



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 57317

(13) A

(51) 7 C 12N1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВидається під  
відповідальність  
власника  
патенту(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ МЕЛАНІНВІСНОЇ БІОМАСИ З ВИКОРИСТАННЯМ ШТАМУ МІКРОМІЦЕТА  
CLADOSPORIUM CLADOSPORIODES 396

1

2

(21) 2002086431

(22) 01 08 2002

(24) 16 06 2003

(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р.

(72) Жданова Неллі Миколаївна, Василевська Ан-  
тоніна Іванівна, Ізжурова Валентина Василівна,  
Артишкова Лариса Вікторівна(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ  
Д. К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ  
НАУК УКРАЇНИ(57) Спосіб одержання меланінвмісної біомаси, що  
включає приготування поживного середовища,  
засів його штамом мікроміцета *Cladosporium*cladosporioides 396 з подальшим проведенням  
ферментації в умовах глибинного культивування,  
який відрізняється тим, що засів поживного сере-  
довища здійснюється інкулятом мікроміцета  
*Cladosporium cladosporioides* 396 в кількості 10-15  
об. %, а як поживне середовище для вирощування  
інкуляту та цільового продукту використовують  
середовище такого складу (г/л)

картопля	50
харчовий цукор	15
вода дистильована	1 л

Винахід відноситься до галузі прикладної мік-  
робиології і біотехнології і стосується мікробіологі-  
чного способу одержання меланінвмісної біомаси,  
використовуючи штам мікроміцета *Cladosporium*  
*cladosporioides* 396

Меланінвмісна біомаса необхідна для отри-  
мання в подальшому меланінового пігменту, який  
широко розповсюджений в природі, приймає  
участь в гумусоутворенні ґрунту, обумовлює загар,  
копір волосся і очей людини, забарвлення шкірно-  
го покриву тварин, пір'я птахів, насіння тощо (С. П.  
Лях. Микробный меланиногенез и его функции. —  
М. Наука, 1981. — 274 с., Н. Н. Жданова, А. И. Ва-  
силевская. Меланинсодержащие грибы в экстре-  
мальных условиях. — К. Наук. думка, 1988. — 196  
с.) Меланіновий пігмент пропонується використо-  
вувати як перетворювач електромагнітних і ульт-  
развукових опромінь в теплову енергію (Патент  
Росії № 2028157, МПК А61К 41/00, Патент Рос-  
сії № 93049670, МПК А61К 41/00), стимулятор  
росту рослин (Патент Росії № 940305551, МПК  
С12 N1/14), антиоксидантний, протипухлинний та  
радіопротекторний препарат (А. А. Малама, Л. А.  
Смирнова. Влияние циклических соединений на  
образование пигмента в культурах *Aspergillus niger*  
// Прикладная биохимия и микробиол. — 1975. —  
11, № 1. — С. 57 - 62, Д. Г. Затула, А. Т. Слабо-  
спіцька, А. А. Свищук, Н. М. Жданова. Протипух-  
линні властивості меланінових пігментів грибоного  
походження та їх вплив на деякі реакції імунітету //  
Мікроб. журн. — 1976. — 38, № 1. — С. 29 - 32,

Патент СССР № 1787032, МПК А 61 К 35/55, М. О.  
Дружина, Г. Г. Пухова, А. П. Бурлака, Н. М. Ждано-  
ва, Е. П. Сидорик. Процеси перекисного окислення  
в системі крові та їх корекція меланіном у тварин в  
зоні впливу аварії на Чорнобильський АЕС // Україн-  
ський радіологічний журнал. — 1994. — 3, № 4. —  
С. 271 - 273, Патент Росії № 96104228, МПК  
С12Р 17/10, Патент Росії № 96104229, МПК  
С12Р 17/10) та інше

