



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85337 (13) C2
(51) МПК (2006)
C12N 1/20
C12N 9/26
C12N 9/52
C12R 1/125 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ *BACILLUS SUBTILIS* - ПРОДУЦЕНТ ПОЗАКЛІТИННОЇ α -АМІЛАЗИ

1

(21) а200714207
(22) 18.12.2007
(24) 12.01.2009
(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.
(72) АВДІЮК КАТЕРИНА ВОЛОДИМИРІВНА, UA,
ВАРБАНЕЦЬ ЛЮДМИЛА ДМИТРІВНА, UA, САФ-
РОНОВА ЛАРИСА АНАТОЛІЇВНА, UA, БОРЗОВА
НАТАЛІЯ ВІКТОРІВНА, UA, МАЦЕЛЮХ ОЛЕНА
ВІКТОРІВНА, UA
(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ.
Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
НАУК УКРАЇНИ, UA

2

(56) SU 1717633 A1, 07.03.1992
SU 1200853 A, 23.12.1985
SU 1645291 A1, 30.04.1991
SU 1613491 A1, 15.12.1990
SU 661014 A1, 05.05.1979
UA 62610 A, 15.12.2003
UA 62462 A, 15.12.2003
US 4970158, 13.10.1990
BG 48513 A, 15.03.1991
(57) Штам бактерії *Bacillus subtilis* IMB B-7223 -
продуцент позаклітинної α -амілази.

Винахід відноситься до біотехнологічної про-
мисловості, а саме до одержання нового штаму,
продуцента фермента α -амілази.

α -Амілаза займає одне з провідних місць за ін-
тенсивністю використання у різних галузях
народного господарства: у харчовій,
фармацевтичній, хімічній промисловостях, у
медицині, ензимодіагностиці, наукових
дослідженнях. Особливості технологічних процесів
у яких беруть участь амілолітичні ферменти, а
саме спиртове, крохмаль-патокове, текстильне
виробництво, потребують використання фермент-
них препаратів, стійких до факторів реакційного
середовища, а саме температури та кислотності. В
останні роки для вдосконалення багатьох тех-
нологічних процесів все частіше використовують
амілази мікроорганізмів, що пояснюється
надвисокою продуктивністю мікроорганізмів на
фоні дешевизни та доступності сировини. Однак
для отримання максимального виходу ферменту
важливе значення має не лише вибір
високоактивного продуцента, але й створення
оптимальних умов культивування. Випробовува-
ний штам бактерії *Bacillus subtilis* 1MB B-
7223 - продуцент позаклітинної α -амілази, ізолю-
ваний з ґрунту у 1986р., знаходиться в колекції
живих культур Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного.

На світовому ринку відомі такі термостабільні
амілолітичні препарати, як «Така-Терм», який ви-
пускається американською фірмою «Miles», і дат-
ський препарат «Термаміль» фірми «Novo» [1]. На
Україні потреби у ферментних препаратах різної
специфічності задовольняються переважно за
рахунок ферментів закордонного виробництва.

Найбільш близьким до винаходу за технічною
сутністю та результатом, що досягається є штам
Bacillus licheniformis [2], при глибинному культиву-
ванні якого в певних умовах можна одержати фе-
рментний препарат з α -амілазою 1,78Од/мл/хв,
пулулазною - 0,68Од/мл/хв, α -глюкозидазною -
3,49Од/мл/хв активностями. Однак запропонова-
ний штам відрізняється стабільністю фізіологічних
показників росту та більш високою термостабільні-
стю.

Культурально-морфологічні властивості про-
дуцента. Грампозитивні, аеробні, спороутворюючі
палички, які продукують каталазу. На МПА, сусло-
агарі, середовищі Громико росте рясно, утворюю-
чи матові складчасті колонії бежевого кольору. В
мазках з колоній, що виростили на МПА через 18 год
можна побачити прямі паличковидні клітини розмі-
ром 0,8х2,7мкм, які розташовані поодинокі, зрідка
ланцюгом. Клітини рухливі, утворюють спори ова-
льної форми, при спороутворенні не роздувають-

(19) UA (11) 85337 (13) C2

ся. Після росту на глюкозному агарі у протоплазмі глобули не утворюються. На МПБ культура утворює плівку.

Фізіолого-біохімічні властивості. Штам не росте в анаеробних умовах і при 10% NaCl, не гідролізує сечовину, не продукує аргинінгідролазу, дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера, росте у присутності 7% NaCl, гідролізує крохмаль на казеїн, розріджує желатину. Ферментує глюкозу, арабінозу, ксилозу, маніт з утворенням кислоти без газу. Редує нітрати, не має коагулазної та лецитиназної активностей.

Відношення до вуглецевого живлення: культура добре засвоює широке коло вуглеводних субстратів: маніт, глюкоза, сахароза, фруктоза, маноза, рафіноза, арабіноза, ксилоза, картопляний крохмаль, соєве борошно, розчинний крохмаль, трегалоза, рамноза, галактоза, лактоза (у порядку зростання питомої активності ферменту), більшість з яких забезпечує також і синтез α -амілази. Картопляний крохмаль у концентрації 0,1% у середовищі росту викликає підвищення амілолітичної активності культури у 8 разів.

