



УКРАЇНА

(19) UA (11) 77366 (13) C2
(51) МПК (2006)
C12N 5/04
C12P 17/10

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИРОЩУВАННЯ КУЛЬТУРИ КАЛЮСНИХ ТКАНИН РАУВОЛЬФІЇ ЗМІІНОЇ RAUWOLFIA SERPENTINA BENTH. - ПРОДУЦЕНТА АЙМАЛІНУ

1

(21) a200511111
(22) 23.11.2005
(24) 15.11.2006
(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 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
(56) RU C1 2174555, 10.10.2001
SU A1 1167895, 27.10.1995
(57) 1. Спосіб вирощування культури калюсних тканин раувольфії зміїної Rauwolfia serpentina Benth. - продуцента 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 одного пасажу (циклу вирощування) на твердому живильному середовищі 5C наступного складу, мг/л:

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

2

Na ₂ EDTA	37 - 38
тіамін	0,8 - 1,2
сахароза	50000
агар	0,6 - 0,8%
вода	решта
pH до автоклавування	5,8 - 6,2,

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

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

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

2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що культуру тканин на агаризованому середовищі 5C вирощують від 5 до 10 - 12 пасажів, а потім переносять в рідке живильне середовище Рж, де вирощують калюсну тканину у вигляді глибинної культури протягом 20 - 35 діб.

(13) C2

(11) 77366

(19) UA

Винахід відноситься до галузі біотехнології і стосується способу вирощування калюсної культури тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. - продуцента аймаліну, який використовується в якості протиаритмічного лікарського засобу.

Найбільш близьким до пропонованого винаходу за кількістю суттєвих ознак є спосіб вирощування культури тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. - продуцента аймаліну, який включає вирощування біомаси культивованих клітин на живильних середовищах, позбавлених регуляторів росту /Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. - К.: Логос, 2005, 720 с./.

Описаний спосіб 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 пропонованого винаходу поставлено задачу створення такого способу 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 способом, який, як і відомий спосіб 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 винаходу, вирощування біомаси культивованих клітин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. виконують протягом одного пасажу (циклу вирощування) на твердому живильному середовищі 5С наступного складу, мг/л:

NH ₄ NO ₃	400 - 600
KNO ₃	1000 - 1200
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	800 - 1000
KCl	60-80
MgSO ₄ · 7H ₂ O	400 - 600
NH ₄ H ₂ PO ₄	500 - 700
(NH ₄) ₂ HPO ₄	50 - 150
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 - 400
KJ	0,8 - 0,9
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,2 - 0,3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,02 - 0,03

CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,02 - 0,03
MnSO ₄ · 5H ₂ O	21-23
H ₃ BO ₃	6,0 - 6,5
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	10 - 11
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27 - 28
Na ₂ EDTA	37 - 38
Тіамін	0,8 - 1,2
Сахароза	5000
Арап	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 ₄ NO ₃	200 - 400
KNO ₃	1000 - 1200
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	800 - 1000
KCl	60 - 80
MgSO ₄ · 7H ₂ O	400 - 600
NH ₄ H ₂ PO ₄	250 - 290
(NH ₄) ₂ HPO ₄	200 - 300
(NH ₄) ₂ SO ₄	150 - 250
KJ	0,8 - 0,9
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,2 - 0,3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,02 - 0,03
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,02 - 0,03
MnSO ₄ · 5H ₂ O	21 - 23
H ₃ BO ₃	6,0 - 6,5
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	10 - 11
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27 - 28
Na ₂ EDTA	37 - 38
Тіамін	0,8 - 1,2
Сахароза	2500
pH до автоклавування	5,8 - 6,2,
в якому калюсну тканину вирощують в глибинній культурі протягом 20-35 діб.	

Особливістю пропонованого способу 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 спосіб 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).

Спосіб 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 ₄ NO ₃	2300 - 2600
KNO ₃	250 - 350
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	800 - 1000
KCl	50 - 90
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1200 - 1400
NH ₄ H ₂ PO ₄	100 - 300
(NH ₄) ₂ HPO ₄	250 - 350
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 - 400

KJ	0,8 - 0,9
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,2 - 0,3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,02 - 0,03
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,08 - 0,12
MnSO ₄ · 5H ₂ O	21 - 23
H ₃ BO ₃	10 - 12
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	10 - 11
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27 - 28
Na ₂ EDTA	37 - 38
Тіамін	4 - 6
Сахароза	10000
Агар	0,6 - 0,8%
pH до автоклавування	5,8 – 6,2

Першим етапом вирощування за пропонованим способом є перенесення калюсної тканини штаму K-27 на інше агаризоване живильне середовище 5С за (3) без регуляторів росту наступного складу, мг/л:

NH ₄ NO ₃	400 - 600
KNO ₃	1000 - 1200
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	800 - 1000
KCl	60 - 80
MgSO ₄ · 7H ₂ O	400 - 600
NH ₄ H ₂ PO ₄	500 - 700
(NH ₄) ₂ HPO ₄	80 - 110
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 - 400
KJ	0,8 - 0,9
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,2 - 0,3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,02 - 0,03
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,02 - 0,03
MnSO ₄ · 5H ₂ O	21 - 23
H ₃ BO ₃	6,0 - 6,5
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	10 - 11
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27 - 28
Na ₂ EDTA	37 - 38
Тіамін	0,8 - 1,2
Сахароза	5000
Агар	0,6 - 0,8%
pH до автоклавування	5,8 – 6,2

Приготовлене середовище розливають по 50 мл у колби Ерленмейера об'ємом 250 мл, стерилізують в автоклаві гарячою парою при 1 атм 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 5С. Колби з висадженими на середовищі 10С експлантами ставлять у термостатоване темне приміщення (t⁰ = 25 - 28⁰С, відносна вологість повітря - 70 - 80%).

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

NH ₄ NO ₃	200 - 400
KNO ₃	1000 - 1200
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	800 - 1000
KCl	60 - 80
MgSO ₄ · 7H ₂ O	400 - 600
NH ₄ H ₂ PO ₄	250 - 290
(NH ₄) ₂ HPO ₄	20 - 30
(NH ₄) ₂ SO ₄	150 - 250
KJ	0,8 - 0,9
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,2 - 0,3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,02 - 0,03

CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,02 - 0,03
MnSO ₄ · 5H ₂ O	21 - 23
H ₃ BO ₃	6,0 - 6,5
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	10 - 11
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27 - 28
Na ₂ EDTA	37 - 38
Тіамін	0,8 - 1,2
Сахароза	2500
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 5С. 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 54-55⁰С і визначають 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 10С. 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 5С 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 10С в рідке середовище Рж позитивного ефекту не дають.

Висновок. Запропонований спосіб вирощування калюсної тканини штаму K-27 раувольфії змінює на спрощених за складом живильних середовищах без регуляторів росту, спочатку на агаризованому середовищі 5С, 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 вна-

слідок швидкого накопичення аймаліну в біомасі.

Таблиця

Динаміка накопичення аймаліну в сухій біомасі культури тканин штаму K-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, МПК 6 С12N5/04. Штам культивованих клітин раувольфії зміїної *Rauwolfia 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, МПК 6 С12N5/00, С12N5/02. 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 (*Rauwolfia serpentina* Benth.) // Растительные ресурсы, 1981, т. 17, №2, с. 217-224.