



(51) МПК

C12P 19/04 (2006.01)*C12N 1/14* (2006.01)*C12R 1/645* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006100435/13, 10.01.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.01.2006

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2007

(45) Опубликовано: 10.12.2007 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: YANG F. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, Aug 1; 27(3-5): 295-301. DINADAUALA P., Revisiting the structure of the anti-neoplastic glucans of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin. *Structural analysis of the extracellular and* (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100 лет
Владивостока, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, патентный
отдел, Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Пивкин Михаил Викторович (RU),
Белогорцева Наталия Ивановна (RU),
Лукьянов Павел Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ТИБОХ ДВО
РАН) (RU)

(54) ШТАММ ГРИБА РНОМА GLOMERATA - ПРОДУЦЕНТ ПОЛИСАХАРИДА, ОБЛАДАЮЩЕГО ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения полисахарида, обладающего

иммуномодулирующей активностью. Изобретение позволяет повысить выход полисахарида, обладающего иммуномодулирующей активностью, снизить себестоимость. 1 табл.

(56) (продолжение):

boiling water extract-derived glucans of the vaccine substrains. *J. Biol. Chem.*, 2004., Mar 26; 279(13):12369-12378. ЖУРАВЛЕВА Н.В., Секретируемая N-ацетил-β-D-гексозаминидаза морского гриба *Phoma glomerata*, *Прикладная биохимия и микробиология*, 2004, т. 40, №5, с.520-526.

RU 2 312 148 C2

RU 2 312 148 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12P 19/04 (2006.01)*C12N 1/14* (2006.01)*C12R 1/645* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006100435/13, 10.01.2006**(24) Effective date for property rights: **10.01.2006**(43) Application published: **20.07.2007**(45) Date of publication: **10.12.2007 Bull. 34**

Mail address:

**690022, g.Vladivostok, pr-kt 100 let
Vladivostoka, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, patentnyj
otdel, N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Pivkin Mikhail Viktorovich (RU),
Belogortseva Natalija Ivanovna (RU),
Luk'janov Pavel Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**TIKHOKEANSKIJ INSTITUT
BIOORGANICHESKOJ KhIMII
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa
ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh DVO
RAN) (RU)**

(54) STRAIN OF FUNGUS PHOMA GLOMERATA AS PRODUCER OF POLYSACCHARIDE POSSESSING IMMUNOMODULATING ACTIVITY

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, medicine.

SUBSTANCE: invention relates to preparing a polysaccharide possessing the immunomodulating activity. Invention provides increasing yield of

polysaccharide possessing the immunomodulating activity and to reduce the cost. Invention can be used for preparing polysaccharide.

EFFECT: valuable properties of fungus strain.

1 tbl, 2 ex

RU 2 312 148 C2

RU 2 312 148 C2

Изобретение относится к биотехнологии и касается нового штамма гриба - продуцента полисахарида, обладающего иммуномодулирующей активностью.

Известен бактериальный штамм *Mycobacterium bovis* BCG, продуцирующий иммуномодулирующий полисахарид [Dinadayala P, Lemassu A, Granovski P, Cerantola S, Winter N, Daffe M. Revisiting the structure of the anti-neoplastic glucans of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin. Structural analysis of the extracellular and boiling water extract-derived glucans of the vaccine substrains // J Biol Chem. 2004. Vol.279. №13. P.12369-78]. Недостатком известного штамма является низкий выход целевого продукта.

В качестве прототипа выбран известный продуцент полисахарида - 1,3-β-D-глюкана, обладающего иммуномодулирующей активностью, штамм гриба *Ganoderma lucidum* CCRC 36123, поскольку этот штамм, как и заявляемый штамм, получают в культуре [Fan-Chiang Yang, Yn-Fuu Ke, Shanq-Shin Kuo Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures // Enzyme and Microbial Technology. 2000. Vol.27. P.295-301]. К недостаткам известного штамма можно отнести его низкую продуктивность в отношении биологически активного полисахарида - 182 мг/л среды.

В связи с тем что грибные полисахариды, относящиеся к группе глюканов, обладают иммуномодулирующими свойствами и поэтому представляют значительный интерес как перспективные иммуномодуляторы, ставится задача получения продукта с более высоким выходом.

Поставленная задача решена выявлением нового штамма гриба *Phoma glomerata*, продуцирующего полисахарид, обладающий иммуномодулирующей активностью.

Штамм *Phoma glomerata* выделен из морской лилии (*Crinoidea*), собранной на глубине 82 м возле острова Кунашир (Курильские острова).

Штамм *Phoma glomerata* хранится в Коллекции Морских Микроорганизмов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (официальный акроним КММ и номер 644 во Всемирной коллекции культур - WFCC) и ему присвоен коллекционный номер КММ 4632.

Штамм *Phoma glomerata* КММ 4632 характеризуется следующими свойствами. Культуральные и морфологические признаки.

Колонии гриба при выращивании на овсяном агаре быстро растущие, за 7 суток роста достигают 6,5 см в диаметре, колонии с обильным воздушным мицелием, войлочные, сначала белые, с возрастом темно-серые, с темно-оливковыми, почти черными секторами, обратная сторона колонии темно-серая, до черной. Пикниды от округлых до грушевидных, 80-310 мкм в диаметре, одиночные. Стенки пикнид черные, состоят из 4-5 слоев клеток угловатой структуры. Конидии от овальных до эллипсоидных, некоторые слегка изогнуты, 3,8-9×1,5-3 мкм, прозрачные, с возрастом культуры становятся коричневыми.