Відношення до азотного живлення: краще засвоює нітратний азот. Із органічних джерел азоту асимілює сечовину та гліцин. Біосинтетичну активність забезпечує нітрат натрію.

Штам нетоксичний, авірулентний.

Відношення до кисню: облигатний аероб.

Відношення до температури: мезофіл, оптимальна температура для росту та біосинтезу ферменту 37-42°C.

Відношення до кислотності поживного середовища: культура росте в діапазоні pH від 6,0 до 10,0. Оптимальне вихідне значення pH середовища для синтезу ферменту становить 7,0.

Поживним середовищем для ферментації є середовище наступного складу, (г/л): NaNO_3 - 2; KH_2PO_4 - 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl - 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,015, картопляний крохмаль - 1, вихідне значення pH - 7,0.

Вирощування культури проводять в глибинних умовах у колбах Ерленмейєра (500мл) на качалці, що робить 220об/хв (рівень аерації 8,5мг O_2 /лхгод) при 42°C протягом 4-6 діб. Засів поживного середовища проводили 5%-вим добовим інокулюмом. Біомасу відділяли центрифугуванням, ферментативну активність визначали у супернатанті. Як субстрат для визначення активності використовували розчинний крохмаль (ООО "Хімлаборреактив").

Для визначення амілолітичної активності брали 2 пробірки і наливали в кожну по 2мл 1% розчину крохмалю (субстрату), інкубували в термостаті при температурі (30±2°C), 5-10хв. Потім, не виймаючи пробірки з термостату, додавали в першу 1мл дистильованої води (контрольна пробірка), в другу - 1мл робочого розчину ферменту (дослідна пробірка). Суміші швидко перемішували і витримували в термостаті протягом 10хв, використовуючи секундомір. Далі з кожної пробірки по чергово відбирали по 0,1мл розчину і переносили в пробірки, які містили 10мл робочого розчину

йоду. Вміст пробірок перемішували. Через 5-10хв після змішування визначали оптичну щільність розчину колориметричним методом при 670нм в кюветах з товщиною поглинаючого світла 5мм. Контрольним розчином при колориметру ванні була дистильована вода (ГОСТ 20264.4-89). За одиницю активності приймали здатність ферменту при певних значеннях температури, pH і часу дії каталізувати до декстринів різної молекулярної маси 1 г крохмалю (температура 30±2°C).

Для визначення протеолітичної активності використовували наступну методику. До 1мл фосфатного буфера (pH 7,5) додавали 1мл казеїну та 0,5мл ферментного розчину. У контрольну пробу наливали 1,5мл фосфатного буфера та 0,5мл казеїна. Пробірки витримували протягом 30хв при 37°C. Реакцію зупиняли додаванням 2,5мл трихлороцтової кислоти (10%). Залишки казеїну відфільтровували. Оптичну густину вимірювали на СФ при 276нм.

Як субстрати для визначення глікозидазних активностей використовували пара-нітрофенільні похідні цукрів. Для визначення активності до 0,1мл розчину ферменту додавали 0,2мл 0,1М фосфатного буфера (ФБ) pH 6,0 та 0,1мл 0,01М розчину субстрату у ФБ. Реакційну суміш інкубували протягом 10хвилин при температурі 37°C. Реакцію зупиняли додаванням 2мл 1М розчину бікарбонату натрію. Кількість пара-нітрофенолу, яка було відщеплена у результаті гідролізу, визначали колориметричним методом за поглинанням при 400нм.

Активність α -амілази у культуральній рідині штама-продуцента складає 0,81Од/мл. Загальна протеолітична активність складає 1,52ПА/мл. Також у культуральній рідині присутня (3-галактозидазна активність - 0,1Од/мл.

Фермент у вигляді культуральної рідини активний у діапазоні pH від 5,0 до 9,0, та у температурному діапазоні від 4 до 100°C (pH 8,2), з максимальною активністю при 90°C. Термостабільний, тобто при 60°C (pH 5,2) зберігається 100% активності протягом 180хв, у присутності CaCl_2 та NaCl зберігається 90% від максимальної активності при інкубації протягом 120хв при температурі 90°C.

Встановлено, що при зберіганні та пересівах протягом 5 років рівень ферментативної активності штаму *B. subtilis* 147 не знижується.

Штам зберігається у ліофілізованому стані та на твердих середовищах - МПА, Громико (МПА+сусло-агар), агаризованому середовищі Гаузе №2 під шаром стерильного вазелінової олії. Пересів 1 раз на рік.

Перевагою запропонованого продуцента є його здатність синтезувати високоактивну та термостабільну α -амілазу.

Запропонований фермент може знайти використання у харчовій промисловості, пивоварінні, текстильній промисловості.

Таким чином, виділено новий штам, який, у порівнянні з відомими, має інші культуральні ознаки і є новою культурою зі стійкими біохімічними властивостями.

Література:

1. Люджус Л.Л., Чекуленева Т.М., Куинский Д.Г. и др. Состояние производства и применение ферментных препаратов за рубежом. - М.: ВНИИ-СЭНТИ, 1986. - 72с.

2. Кичакова НА. Выделение и изучение свойств термостабильной α -амилазы *Bacillus* sp.: Автореф. дис. канд.биол.наук. – Киев, 1991. - 16с.