



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО

(19) UA (11) 2220 (13) C1

(51) C 12 N 15/00, C 12 P 17/00, C 12 P 23/00

ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІД(54) ШТАМ $K 2^+$ І $K 2^-$ ГРИБА *BLAKESLEA TRISPORA* – ПРОДУЦЕНТ БЕТА-КАРОТИНУ

1

(21) 93030192

(22) 28.01.93

(24) 14.01.94

(46) 26.12.94. Бюл. № 5-І

(56) Авторское свидетельство СССР
№ 1476900, кл. C 12 P 23/00, 1987.

(72) Стенько Алла Степанівна, Мацелюх Богдан Павлович, Кунщикова Інна Сергіївна, Горна Маргарита Степанівна, Безкоровайна Надія Карпівна, Бондар Ірина Володимирівна, Кунщикова Євгенія Олександрівна

(73) Стенько Алла Степанівна, Мацелюх Богдан Павлович, Кунщикова Інна Сергіївна, Горна Маргарита Степанівна, Безкоровайна Надія Карпівна, Бондар Ірина Володимирівна, Кунщикова Євгенія Олександрівна

2

(57) Штамм $K 2^+$ и $K 2^-$ гриба *Blakeslea trispora* ИМВ АН Украины № КРМ-35 – продуцент бета-каротина.

Изобретение относится к области медицины, сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Бета-каротин играет важную роль в обеспечении многих физиологических функций организма. Он обеспечивает нормальный рост организма и развитие плода, повышает активность половых гормонов, повышает устойчивость к инфекционным заболеваниям, обладает антимутагенной, антиканцерогенной и радиопротекторной активностями. Сопряженными двойными связями $C=C$ молекула бета-каротина поглощает разные свободные радикалы, защищая таким образом, клетку от мутагенного и канцерогенного действия ионизирующей радиации и химических мутагенов, кроме того, он широко применяется в лечебно-профилактических препаратах, в пищевой промышленности, в масложировой, кондитерской,

мясомолочной, пищевконсервной и других отраслях.

Известно использование в промышленном производстве бета-каротина штамм 64^+ и 490^- гриба *Blakeslea trispora*. По паспортным данным в лаборатории на колбах активность указанного штамма составляла 70000–100000 ед./100 мл культуральной жидкости (КЖ). При этом характер роста в условиях ферментации (закатывание в крупные шарики) ухудшает массообмен и при этом снижается продуктивность мицелия в единицу времени (мкг каротина в 1 г сухой биомассы). Позже был получен штамм $8A^+$ и $8A^-$, обладающий более высокой активностью образования бета-каротина (на 28% выше прототипа), однако не был оптимальным по продуктивности. Позже нами селекционирован штамм $K 1^+$ и $K 1^-$ [1] наиболее близко к предлагаемому изобретению, был получен методом последовательного мута-

(19) UA (11) 2220 (13) C1

генеза на реплицирующей ДНК гриба с использованием нитрозогуанидина в концентрации 200–500 мгк/мл при выживаемости 0,02–0,1% для K^+ и комбинированного действия УФ-облучения (выживаемость 5–7–10%) с нитрозогуанидином в указанной концентрации. Полученный штамм в условиях лаборатории на качалках обладал активностью 155520 ед/100 мл КЖ до 223790 ед/100 мл КЖ. В ферментерах цеха активность составляла от 156860 до 191210 ед/100 мл КЖ, что в среднем составляло 177000 ед/100 мл КЖ. Полученный штамм имел сокращенный цикл ферментации, однако уровень активности еще не удовлетворял требованиям производства и потребности в бета-каротине в частности.

Задачей изобретения была селекция высокоактивного штамма – продуцента бета-каротина, который бы более полно отвечал потребностям производства. На следующем этапе селекции были использованы как методы классических генетических подходов 3 мутагенез, так и методы клеточной инженерии – получение и регенерация протопластов. Для достижения поставленной цели разработана методика, состоящая в следующем: молодая физиологически активная форма гриба в 18–20 час возрасте обе (+) и (–) половые формы обрабатывались пищеварительным соком виноградной улитки в разных концентрациях и в комплексе с другими ферментами в средах с осмотическими стабилизаторами лучшими среди которых оказались 0,2–0,8 М мальтоза и сукцинат натрия. Титр протопластов составлял от 5,7 до $1,5 \cdot 10^6$, что позволяло проводить экспериментальные исследования. В результате тотального отбора и проведенных многократных проверок получен штамм K^+ и K^- , который на качалках имел активность от 195520 ед/100 мл КЖ до 243790 ед/100 мл КЖ. В условиях промышленного производства активность указанного штамма составляла от 280000 ед/100 мл КЖ до 390000 ед/100 мл КЖ.

Характеристика штамма K^+ и K^- . Гриб *Blakeslea trispora* относится к мукоровым грибам класс *Mucorales* (ранее вид *Choanephora* реидентифицирован в виде *Blakeslea trispora* на основе современных исследований Kirk, 1984 и описан в определителе *A monograph of the Choanephoraceae* (Mycological paper, Kew, England, 1984, N 152, p. 1–61).