Відомо, що застосування матеріалів тваринно-  
го походження для одержання меланінвмісної біо-  
маси занадто дороге і практично недоступне. Ви-  
користання для його одержання плодів винограду і  
сухого листя чаю практично не вигідно через об-  
меженість продукції (запеканість від одержаного  
врожаю) і її непостійність (Ю. Л. Жере-  
бин. Окислительно-восстановительные полимеры  
из виноградных выжимок // ДАН СССР. — 1981. —  
259, № 4. — С. 853 - 856, Д. А. Новиков, В. П. Курче-  
нко, И. И. Азарко. Фотопротекторные свойства ме-  
ланинов из винограда (*Vitis vinifera*) и черного чая  
// Радиационная биология. Радиозэкология. —  
2001. — 41, № 6. — С. 664 - 670)

Економічно вигідніше меланінвмісну біомасу  
одержувати мікробіологічним шляхом, культивую-  
чи на поживних середовищах мікроорганізми, що  
мають сталі морфологічно-культуральні властивості,  
які можна постійно контролювати. Так, є спосіб, в  
якому меланінвмісну біомасу отримують за допо-  
могою штаму дріжджів *Saccharomyces neoformans*  
*var. nigricans*, культивуючи його на середовищах,

(13) A

(11) 57317

(19) UA

для приготування яких використовують відходи спиртового виробництва, молочну сироватку, м'ясу (Патент Росії, № 2000124690, МПК C12P 7/24) На таких середовищах вихід біомаси низький (4%)

Відомо також спосіб, в якому використовують штам *Streptomyces*, одержаний методами генної інженерії, що вирощують на середовищі, до складу якого входить гідролізат казеїну чи казеїнового пептону, сульфат міді і L-тирозин (Патент US № 5631151, МПК 6С 12 Р 7/66)

Крім того, є способи одержання біомаси штаму антарктичних чорних дріжджів *Nadsoniella nigra* var *hesuelica* 365 та його мутанта 1-365 (Заявка Росії № 96104228, МПК C12 Р 17/10, Заявка Росії № 96104229, МПК C12 Р 17/10) та штамів чорних дріжджоподібних грибів *Aureobasidium pullulans* (ЕР Алексанян, ЛС Маркосян Влияние источников углерода на синтез внеклеточной инвертазы, белка, пигмента и биомассы *A. pullulans* // Микробиология — 1985 — 54, № 1 — С 49 - 54, Патент Росії, № 1559717, Н П Елинов, Н А Юрлова Меланиновый пигмент *Aureobasidium (Pullularia) pullulans* Arnaud (de Bary), 1910 // Научн докл высш шк Биол Науки — 1976, № 7 — С 108 - 112, Н А Юрлова Микробицеты рода *Aureobasidium* Viala & Boyer Таксономия, экополисахариды Автореф дис д-ра биол наук — Пушкино, 1997 — 31 с) Однак при використанні даних грибів наявність значної кількості екзогенного полісахариду в біомасі призводить до багаторазового її відмивання, центрифугування, що ускладнює в подальшому одержання меланіну і обумовлює підвищення часових і фінансових витрат

Згідно з вказаними аналогами, при одержанні меланінвмісної біомаси використовуються складні середовища, і виникає потреба в дорогих за вартістю речовинах для їх приготування Недоліками вищезазначених аналогів є також те, що використовуються штами мікроорганізмів, які технологічно недостатньо придатні і зручні Крім того, за умовами аналогів, в якості посівного матеріалу для одержання біомаси застосовували суспензію клітин або фрагментований міцелій вихідної культури

Найбільш близьким (прототип) до запропонованого винаходу є спосіб одержання меланінвмісної біомаси, використовуючи мікроміцет (мікроскопічний гриб) *Cladosporium cladosporioides* 396 (Патент України № 1523, Н Н Жданова, А В Мележик, А Т Школьный, О И Синявская Получение и характеристика меланина гриба *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries // Микробиол журн — 1993 — 55, № 1 — С 79 - 84) Штам гриба має такі переваги: є культурою з стійкими і стабільними морфолого-культуральними властивостями, технологічний, зручний для практичного використання, легко куптивується на доступних середовищах, тому грибку біомасу можна накопичувати в лабораторних і в промислових умовах

