



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14450 (13) U  
(51) МПК (2006)  
C12N 5/04  
A61K 31/78 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ПРОЦЕС ВИРОЩУВАННЯ КАЛЮСНОЇ КУЛЬТУРИ ТКАНИН РАУВОЛЬФІЇ ЗМІІНОЇ

(21) u200511106

(22) 23.11.2005

(24) 15.05.2006

(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.

(72) Кунах Віктор Анатолійович, Юссеф Ал-Аммурі, SY, Можилевська Людмила Петрівна, Мірюта Наталія Юріївна

(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) 1. Процес вирощування культури калюсних тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. - продуцент аймаліну, який включає вирощування біомаси культивованих клітин на живильних середовищах, позбавлених регуляторів росту, який **відрізняється** тим, що вирощування біомаси культивованих клітин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. виконують протягом принаймні одного пасажу (циклу вирощування) на твердому живильному середовищі 5C наступного складу, мг/л:

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400-600
KNO <sub>3</sub>	1000-1200
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	800-1000
KCl	60-80
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400-600
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500-700
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50-150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200-400
KJ	0,8-0,9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2-0,3
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
CoCL <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	21-23
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,0-6,5
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10-11
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27-28

Na<sub>2</sub> EDTA 37-38

тіамін 0,8-1,2

сахароза 50000

агар 0,6-0,8 %

pH до автоклавування 5,8-6,2,

на 35-45-у добу росту тканину переносять у рідке живильне середовище наступного складу, мг/л:

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 200-400

KNO<sub>3</sub> 1000-1200

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 800-1000

KCl 60-80

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 400-600

NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 250-290

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200-300

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 150-250

KJ 0,8-0,9

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,2-0,3

CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,02-0,03

CoCL<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,02-0,03

MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 21-23

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6,0-6,5

ZnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 10-11

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 27-28

Na<sub>2</sub> EDTA 37-38

тіамін 0,8-1,2

сахароза 25000

pH до автоклавування 5,8-6,2,

в якому калюсну тканину вирощують в глибинній культурі протягом 20-35 діб.

2. Процес за п. 1, який **відрізняється** тим, що культуру тканин на агаризованому середовищі 5C вирощують протягом не менше 5 пасажів, а потім переносять в рідке живильне середовище, де вирощують калюсну тканину у вигляді глибинної культури протягом 20-35 діб.

Корисна модель відноситься до галузі біотехнології і стосується процесу вирощування калюсної культури тканин раувольфії зміїної - продуценту аймаліну, який використовують у якості протиаритмічного лікарського засобу.

Найбільш близьким до пропонованого за кількістю суттєвих ознак є процес вирощування культури тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. - продуцента аймаліну, який включає вирощування біомаси культивованих клітин на живиль-

(19) UA (11) 14450 (13) U

них середовищах, позбавлених регуляторів росту [Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. - К.: Логос, 2005, 720с.].

Описаний процес включає поверхнєве вирощування, яке є малотехнологічним, оскільки тривалість вирощування калюсу від пересадки до збирання врожаю складає від 70 до 120 діб і потребує значних матеріальних і трудових витрат. Альтернативним способом може бути вирощування культури тканин у рідкому, простішому за складом живильному середовищі у біореакторах (ферментерах) або на шейкерах. Проте відомі продуктивні суспензійні культури раувольфії зміїної потребують особливих умов вирощування і спеціального обладнання, що перешкоджає їх впровадженню у виробництво [1, 2]. Умови глибинного вирощування калюсних тканин відпрацьовано лише для порівняно низькопродуктивної клітинної лінії А раувольфії зміїної, калюсні тканини продуктивніших штамів у рідкому живильному середовищі ростуть погано, або й зовсім не ростуть і через короткий проміжок часу вирощування гинуть [1].

У основу пропонованої корисної моделі поставлено задачу створення такого процесу вирощування калюсної культури тканин раувольфії зміїної (високопродуктивного штаму К-27 раувольфії зміїної), який би забезпечив прискорення накопичення аймаліну в біомасі, забезпечив би його підвищений вихід за рахунок вирощування в рідкому живильному середовищі спрощеного складу.

