



УКРАЇНА

(19) UA (11) 82355 (13) C2
(51) МПК (2006)
C07C 11/00
C12N 1/14
C12R 1/645 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ВИРОБНИЦТВА БІОМАСИ, ЩО МІСТИТЬ ЛІКОПІН

1

(21) а200508903
(22) 20.09.2005
(24) 10.04.2008
(46) 10.04.2008, Бюл.№ 7, 2008 р.
(72) КУНЩИКОВА ІННА СЕРГІЄВНА, UA, КУНЩИКОВА ЄВГЕНІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, UA, ТУРІАНСЬКИЙ ЮРІЙ ДАВІДОВИЧ, UA, ТЮРЕНКОВ ВОЛОДИМИР ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ТЮРЕНКОВ ОЛЕКСІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ
(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "НАУКОВО-ВИРОБНИЧЕ ПІДПРИЄМСТВО "ВІТАН", UA
(56) UA 75002 C2, 15.02.06.
RU 97118317 A, 10.12.98.
RU 2211862 C2, 10.09.03.
EP 1471151 A1, 27.10.04.
(57) 1. Спосіб виробництва біомаси, що містить лікопін, шляхом ферментації штамів міцеліального гриба *Blakeslea trispora* ЛК1 (+) і ЛК1 (-) на живильному середовищі, яке містить джерела вуглецю і азоту, при постійному перемішуванні і безперервній подачі стерильного повітря у певному співвідношенні до об'єму середовища, який відрізняється тим, що як джерела вуглецю і азоту використовують живильне середовище, вибране з групи: патока зелена та екстракт кукурудзяний або глюкоза та екстракт кукурудзяний; у живильне се-

2

редовище вводиться піногасник, а процес ферментації ведуть до періоду встановлення постійної концентрації лікопіну в біомасі, але не більш, ніж 96 годин.
2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що штам *Blakeslea trispora* ЛК1 (+) і ЛК1 (-) використовують у співвідношенні 1:6-1:12.
3. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що патоку зелену та екстракт кукурудзяний вводять у співвідношенні 1:1, а глюкозу та екстракт кукурудзяний - у співвідношенні 0,5:1.
4. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що піногасник вводять у концентрації 0,03-0,2 % від об'єму живильного середовища.
5. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що аерацію повітрям ведуть шляхом поступового збільшення подачі повітря протягом першої половини процесу ферментації від 0,25 до 1 літра повітря на хвилину на 1 літр загального об'єму живильного середовища і штамів та шляхом поступового зниження подачі повітря протягом другої половини процесу ферментації від 1 до 0,1 літра повітря на хвилину на 1 літр загального об'єму живильного середовища і штамів.
6. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що механічне перемішування ведуть зі швидкістю 150-200 обертів на хвилину.

Винахід відноситься до біотехнології, зокрема, до способів одержання мікробіологічного лікопіна, який використовується в медицині, харчовій промисловості і тваринництві.

Відомий спосіб одержання лікопіна [патент Росії №2115678, C09B61/00, C12P23/00, бюл. №20,1998, с.353], що включає вирощування певних штамів гриба *Blakeslea trispora* на живильному середовищі з додаванням соняшникової олії.

Недоліком способу є низький вихід лікопіна у виробленій біомасі.

У якості прототипа був прийнятий спосіб одержання біомаси, що містить лікопін, і спосіб одержання з неї кристалічного лікопіна [міжнародна

заявка WO 02/38791 A1, C12P23/00, C12N1/14, C09B61/00, A61K35/78//C12N1/14, C12R1:645], що передбачає використання штамів гриба *Blakeslea trispora* 3C(+) 3C(-) або 185A(+) 185A(-), або 185B(+) 185B(-), живильне середовище, компонентами якого є соєве і кукурудзяне борошно, олія, вода, при цьому ферментація штамів здійснюється при постійному перемішуванні і безперервній подачі стерильного повітря у певному співвідношенні.

Недоліком способу є низький вихід лікопіна в виробленій біомасі.