Меланінвмісну біомасу гриба вирощували при періодичному глибинному культивуванні в модифікованому рідкому середовищі Чапека, в якому замість сахарози застосовували харчовий цукор і додавали 1% кукурудзяного екстракту Одержану біомасу відділяли від культуральної рідини фільтруванням і висушували при 60°C Вихід біомаси

становив 15 - 20г/л Недоліком цього способу одержання меланінвмісної біомаси є використання в поживному середовищі кукурудзяного екстракту, що є дорогою речовиною з непостійним компонентним складом Крім того, для одержання біомаси поживне середовище засівали суспензією конідій або фрагментованим міцелієм вихідної культури гриба і не застосовували вирощування в глибинних умовах інкуляції гриба, що призводило до витрачання великих об'ємів поживного середовища і лабораторного посуду

Задачею запропонованого винаходу є вдосконалення способу одержання меланінвмісної біомаси з використанням штаму мікроміцета *Cladosporium cladosporioides* 396 Поставлена задача вирішується тим, що одержують меланінвмісну біомасу гриба *Cladosporium cladosporioides* 396 на поживному картопляно-цукровому середовищі, що здешевлює його вартість, а також змінюють умови посіву гриба шляхом вирощування в глибинних умовах інкуляції, встановлюють його оптимальну кількість, що економить кількість витраченого середовища і лабораторного посуду

Штам мікроміцета *Cladosporium cladosporioides* 396 (Fresen) de Vries випущений Н М Ждановою в 1957 р з чорноземного ґрунту України (Львівська обл, с Пікуловичі) Штам ідентифікований Н М Ждановою Депонований в Інституті мікробіології і вірусології НАН України під номером ІМВ F-100010 і зберігається в колекції грибних культур відділу фізіології та систематики мікроміцетів Штам не токсичний, не вірулентний, не токсигенний, не інвазивний Захищений Патентом України № 1523 від 15 вересня 1993 р

Морфологічна характеристика штаму При мікроскопіюванні культури, що виросла при 25°C протягом 10 - 14 діб на агаризованих середовищах (суслі, середовищі Чапека і картопляно-глюкозному), піфи міцелія 1,5 - 4,0мм товщиною, світлооливкові Конідієносці до 400,0 x 3,0 - 4,5мкм, світло-коричневі, гладенькі, на яких утворюються розгалужені ланцюжки конідій Конідії переважно одноклітинні, овальні, видовжено-овальні до майже кулястих, злегка зеленуваті, гладенькі, верхівкові 2,2 - 3,5 x 2,0 - 3,3, серединні 6,5 - 11,4 x 3,2 - 3,8 і базальні одно-, двоклітинні 14,0 - 16,4 x 3,9мкм

Культуральні властивості штаму Штам росте на рідких і агаризованих середовищах пивному суслі, середовищі Чапека, картопляно-глюкозному Колонії гриба на сусповому агарі через 10 - 14 діб росту в стаціонарних умовах на чашках Петрі досягають 90мм в діаметрі, пухнасті або бархатисті (1 - 3мм висоти), гладенькі іноді слабо радіально складчасті, спочатку зеленувато-оливкові потім темнооливкові, з більш пухнастим краєм, 1,0 - 1,5мм ширини, на зворотньому боці темно-коричневі до чорних, на агаризованому середовищі Чапека колонії ростуть менш інтенсивно, пігментація колоній така ж, на агаризованому картопляно-глюкозному середовищі пігментація колоній інтенсивніша

При культивуванні в стаціонарних умовах вказаних рідких середовищах гриб утворює поверхневу плівку темнооливкового і на картопляно-глюкозному середовищі - чорного кольору Куль-

туральна рідина при вирощуванні на середовищі Чапека майже не забарвлена

В умовах періодичного глибинного культивування на середовищі Чапека культура гриба утворює пелети (кульки міцелію) чорного кольору з темнооливковим відтінком. Культуральна рідина коричневатого кольору. На рідких середовищах з джерелами азотного живлення органічної природи і на природних середовищах (крохмаль картопляний і кукурудзяний) при 25°C накопичення біомаси і її пігментація підсилюються.

