



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **91567**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 11/14** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 00985**

(22) Дата подання заявки: **03.02.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.07.2014**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.07.2014, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Болоховський Владислав Вікторович  
(UA)**

(73) Власник(и):

**ПРИВАТНЕ ПІДПРИЄМСТВО "БТУ-  
ЦЕНТР",**

вул. Будівельників, 35, м. Ладижин,  
Вінницька обл., 24321 (UA)

## (54) ШТАМ *BACILLUS MACERANS* - ПРОДУЦЕНТ ПЕКТОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

(57) Реферат:

Штам бактерій *Bacillus macerans* IMB B-7462, який продукує комплекс пектолітичних ферментів.

**UA 91567 U**



Корисна модель має відношення до мікробіологічної промисловості і стосується нового штаму-продуцента пектолітичних ферментів (ПТФ), до складу яких входить пектат-транселіміназа (ПТЕ), ендополігалактуроназа (ендо-ПГ), екзополігалактуроназа (екзо-ПГ), пектин-естераза, ксиланаза,  $\beta$ -глюконаза, амілаза, протеаза, які використовуються у сільському господарстві для підвищення засвоюваності кормів у сільськогосподарських тварин і птиці, для одержання мультиензимних композицій і преміксів, що застосовуються для вищевказаних цілей, а також в інших галузях промисловості.

Відомі штами *Bacillus macerans*, які використовуються для одержання пектолітичних ферментів - штам *Bacillus macerans* IMB B-7086 (патент України № 67069, 2006 р.), *Bacillus macerans* ЦМГМ B-2692 (авторське свідоцтво СРСР № 1162224, 1984 р.), які в умовах глибинного культивування утворюють комплекс мацеруючих ферментів, у тому числі ПТЕ 900-3000 од./см<sup>3</sup>, ендो-ПГ 6,5-250 од./см<sup>3</sup>, екзо-ПГ 5,0-80 од./см<sup>3</sup>. Максимальний вміст ферментів в культуральній рідині досягається на 18-20 годину культивування.

Найбільш близьким за своїми якостями до запропонованого нами є штам *Bacillus macerans* 1MB B-7086 (номер депозитора 2702 Л, патент України № 67069, оп. 16.10.2006). Основним недоліком штаму-прототипу є невеликий рівень накопичення пектат-транселімінази та супутніх ферментів та малий інтервал розбігу оптимального рН при культивуванні, що не відповідає потребам виробництва.

Задачею корисної моделі є пошук серед бактерій *Bacillus macerans* штаму-продуцента пектолітичних ферментів, здатного накопичувати високий рівень цільового продукту.

Проблема вирішується тим, що використовується штам *Bacillus macerans* 1MB B-7462 (номер депозитора 2810 Л), який характеризується високою швидкістю росту та біосинтетичною активністю і здатний накопичувати до 40000 од./см<sup>3</sup> пектат-транселімінази з широким спектром супутніх ферментів: ендополігалактуроназа (ендо-ПГ), екзополігалактуроназа (екзо-ПГ), пектин-естераза, ксиланаза,  $\beta$ -глюконаза, амілаза, протеаза.

Штам виділено методом направленої селекції зі штаму *Bacillus macerans* IMB B-7086 (номер депозитора 2702 Л).

Штам депоновано в депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером 1MB B-7462. Штам зберігають на агаризованому картопляному середовищі під вазеліновим маслом за температури (4-6)°C до 1 року; в атмосфері рідкого азоту з кріопротектором, який складається з: желатини - 2,5 %, глюкози - 2,5 %, без обмеження терміну зберігання; в стерильному піску протягом 5 років.

Запропонований штам має наступні культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки:

Культурально-морфологічні ознаки: Клітини грампозитивні рухомі палички, розміром (3,0-4,0) x (0,8-1,0) мкм. Утворюють спори еліпсоїдної форми розміром (1,1-1,8) мкм, які розміщуються центрально або субтермінально.

При рості на чашках з картопляним агаром створює бежеві колонії діаметром (5-8) мм, плескаті, матові, непрозорі, край нерівний непрозорий. Структура зерниста. На м'ясопептонному агарі (МПА) колонії діаметром (2,0-5,0) мм, плескаті, матові, непрозорі, від світло-бежевого до бежевого кольору, край нерівний, центр незначно вищий. Структура зерниста, середньозерниста. На сусло-агарі колонії плескаті, матові, центр слабоблискучий, край нерівний. Фізіолого-біохімічні ознаки: Факультативний анаероб. Каталозопозитивний. Асимілює глюкозу, сахарозу, галактозу, фруктозу. Гідролізує казеїн, крохмаль, Відтворює нітрати. Не утворює індол.

Оптимальна температура росту (35-40)°C, оптимум рН 7,5-8,3.

Галузь застосування штаму - біотехнологія.

