ферментації.

Перша стадія - одержання інокулюма

Продуценти засівають послідовно при співвідношенні 1:1, процес культивування проводять, в умовах аерації при температурі (26±2)°С протягом 44-46 годин, після закінчення процесу ферментації проводять термічну обробку за температури 45-50° С протягом 40-45 хвилин, потім ферментаційну суміш фільтрують, одержують рідку та тверду фракції, тверду фракцію висушують, рідку фракцію залишають для індивідуального використання або до неї додають висівки та висушують. Одержують 3 вітамінно-білкові продукти:

- тверда фракція може бути рекомендована як харчовий та кормовий продукт для використання в

харчовій промисловості, сільському господарстві, в фармацевтичній промисловості та в косметології;

- рідка фракція, яка містить значний склад вітальних вітамінів, в тому числі Q<sub>10</sub>, може бути рекомендована для застосування в косметології та в сільському господарстві;

- продукт з висівками, одержаний з рідкої фракції, може бути рекомендований для застосування в сільському господарстві.

Винахід ілюструється наступними прикладами:

Приклад 1

Стадія 1. Одержання інокулгома *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 та інокулюма *Mycelia sterilia* (white) IMB F-100014.

Готують поживне середовище для вирощування грибів (водний розчин), складу, %: азотнокислий амоній - 0,45, калій фосфорнокислий однозаміщений - 0,10, магній сірчанокислий - 0,05, калій хлористий - 0,05, меляса - 1,00; pH поживного середовища 5,4-5,7. Одержання інокулюма *Fusarium sambucinum* F-100011 та інокулюма *Mycelia sterilia* (white) F-100014 проводять в колбі Ерленмейера або в інокуляторі «Біофер-1».

В колбу Ерленмейера або в інокулятор «Біофер-1» вносять поживне середовище, стерилізують, засівають суспензією конідій штаму *Fusarium sambucinum* F-100011 та проводять культивування на качалці в умовах аерації за температури (26±2)°C протягом 24-28 годин.

Вегетативний інокулюм *Mycelia sterilia* (white) F-100014 одержують аналогічно, засіваючи поживне середовище змивом міцелію штаму *Mycelia sterilia* (white) F-1 00014.

Стадія 2. Ферментація.

Готують ферментаційне середовище, склад якого такий же, як і поживного середовища в Стадії 1. Ферментацію проводять в ферментері. Приготовлене ферментаційне середовище стерилізують, охолоджують до температури (25±5)°C, послідовно вносять 2,5% інокулюма *Fusarium sambucinum* F-100011 і 2,5% інокулюма *Mycelia sterilia* (white) F-100014. Процес культивування ведуть за температури 26-28°C в умовах аерації

протягом 44-46год, після закінчення культивування проводять термічну обробку суміші протягом 40-45хв, і одержану суміш розділяють на рідку й тверду фракції шляхом фільтрації, тверду фракцію висушують (склад твердої фракції, крім наведеного в Таблиці, містить незамінні амінокислоти, ненасичені жирні кислоти та мікроелементи - натрій, калій, кальцій, магній, цинк та ін.), рідка фракція містить, мг/л: хітин - 7,0-7,2, НАД - 3,6-4,0, вітаміни: В<sub>1</sub> - 0,095-0,110, В<sub>3</sub> - 5,5-6,5, В<sub>5</sub> - 15,0-20,0, В<sub>9</sub> - 0,25-0,30, каротиноїди - 12,0-12,6, Q<sub>10</sub> - 0,2-0,4) та інші біологічно активні речовини (незамінні амінокислоти) й мікроелементи (натрій, калій, кальцій, магній).

Приклад 2

Стадія 1. Одержання інокулюма *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 і інокулюма *Mycelia sterilia* (white) IMB F-100014 аналогічно прикладу 1.

Стадія 2. Ферментація.

Ферментацію проводять аналогічно прикладу 1. Після фільтрації до рідкої фракції додають висівки в об'ємному співвідношенні 2:1 та висушують за температури до 60°C. Одержаний продукт містить: білок - 30-40%, вітаміни, мкг/г: В<sub>1</sub> - 18-19, В<sub>3</sub> - 480-520, В<sub>5</sub> - 520-600 та інші, а також незамінні амінокислоти та мікроелементи.

Неочікуваним ефектом способу, що заявляється, є те, що при сумісному культивуванні двох штамів *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 та *Mycelia sterilia* (white) IMB F-100014 утворюється біомаса грибів із підвищеним вмістом вітамінів - В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>9</sub>, Е, Q<sub>10</sub>, у порівнянні з використанням відповідних монокультур.

Перевагами способу, що заявляється, є:

- використання нових штамів *Fusarium sambucinum* IMB F-100011 і *Mycelia sterilia* (white) IMB F-100014;

- значне збагачення білково-вітамінного продукту біологічно активними речовинами: білком, хітином, водорозчинними й жиророзчинними вітамінами;

- скорочення часу ферментації;

- безвідходне виробництво.