В основу винаходу поставлена задача створення способу виробництва біомаси, що містить лікопін, шляхом ферментації високоактивних шта-

(13) C2

(11) 82355

(19) UA

мів гриба *Blakeslea trispora* на живильному середовищі, що збалансовано по співвідношенню основних компонентів і складається з доступного асортименту вихідної сировини, при дотриманні визначених технологічних параметрів, що сприяють максимальному накопиченню лікопіна в біомасі (до 3,5%).

Поставлена задача вирішується тим, що в способі виробництва біомаси, що містить лікопін, шляхом ферментації штамів гриба *Blakeslea trispora* на живильному середовищі, яке містить джерела органічного вуглецю й азоту, при постійному перемішуванні і безперервній подачі стерильного повітря у певному співвідношенні до обсягу середовища, відповідно до винаходу у якості продуцента використовують штами гриба *Blakeslea trispora* ЛК1(+) і ЛК1(-), у якості джерела живильного середовища використовують патоку зелену або глюкозу та екстракт кукурудзяний, у склад живильного середовища вводять піногасник, а процес ферментації ведуть до періоду встановлення постійної концентрації лікопіна в біомасі, але не більше, ніж 96 годин, при цьому штами гриба *Blakeslea trispora* ЛК1(+) і ЛК1(-) використовують у співвідношенні 1:6 - 1:12, патоку зелену та екстракт кукурудзяний вводять у співвідношенні 1:1, а глюкозу та екстракт кукурудзяний - у співвідношенні 0,5:1, піногасник вводять у концентрації 0,03 - 0,2% від об'єму живильного середовища, аерацію повітрям ведуть шляхом поступового збільшення подачі повітря протягом першої половини процесу ферментації від 0,25 до 1 літра повітря на хвилину на 1 літр загального об'єму живильного середовища і штамів та шляхом поступового зниження подачі повітря протягом другої половини процесу ферментації від 1 до 0,1 літра повітря на хвилину на 1 літр загального об'єму живильного середовища і штамів, а механічне перемішування ведуть зі швидкістю 150 - 200 обертів на хвилину.

Запропоновані до використання штами гриба *Blakeslea trispora* ЛК1(+) і ЛК1(-) мають при співвідношенні (+) і (-) штамів 1:6 - 1:12 високу здатність до синтезу лікопіна, що дозволяє при здійсненні описаного способу виробництва одержати біомасу, що містить лікопін, з максимально можливою концентрацією цільового продукту. Штами *Blakeslea trispora* ЛК1(+) і ЛК1(-) депоновано в депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного за № 1МВ F 100041.

Вирощування штамів-продуцентів на живильному середовищі, компонентами якого є патока зелена або глюкоза та екстракт кукурудзяний, дає можливість реалізовувати технологію при наявності доступних і технологічних видів сировини. Співвідношення компонентів живильного середовища 1:1 для патоки зеленої і кукурудзяного екстракту і 0,5:1 для глюкози і кукурудзяного екстракту оптимізує процес росту біомаси при максимальному накопиченні лікопіна.

Ріст штамів супроводжується процесом утворення піни. У зв'язку з цим введення до складу живильного середовища піногасника попереджає процес утворення піни, тим самим, забезпечуючи найбільш сприятливі умови культивування. Введення піногасника в концентрації 0,03 - 0,2% від

об'єму живильного середовища оптимізує процес його використання.

Здійснення процесу ферментації до періоду встановлення постійної концентрації лікопіна, але не більш 96 годин гарантує максимальну економічну доцільність процесу виробництва, при якому максимальна концентрація лікопіна в біомасі забезпечується при оптимальних витратах компонентів живильного середовища.

Здійснення процесу ферментації при аерації повітрям з розрахунку поступового збільшення подачі повітря протягом першої половини процесу ферментації від 0,25 до 1 літра повітря на хвилину на 1 літр загального об'єму живильного середовища і штамів та шляхом поступового зниження подачі повітря протягом другої половини процесу ферментації від 1 до 0,1 літра повітря на хвилину на 1 літр загального об'єму живильного середовища і штамів та при постійному механічному перемішуванні зі швидкістю 150 - 200 обертів на хвилину, забезпечує найкраще постачання вирощуваної культури киснем, що сприяє її максимальному росту і накопиченню лікопіна.