Зазначена задача вирішується пропонованим процесом, який, як і відомий процес вирощування культури калюсних тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. - продуцента аймаліну, включає вирощування біомаси культивованих клітин на живильних середовищах, позбавлених регуляторів росту, а, відповідно до пропозиції, вирощування біомаси культивованих клітин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. виконують принаймні один пасаж (цикл вирощування) на твердому живильному середовищі 5С наступного складу, мг/л:

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400-600
KNO <sub>3</sub>	1000-1200
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	800-1000
KCl	60-80
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400-600
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500-700
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50-150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200-400
KJ	0,8-0,9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2-0,3
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	21-23
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,0-6,5
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10-11
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27-28
Na <sub>2</sub> EDTA	37-38
Тіамін	0,8-1,2
Сахароза	50000
Агар	0,6-0,8%
pH до автоклавування	5,8-6,2

на 35-45-у добу росту тканину переносять у рідке живильне середовище Рж наступного складу, мг/л:

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	200-400
KNO <sub>3</sub>	1000-1200
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	800-1000
KCl	60-80
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400-600
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250-290
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200-300
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150-250
KJ	0,8-0,9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2-0,3
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	21-23
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,0-6,5
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10-11
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27-28
Na <sub>2</sub> EDTA	37-38
Тіамін	0,8-1,2
Сахароза	25000
pH до автоклавування	5,8-6,2,

в якому калюсну тканину вирощують в глибинній культурі протягом 20-35 діб.

Особливістю пропонованого процесу є і те, що культуру тканин на агаризованому середовищі 5С вирощують не менше 5 пасажів, а потім переносять в рідке живильне середовище Рж, де вирощують калюсну тканину у вигляді глибинної культури протягом 20-35 діб.

Пропонований процес включає двоетапне вирощування калюсної культури раувольфії зміїної, де першим етапом є вирощування на агаризованому середовищі спеціального складу 5С за [3] без регуляторів росту, а другим етапом - вирощування калюсної тканини в рідкому живильному середовищі без регуляторів росту Рж за [4] з деякими модифікаціями на шейкерах (гойдалках) або в біореакторах (ферментерах).

Процес ілюструється наступними прикладами та таблицею:

Приклад 1. Штам К-27 раувольфії зміїної вирощується в колекції у вигляді калюсної тканини на агаризованому живильному середовищі 10С наступного складу, мг/л:

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2300-2600
KNO <sub>3</sub>	250-350
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	800-1000
KCl	50-90
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1200-1400
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100-300
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	250-350
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200-400
KJ	0,8-0,9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2-0,3
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,08-0,12
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	21-23
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10-12
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10-11
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27-28
Na <sub>2</sub> EDTA	37-38
Тіамін	4-6
Сахароза	100000
Агар	0,6-0,8%

pH до автоклавування 5,8-6,2

Першим етапом вирощування за розробленим процесом є перенесення калюсної тканин штаму K-27 на інше агаризоване живильне середовище 5C за [3] без регуляторів росту наступного складу, мг/л:

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400-600
KNO <sub>3</sub>	1000-1200
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	800-1000
KCl	60-80
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400-600
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500-700
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80-110
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200-400
KJ	0,8-0,9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2-0,3
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	21-23
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,0-6,5
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10-11
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27-28
Na <sub>2</sub> EDTA	37-38
Тіамін	0,8-1,2
Сахароза	50000
Агар	0,6-0,8%

pH до автоклавування 5,8-6,2

Приготовлене середовище розливають по 50мл у колби Ерленмейера об'ємом 250мл, стерилізують в автоклаві гарячою парою при 1атм 15-20 хвилин. Для пересадки використовують охололе середовище.

У колби в асептичних умовах вносять 5-6 грам живої біомаси калюсної тканини 30-45-добового віку, яка виросла на колекційному середовищі 10C. Колби з висадженими на середовищі 5C експлантами ставлять у термостатоване темне приміщення (t°=25-28°C, відносна вологість повітря - 70-80%).

Через 30-45 діб калюс переносять в рідке живильне середовище Рж (другий етап вирощування) наступного складу, мг/л:

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	200-400
KNO <sub>3</sub>	1000-1200
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	800-1000
KCl	60-80
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400-600
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250-290
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20-30
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150-250
KJ	0,8-0,9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2-0,3
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02-0,03
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	21-23
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,0-6,5
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10-11
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27-28
Na <sub>2</sub> EDTA	37-38
Тіамін	0,8-1,2
Сахароза	25000
pH до автоклавування	5,8-6,2

Приготовлене рідке середовище розливають по 50мл в колби Ерленмейера об'ємом 250-300мл, стерилізують і в кожну з них в асептичних умовах вносять 5-6г живої біомаси калюсної тканини, попередньо вирощеної на середовищі 5C. Колби з висадженими експлантами ставлять на шейкери (гойдалки) з циклом коливань 50-60обертів/хв. і вирощують протягом 25-35 діб. Отриману калюсну тканину збирають, видаляють з неї залишки живильного середовища, висушують до стану повітряно-сухої біомаси при температурі 54-55°C і визнають у ній вміст аймаліну.