Фізіологічні властивості штаму. Гриб є аероб, оптимум росту і спороношення при 25°C, оптимальна кислотність поживного середовища 4,8 - 5,2, не росте при 37°C. В процесі росту культури в залежності від складу поживного середовища кислотність середовища змінюється до 7,2 - 7,3.

Штам гриба проявляє целюлозолітичну, каталазу, глюкооксидазну ферментативні активності і має антиоксидантну властивість, стійкий до високих доз УФ- та γ-випромінювання, виживає при дії високих і низьких температур, в умовах глибокого вакууму, штучного сонячного світла високої інтенсивності.

Гриб засвоює як джерела вуглецю моносахариди (глюкозу, галактозу, фруктозу), олігосахариди (сахарозу, мальтозу, лактозу), сахароспирти, полісахариди (крохмаль картопляний і кукурудзяний), як джерела азоту неорганічні (нітратні, амонійні) і органічні форми азоту, добре росте на суслі і картопляно-глюкозному середовищі. Серед органічних кислот засвоює лимонну, щавлеву і оцтову кислоти.

Штам гриба в лабораторних умовах зберігається на сусловому агарі, середовищі Чапека та картопляно-глюкозному агарі в холодильнику +4 - 5°C з пересівами через 6 - 8 місяців і протягом багатьох років - на просі, пшоні, в стерильному ґрунті та ліофілізованому стані.

Спосіб здійснюється таким чином:

Перший етап

Вирощування вихідного посівного матеріалу штаму. Для вирощування вихідного посівного матеріалу штаму, призначеного для одержання інкулюму, використовують найбільш поширене середовище суспо-агар.

Вихідною сировиною для приготування середовища є солодове суспо, рН 4,8 - 5,2. Для приготування суспового агара до 1л рідкого суспа додають 15 - 20г агар-агара, залишають його на набухання, після чого при постійному перемішуванні доводять до кипіння і повного розплавлення агара. Середовище фільтрують, розливають в пробірки і стерилізують при 0,5атм протягом 30 хв. Пробірки з середовищем охолоджують і інкубують при 28 - 30°C протягом 48 годин для контролю мікробіологічної чистоти середовища.

Середовище в пробірках засівають культурою гриба *C. cladosporioides* 396, і засіяні пробірки інкубують при 25°C протягом 10 - 14 діб. Одержаний посівний матеріал зберігається при кімнатній температурі протягом 3 - 4-х місяців, в холодильнику при +4 - 5°C - 6 - 8 місяців, після чого проводять їх пересів на свіже поживне середовище.

Другий етап

Одержання інкулюму штаму. Інкулюм штаму

*C. cladosporioides* 396, який призначений для одержання біомаси, готують таким чином.

1 Приготування середовища. Для одержання інкулюму пропонується картопляно-цукрове середовище такого складу:

картопляний відвар	- 1л,
харчовий цукор	- 15г,
рН середовища	- 4,8 - 5,2

Для приготування середовища до 150г ретельно промиті і очищені від шкурки нарізаної пластинками картоплі, додають 1л дистильованої води і варять до готовності. Картопляний відвар фільтрують, доводять до об'єму 1л і додають 15г харчового цукру. Одержане картопляно-цукрове середовище розливають в ферментаційні колби і стерилізують в автоклаві при 0,5атм протягом 30 хвилин.

2 Приготування суспензії конідій. До пробірки з вихідною культурою гриба додають 15мл стерильного картопляно-цукрового середовища. За допомогою мікологічної голки конідії і міцелій ретельно знімають з поверхні агара, фільтрують через стерильний ватно-марлевий фільтр. Одержану суспензію конідій використовують для інкулюма в концентрації 1 млн конідій в 1мл середовища.