Хламидоспоры многоклеточные, альтернариоидные, темно-коричневые, 30-70×15-150 мкм.

Колонии гриба при выращивании на среде «сусло-агар на натуральной морской воде» серые, темно-серые до черных. Реверзум черный. Микроскопические признаки те же, что и на среде «овсяной агар».

Физиолого-биохимическая характеристика штамма.

Мезофилен. Оптимальная температура роста мицелия 30°C (28-32°C), алкалофилен, оптимальные значения pH для роста и образования полисахаридов 7,8-8,2.

Способен ассимилировать глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, ксилозу, D-манит, сорбит, сорбозу, рибозу.

Образует N-ацетил-β-D-гексозаминидазу, однако не образует хитиназу.

Способ и условия хранения штамма.

Штамм хранится под минеральным маслом на среде «картофельно-морковный агар, приготовленный на натуральной морской воде», при комнатной температуре и естественной влажности при условии пересева не реже, чем раз в четыре года, с пассированием на среде «сусло-агар с натуральной морской водой».

Новый штамм продуцирует полисахарид, обладающий иммуномодулирующими свойствами с выходом 245 ± 12 мг на 1 л питательной среды «Тубаки» и 328 ± 24 мг/л питательной среды «жидкое сусло на морской воде». Полисахарид представляет собой 1,3; 1,6- β -D-глюкан с молекулярной массой 110 kDa.

5 Технический результат штамма гриба *Phoma glomerata* KMM 4632 заключается в его более высокой продуктивности. Продуктивность этого штамма в два раза превосходит продуктивность известного грибного штамма *G.Lucidum*. Кроме того, преимуществом заявляемого штамма по сравнению с прототипом является то, что для его выращивания требуется среда с меньшим числом компонентов и, что особенно важно, на 40% меньшим
10 расходом сахаров (состав среды для выращивания *G.lucidum*, г/л: глюкоза, 50,0; K_2HPO_4 0,5; KH_2PO_4 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5; дрожжевой экстракт 1,0; хлорид аммония 4,0). В случае культивирования штамма на среде «сусло-агар на натуральной морской воде» сахар не требуется. Затраты на сахара составляют основную статью расходов на выращивание культур в промышленных масштабах. Таким образом, производство штамма гриба *Phoma glomerata* KMM 4632 с экономической точки зрения более выгодно по сравнению с
15 производством штамма - прототипа.

Новый штамм может использоваться для промышленного получения полисахарида, обладающего иммуномодулирующей активностью.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

20 Пример 1. Штамм *Phoma glomerata* KMM 4632 выращивают методом глубинного культивирования на питательной среде следующего состава, г/л натуральной морской воды (в трипликате): глюкоза 30; пептон 1; дрожжевой экстракт 0,5; KH_2PO_4 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02 (рН 7,8-8,2). Культивирование осуществляют при 22°C в колбах на качалке 180-200 об/мин в течение 168 часов.

25 Затем биомассу из культуральной жидкости (1 л) отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин и экстрагируют 200 мл дистиллированной воды при кипячении в течение 2 часов, после осаждения неэкстрагированного продукта центрифугированием при 8000 об/мин в течение 30 мин, целевой полисахарид осаждают 3 объемами 95% спирта. Выход полисахарида после высушивания составляет 245 ± 12 мг.

30 Пример 2. Штамм *Phoma glomerata* KMM 4632 выращивают методом глубинного культивирования на питательной среде «жидкое сусло на морской воде» следующего состава: сусло пивное неохмеленное, разбавленное натуральной морской водой до 4 градусов по Баллингу (рН 7,8-8,2). Культивирование осуществляют при 22°C в колбах на качалке 180-200 об/мин в течение 168 часов.

35 Биомассу из культуральной жидкости (1 л) отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин и экстрагируют 200 мл дистиллированной воды при кипячении в течение 2 часов, после осаждения неэкстрагированного продукта центрифугированием при 8000 об/мин в течение 30 мин, целевой полисахарид осаждают 3 объемами 95% спирта. Выход полисахарида после высушивания составляет 328 ± 24 мг.

40 Полисахарид, продуцируемый штаммом *Phoma glomerata* KMM 4632, был исследован на наличие иммуномодулирующей активности в сравнении со стандартным индуктором липополисахаридом *Escherichia coli* (LPS).

Данные сведены в таблицу.

45

Таблица		
Иммунотендерующая активность полисахарида, усиление синтеза фактора некроза опухоли-альфа (TNF) и NO-синтазной активности (NOS) клетками периферической крови человека		
Индуктор, 1 мкг/мл	Индекс усиления продукции ФНО (TNF)	Индекс усиления NOS
LPS	$2,2 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,2$
Полисахарид (пример 1)	$2,2 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$
Полисахарид (пример 2)	$2,5 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$

50

Формула изобретения

Штамм гриба *Phoma glomerata* (хранится в КММ ТИБОХ №4632) - продуцент

полисахарида, обладающего иммуномодулирующей активностью.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50