Швидкість накопичення аймаліну в сухій біомасі калюсної тканини штаму K-27 раувольфії змінюється за її вирощування двоетапним процесом, другим етапом якого є глибинне вирощування в рідкому живильному середовищі Рж спеціального складу зростає вдвічі-втричі порівняно з відомим способом вирощування на агаризованому середовищі 10C. За рахунок цього термін вирощування калюсної тканини, яка накопичує 1% аймаліну і більше суттєво скорочується - до 20-35 діб, тобто, практично, втричі. Порівняльні дані динаміки накопичення аймаліну в біомасі за її вирощування згідно розробленого та відомого способів наведені в таблиці.

Приклад 2. Агаризоване живильне середовище 5C готують за прикладом 1. Калюсну тканину штаму K-27 раувольфії змінюють на цьому середовищі не менше п'яти (до 10-12) пасажів за тривалості пасажу 35-45 діб. Після цього тканину переносять в рідке живильне середовище Рж і вирощують згідно прикладу 1. Швидкість накопичення аймаліну зростає і порівняно з відомим процесом вміст аймаліну в сухій біомасі на 20-35 добу росту підвищується у 3-4 рази, сягаючи 1,8% (таблиця).

Інші процеси (способи) вирощування у глибинній культурі в різних за складом середовищах, у тому числі пряме перенесення калюсної тканини штаму K-27 із агаризованого середовища 10C в рідке середовище Рж позитивного ефекту не дають.

Висновок. Запропонований процес вирощування калюсної тканини штаму K-27 раувольфії змінюють на спрощених за складом живильних середовищах без регуляторів росту, спочатку на агаризованому середовищі 5C, а потім у рідкому живильному середовищі Рж на шейкерах, у 2-4 рази підвищує швидкість накопичення аймаліну в сухій біомасі. Це дозволяє: 1) удвічі - втричі скоротити термін вирощування калюсної тканини до збору врожаю (з 70-90 діб за відомим способом до 20-35 діб за розробленим способом) та 2) зменшити трудові та матеріальні витрати при отриманні аймаліну внаслідок вирощування калюсних тканин на простіших за складом живильних середовищах на шейкерах або у ферментерах у вигляді глибинної культури та значного скорочення об'ємів виробництва внаслідок швидкого накопичення аймаліну в біомасі.

Таблиця

Динаміка накопичення аймаліну в сухій біомасі культури тканин штаму К-27 раувольфії зміїної за його вирощування згідно відомого та розробленого процесів (середнє з трьох дослідів по 5 повторностей у кожному)

Доба росту	Відомий процес, вміст аймаліну, %	Розроблений процес за прикладом 1		Розроблений процес за прикладом 2	
		вміст аймаліну, %	ефект стимуляції, %	Вміст аймаліну, %	Ефект стимуляції, %
5	0,40	0,41	102,5	0,58	145,0
10	0,39	0,49	125,6	0,62	159,0
15	0,35	0,69	197,1	0,84	240,0
20	0,32	1,00	312,5	1,12	350,0
25	0,40	1,08	270,0	1,59	397,5
30	0,48	1,08	225,0	1,75	364,6
35	0,61	1,12	183,6	1,81	296,7
40	0,73	1,01	138,4	1,83	250,7
45	0,85	1,07	125,9	1,78	209,4
50	0,92	1,12	121,7	1,75	190,2
60	0,98	1,15	117,4	1,79	182,7

Джерела інформації:

1. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, - 2005. - 720с.

2. Деклараційний патент України №42150А, МПК6 С12N5/04. Штам культивованих клітин раувольфії зміїної *Raiwolfia serpentina* Benth. - продуцент аймаліну // Кунах В.А., Можилевська Л.П., Алпатова Л.К., Кацан В.А., Адонін В.І. - Опубл. 15.10.2001, Бюл. №9.

3. Патент України №10338А, МПК6 С12N5/00,

С12N 5/02. Живильне середовище для одержання і вирощування калюсних тканин рослин // Кунах В.А., Алпатова Л.К., Можилевська Л.П. - Опубл. 25.12.96, Бюл. №4.

4. И.Е. Каухова, А.Г. Воллосович, В.А. Цыганков. Выбор питательной среды для глубинного культивирования тканей раувольфии змеиной (*Raiwolfia serpentina* Benth.) // Растительные ресурсы, 1981, т. 17, №2, с.217-224.