Морфологические свойства.

Гифы нитевидные, мощные, часто с перетяжками образуя клубки. K^+ имеет хорошо развитый воздушный мицелий от серовато-желтого до желтого цвета. Суб-

стратный мицелий от серовато-оранжевого до желто-оранжевого с оранжевым окрасом субстрата. Отмечается интенсивное спорообразование. Бесполое спорообразование только спорангиальное, представлено стилоспорангиями и спорангиями. Стилоспорангии 50–100 мкм в диаметре. Спорангии – эллиптически-шаровидные 12х16 – 10х14 мкм, трехспоровые, многочисленные; спорангиоспоры также эллиптические 14х8 мкм светло-табачного цвета имеют продольную исчерченность. K^- – воздушный мицелий развит хорошо оранжево-желтого цвета или ярко-оранжевого цвета, субстратный мицелий – ярко-оранжево-красный и диффундирует цвет в среду.

Культуральные свойства.

Оптимальной средой роста гриба служит сусло-агар; гриб хорошо растет на мукоровом агаре, хуже – на МПА, на среде Чапека. Наиболее характерным является рост на сусло-агаре, где (+) вариант имеет субстратный мицелий светло-оранжевого или желтого цвета, а (–) форма – субстратный мицелий ярко-оранжевого до красного цвета. На месте стыка совместного роста обеих половых форм образуется зона ярко-оранжевого или ярко-оранжево-красного цвета шириной 15–25 мм. Этот признак является маркером заявляемого штамма и отличает его от исходного штамма и штамма 8 A^+ и 8 A^- . По указанному признаку штамм можно легко выделить среди большого набора штаммов.

Культивирование штамма K^+ и K^- .

Для глубинного культивирования на колбах использовались посевные и ферментационные среды:

состав посевной среды (в %):

мука соевая –	2,3
мука кукурузная –	4,7
KH_2PO_4 –	0,05
тиамин –	0,0002

вода водопроводная или дистиллированная сколько надо pH = 6,1–6,4

Среда разливается по 100 мл и 150 мл в колбы объемом 750 мл, стерилизуется в режиме 0,3 атм 90 мин. Засев (+) и (–) формами производится отдельно спорово-мицелиальной суспензией и выращивается 48 час на качалках при 220–240 об./мин (при 28°C). После переносится в ферментационную среду.

Состав ферментационной среды: (г/л)

зеленая патока –	38
кукурузный экстракт –	21,5
KP_2PO_4 –	0,05

тиамин – 0,0002 (можно без внесения витамина B_1 , так как кукурузный экстракт в

своем составе содержит комплекс витаминов группы В).

pH = 6,1–6,4. Условия стерилизации те же. Среда разливается в колбы по 60 мл и добавляется масло растительное (4,7%). За- 5 сев производится в соотношении 1: 10 (+) и (-) форм соответственно.

Способ поясняется примерами (получение бета-каротина).

П р и м е р: после выращивания (+) и (-) форм на посевной среде в течение 48 час при одинаковом накоплении биомассы К 2⁺ и К 2⁻ в соотношении 1:10 (в пересчете на биомассу – сухую) дается 1 МЛ К 2⁺ и 9 мл К 2⁻. 15 Общее количество посевного материала составляет 20% к объему среды для ферментации. Выращивается на качалках при 220–240 об/мин при 28°C, через 36 час вводится 0,1% бета-ионона – стимулятора каротино- 20 генеза и 0,01% антиоксиданта; процесс ферментации на качалках длится 96 час. После ферментации культуральную жидкость нагревали до 65°C в течение 2 ч 15 мин (для инактивации ферментов), фильтровали и в 25 биомассе определяли активность бета-каротина в мкг/100 мл культуральной жидкости по Викуловой с соавторами.

Результаты опытов, полученных на качалках в лабораторных условиях

Штамм К 2⁺ и К 2⁻

Активность бета-каротина мкг/100 мл КЖ

1 опыт	195520
2 "	196420
3 "	201420
4 "	211244
5 "	198640
6 "	199834
7 "	243790

Прототип К 1⁺ и К 1⁻ (он же исходный)

штамм	
1 опыт	155595
2 "	179343
3 "	150120
4 "	142893
5 "	140920
6 "	164140
7 "	172400

Таким образом, полученные результаты на колбах при культивировании в лабораторных условиях свидетельствуют, что актив- 30 ность штамма К 2⁺ и К 2⁻ на 40% выше ранее полученного штамма К 1⁺ и К 1⁻. В цехе в условиях промышленного культивирования активность составляла от 280000 ед/100 мл культуральной жидкости до 390000 ед/100 мл культуральной жидкости, тогда К 1⁺ и К 1⁻ составлял 180000–220000 ед/100 мл культуральной жидкости.

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор С.Патрушева

Замовлення 533

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Виробничо-видавничий комбінат "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]