Переваги запропонованого способу складаються в збільшенні накопичення лікопіна в порівнянні з винаходами-аналогами, відсутності хімічно синтезованої сировини в процесі ферментації, а також можливості застосування доступних і дешевих компонентів, які є сировинною основою живильного середовища для одержання максимальної кількості біомаси з максимальною концентрацією лікопіна.

Приклади виконання способу.

Приклад 1.

У якості компонентів живильного середовища вибрали патоку зелену та екстракт кукурудзяний згущений. Відповідно до технологічного регламенту, живильне середовище містило 470л патоки зеленої. Була введена така ж кількість (470л) екстракту кукурудзяного згущеного. Об'єм живильного середовища складав 7000л. Об'єм, що залишився (до 7000л), заповнювали водою, що склало 6060л. У результаті, склад живильного середовища у рамках даного приклада був наступним:

екстракт кукурудзяний згущений	6,7%
патока зелена	6,7%
вода	86,6%.

У живильне середовище були введені штами міцеліального гриба *Blakeslea trispora* ЛК1(+) і ЛК1(-) у співвідношенні 1:6. Відповідно до технологічного регламенту, загальний обсяг штамів склав 1000л, з яких 143л приходилося на штам ЛК1(+) і 857л - на штам ЛК1(-).

Для запобігання утворення піни в живильне середовище ввели піногасник Struktol J650 виробництва компанії Schill+Seilacher, Німеччина, у кількості 0,03% від об'єму живильного середовища (7000л), що склало 2,1л.

Процес ферментації вели при аерації повітрям, з розрахунку поступового збільшення подачі повітря від 0,25 до 1 літра повітря на хвилину на 1 літр загального об'єму живильного середовища та штамів протягом першої половини процесу глибинного культивування, тобто перші 48 годин, і від 1 до 0,1 літра повітря на хвилину на 1 літр загаль-

ного об'єму живильного середовища і штамів протягом другої половини процесу глибинного культивування, тобто не більше, ніж 48 наступних годин. Загальний об'єм живильного середовища (7000л) і штамів (1000л) у ферментері склав 8000л. Тому подачу повітря в перші 48 годин ферментації забезпечили від 2000л повітря на хвилину з поступовим збільшенням до 8000л повітря на хвилину до кінця першого циклу, після чого поступово знижували подачу повітря до 800л на хвилину до кінця процесу ферментації.

Для забезпечення найкращого постачання всього об'єму живильного середовища повітрям процес ферментації вели при постійному механічному перемішуванні зі швидкістю 150 обертів на хвилину.

Періодично (4 рази на добу) відбирали проби на аналіз для визначення накопичення біомаси, процентного вмісту лікопіна, проведення мікробіологічного і біохімічного контролю. За результатами аналізів оцінювали динаміку накопичення лікопіна в біомасі. Після 94 годин ферментації 3 послідовні виміри показали той самий процентний вміст лікопіна в біомасі. Після цього процес ферментації припинили.

Потім отриману наприкінці ферментації культуральну рідину фільтрували, а біомасу, що міс-

ить лікопін, висушували у вакуумній гребковій сушарці при температурі в масі не більше, ніж 60°C під вакуумом до залишкового вмісту вологи в продукті 7%.

Відповідно до запропонованого способу вміст лікопіна в біомасі склав 2,5%.

Приклад 2.

Приклад виконувався аналогічно Прикладу 1, тільки:

- Живильне середовище складалося з глюкози, кукурудзяного екстракту і води, що ввели в наступному співвідношенні:

- екстракт кукурудзяний згущений - 6,7%, що склало 470л

- глюкоза - 3,35%, що склало 235л

- вода - 89,95%, що склало 6295л.

- Штами *Blakeslea trispora* ЛК1(+) і ЛК1(-) ввели в співвідношенні 1:12, що склало 77л штаму ЛК1(+) і 923л штаму ЛК1(-).

- Піногасник *Struktol J650* ввели в кількості 0,2%, що склало 14л.

- Процес глибинного культивування вели при постійному механічному перемішуванні зі швидкістю 200 обертів на хвилину.

Відповідно до запропонованого способу вміст лікопіна в біомасі склав 3%.