Активність штаму: в лабораторних умовах при рості на середовищі складу, %: екстракт кукурудзяний - 0,75, жом буряковий - 2,75, сечовина - 0,75, калій сірчанокислий - 0,2, кальцій хлористий - 0,25, калію гідроокис - 0,2. Час культивування (18-20) годин за температури (38-40)°C пектат-транселіміназна активність складає 40000 од./см<sup>3</sup>, ендो-ПГ - до 300 од./см<sup>3</sup>, екзо-ПГ - до 1100 од./см<sup>3</sup>. Активність визначають вимірюванням на спектрофотометрі продуктів пектолізу за довжини хвилі (230-235) нм в ультрафіолетовому спектрі.

Як джерело азоту використовує пептон, кукурудзяний екстракт, дріжджовий автолізат, амонійні солі. Росте на суслі, картопляному, м'ясопептонному агарах.

Не ауксотрофний, стійкий до фагів, непатогенний.

Максимум накопичення пектат-транселімінази (40000 од./см<sup>3</sup>) досягається на (18-20) години росту.

Отримання пектолітичних ферментів з використанням штаму *Bacillus macerans* 1MB B-7462 відбувається наступним чином.

Культуру вирощують на середовищі, яке містить джерело вуглецю, азоту та мікроелементи (жом буряковий, екстракт кукурудзяний, дріжджі кормові, калій сірчаноокислий, сечовину, кальцій хлористий, калію гідроокис. Як вихідний матеріал використовують 22-годинну культуру, що виросла на картопляному агарі при температурі  $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Розмноження культури проводять у 750 мл колбах з 150 мл середовища (за складом аналогічним ферментаційному середовищу) при  $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$  в умовах аерації на качалках 180 об./хв протягом (18-24) годин. Посівний матеріал асептично вносять в колби з ферментаційним середовищем. Ферментацію проводять в колбах на качалках при температурі  $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$  та pH середовища 7,8 в умовах аерації на качалках 180 об./хв протягом (18-20) годин. В кінці культивування визначають ПТЕ - вона дорівнює 38000-40000 од./см<sup>3</sup>.

Приклад 1. Клітини штаму *Bacillus macerans* 1MB B-7462, а також штаму-прототипу IMB B-7086, вирощені при 40 °C протягом 1 доби на картопляному агарі, петлею вносять в колби об'ємом 750 мл з 150 мл поживного середовища наступного складу, мас. %: як джерело вуглецю жом буряковий - 2,75, а також мінеральні солі, як джерела азоту кукурудзяний екстракт - 0,75, сечовина - 0,75.

Культивування проводять на обертаючій качалці (180 об./хв), при температурі 40 °C і pH 8,0 протягом 18-22 годин. Вирощеним і перевіреном на чистоту інокулюмом засівають (5,0 %) ферментаційне середовище і вирощують 22 години при тих самих умовах, що й інокулюм.

Накопичення основного ферменту пектат-транселімінази в культуральній рідині визначають вимірюванням на спектрофотометрі. Активність пектат-транселімінази у штамі-прототипі складає 6100 од./см<sup>3</sup>, у штамі *Bacillus macerans* IMB B-7462-32000 од./см<sup>3</sup>.

Приклад 2. Вирощування посівного матеріалу та ферментацію штамів 1MB B-7462 нта IMB B-7086 проводять по прикладу 1, скорочуючи час культивування до 18 годин.

Результати по рівню накопичення пектат-транселімінази та супутніх ферментів в культуральній рідині наведено в таблиці 1.

Таблица 1

Накопичення на стадії біосинтезу	Штам-прототип	Запропонований штам
Пектат-транселімінази, од./см <sup>3</sup>	4500	34000
Ендо-ПГ, од./см <sup>3</sup>	80	290
Екзо-ПГ, од./см <sup>3</sup>	150	190
Ксиланази, од./см <sup>3</sup>	30	40
Пектин-естерази, см <sup>3</sup>	сліди	35
$\beta$ -глюконази, см <sup>3</sup>	немає	10
Лужна протеаза, см	немає	220
Амілаза, см <sup>3</sup>	немає	25

Селекція штаму *Bacillus macerans* - продуцента пектолітичних ферментів дозволяє одержати високопродуктивний штам з активністю ПТЕ до 40000 од./см і широким спектром супутніх ферментів: ендopolігалактуроназа (ендо-ПГ), екзopolігалактуроназа (екзо-ПГ), пектин-естераза, ксиланаза,  $\beta$ -глюконаза, амілаза, протеаза. При цьому за рівнем ПТЕ і ендо-ПГ штам перевищує відомі аналоги в 5-10 разів, синтезований штамом мультиензимний комплекс активний в лужному та нейтральному середовищі, ефективно розщеплює як високометоксильований пектин, так і деметоксильовану пектову кислоту.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам бактерій *Bacillus macerans* IMB B-7462, який продукує комплекс пектолітичних ферментів.

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601