3 Вирощування інкулюму. Одержану суспензію конідій (10мл) вносять в колбу ємністю 750мл з 200мл картопляно-цукрового середовища і вирощують на качалці (160об/хвил) при 25°C. Через 36 годин росту культура гриба утворює рівномірну масу пелет діаметром 1 - 2мл чорного кольору з темнооливковим відтінком, які займають біля 1/3 об'єму поживного середовища. Вирощений інкулюм використовують для подальшого засіву колб Ерпенмейєра і одержання грибною біомаси.

Третій етап

Одержання біомаси штаму в глибинних умовах. Інкулюм штаму з розрахунку 5 - 15об % (% від об'єму поживного середовища) використовують для засіву колб Ерпенмейєра (ємністю 750мл) з 200мл картопляно-цукрового середовища. Колби розміщують на качалці (200 - 220об/хвил) і інкубують при 25°C протягом 4 - 5 діб.

При одержанні біомаси штаму *C. cladosporioides* 396 запропонованим способом утворюються пелети, які займають майже весь об'єм культуральної рідини. Біомасу фільтрують через дрібноячмасту нейлонову тканину, ретельно відмивають дистильованою водою від залишків культуральної рідини. Віджату біомасу висушують в сушильній шафі при 105°C до постійної ваги і подрібнюють до порошковидного стану за допомогою лабораторного млина з корпусом, стійким до механічного тертя.

При вирощуванні гриба постійно проводять мікологічний і бактеріологічний контроль. Інфіковані колби відбраковують та видаляють.

Таблиця 1

Накопичення меланінвмісної біомаси (г/л)  
C cladosporioides 396 на запропонованому середовищі

Середовище	
Чапека з 1% кукурудзяного екстракту (прототип)	Картопляно-цукрове
19,6 ± 1,0	19,4 ± 1,1

Таким чином, дані таблиці свідчать, що запропоноване картопляно-цукрове середовище не змі-

нює кількість накопичення меланінвмісної біомаси C cladosporioides 396. В порівнянні з прототипом запропоноване картопляно-цукрове середовище є доступне, просте за компонентним складом і значно дешевше, для приготування якого нема потреби в мінеральних речовинах середовища Чапека і кукурудзяному екстракті.

Переваги засіву поживного середовища, застосовуючи інокулюм, для одержання біомаси штаму C cladosporioides 396 в умовах глибинного культивування наведені в таблицях 2 і 3.

Таблиця 2

Вихідний посівний матеріал		Кількість середовища для одержання	
Вид	Кількість, мл (або пробірок)	Інокулюма, мл (або колб)	біомаси, мл (або колб)
Конідії 10 млн конідій/мл (прототип)	10 (одна)	не застосовували	200 (одна)
Вегетативний міцелій (прототип)	10 (одна)	не застосовували	200 (одна)
Інокулюм	10 (одна)	200 (одна)	4000 (двадцять)

Як свідчать дані таблиці 2, застосування інокулюму для одержання меланінвмісної біомаси C cladosporioides 396 забезпечує засів більшої кількості середовища меншим об'ємом посівного матеріалу, порівнюючи з прототипом. Це означає, що для засіву 4000мл середовища використовується

всього одна пробірка замість двадцяти з суспензією вихідного посівного матеріалу. Зміна умов посіву шляхом вирощування інокулюму дає можливість економити кількість витраченого середовища та лабораторного посуду.

Таблиця 3

Середовище	Кількість інокулюма, об. %		
	5	10	15
Картопляно-цукрове	12,8 ± 0,9	19,4 ± 1,1	19,0 ± 1,3
Чапека з 1% кукурудзяного екстракту (прототип)	19,6 ± 1,0	не застосовували	не застосовували

Наведені в таблиці 3 дані свідчать про оптимальне застосування 10об. % інокулюма для одержання меланінвмісної біомаси штаму C cladosporioides 396. При одержанні грибної біомаси в промислових масштабах це має важливе зна-

чення для економії посівного матеріалу. Крім того, ефект від застосування 10об. % інокулюма в картопляно-цукровому середовищі рівнозначно такому в прототипі при застосуванні 1% кукурудзяного екстракту.