



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102308** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
C12N 1/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 03800	(72) Винахідник(и): Авдєєва Лілія Василівна (UA), Хархота Максим Андрійович (UA), Осадча Антоніна Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.04.2015	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03680 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.10.2015	(74) Представник: Піскова Олена Вілліївна, реєстр. №289
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.10.2015, Бюл.№ 20	

(54) ШТАМ *BACILLUS SUBTILIS* - ПРОДУЦЕНТ КОМПЛЕКСУ ФЕРМЕНТІВ З ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ

(57) Реферат:

Штам *B. subtilis* IMB B-7516 - продуцент комплексу ферментів з целюлозолітичною активністю.

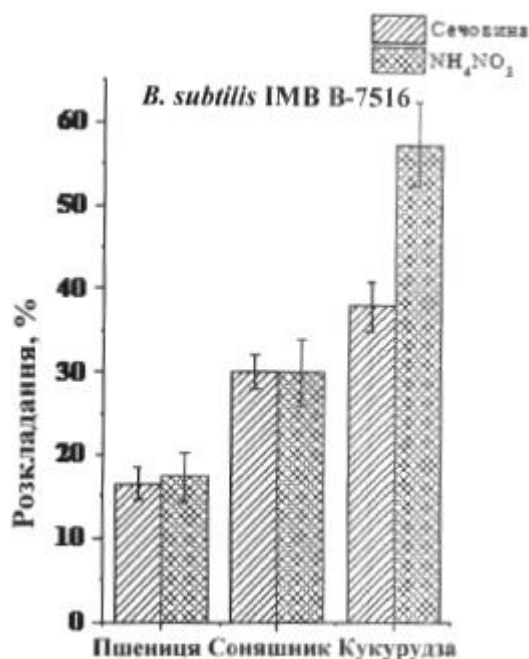


Fig. 1

UA 102308 U

Корисна модель належить до сільськогосподарської мікробіології та біотехнології, а саме до нового штаму мікроорганізмів *Bacillus subtilis*, що продукує целюлозолітичні ферменти, та може використовуватися у сільському господарстві для переробки целюлозовмісних матеріалів, зокрема поживних залишків.

Целюлоза являє собою полісахарид, що є головним компонентом клітинних стінок вищих рослин та водоростей. Целюлоза - це полімер, що складається з ланцюгів молекул β -D-глюкози, з'єднаних β -1,4-глікозидними зв'язками. Ланцюги, у свою чергу, об'єднані в пучки (волокна). Волокна організовані таким чином, що гідрофільні групи целюлозних ланцюгів захищені від зовнішніх впливів. Волокна, крім того, оточені оболонкою, до складу якої входять віск і пектин. Все це надає целюлозним волокнам механічну міцність, робить їх не розчинними у воді та стійкими до різних хімічних впливів. Розкласти целюлозу в анаеробних та аеробних умовах здатні еубактерії, що відносяться до різних таксономічних груп: окремі представники роду *Clostridium*, ряд актиноміцетів, міксобактерії, деякі бактерії роду *Pseudomonas*, корінеформні бактерії, що відносяться до роду *Cellulomonas*, постійні мешканці шлунка жуйних тварин, що відносяться до родів *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio* та інші. Усі ці мікроорганізми об'єднують здатність синтезувати ферменти, що розщеплюють целюлозу.

Ферментативне розкладання целюлози здійснюється за допомогою целюлазного комплексу та складається з декількох етапів. Спочатку ендо- β -1,4-глюканаза розриває глікозидні зв'язки всередині целюлозного ланцюга, що призводить до утворення досить великих фрагментів з вільними кінцями. Потім екзо- β -1,4-глюканаза каталізує відщеплення від кінця ланцюга дисахариду целюбіози. І, нарешті, остання гідролізується до глюкози за допомогою β -глюкозидази.

Розкладання целюлози в аеробних умовах призводить до подальшого метаболізму глюкози в системі катаболічних процесів з надходженням водню (електронів) в дихальний ланцюг і переносу їх на O_2 .

Таким чином, целюлази (целюлолітичні ферменти) належать до класу гідролаз, що каталізують гідроліз 1,4-глікозидних зв'язків в молекулі целюлози з утворенням ряду олігосахаридів різного ступеня полімеризації аж до мономера глюкози.

Розрізняють два основних типи целюлаз: ендоглюканази (1,4-глюкан-4-глюканогідролази, ендо-1,4-глюканаза) і целобіогідролази (1,4-D-глюкан-4-целобіогідролази, екзоцелобіогідролази), що відрізняються за характером дії на молекули целюлози і, як правило, діють спільно.

Целюлази першого типу гідролізують зв'язки у молекулі целюлози та деяких її розчинних похідних (карбоксиметил-, гідроксietилцелюлоза та ін.) невпорядкованим чином, утворюючи набір полі- та олігомерних фрагментів різної довжини. Вони каталізують також реакцію трансглікозилювання (приєднання частини розщеплюваної молекули полі- або олігосахариду до кінцевого невідновлювального ангідроглюкозного залишку полі- або олігомерної молекули субстрату). Целюлази другого типу гідролізують молекули целюлози, утворюючи майже виключно целюбіозу, яку вони відщеплюють від невідновлювальних кінців полісахариду. Характерна властивість двох типів целюлаз - наявність синергізму при їх спільній дії на високовпорядковані форми целюлози (бавовняне волокно, мікрокристалічна целюлоза).

Продуценти целюлозолітичних ферментів, які каталізують розщеплення целюлози, можуть використовуватися для біодеградації целюлозо- та геміцелюлозовмісних субстратів, у тому числі відходів промисловості та сільського господарства, для конверсії рослинної біомаси та одержання цукрів та біоетанолу, для деструкції живих та мертвих клітинних стінок рослин, для гідролізу полісахаридів, відмінних від крохмалю, у харчовій промисловості, пивоварінні та при силосуванні кормів для збагачення їх доступними формами вуглеводів. Особливо перспективним зараз вважається застосування штамів, що синтезують целюлозолітичні ферменти, для утилізації поживних залишків, які передбачають більш повне їх залучення в біологічний кругообіг. Такі штами дозволяють прискорити процес деструкції та гуміфікації різноманітних органічних речовин, зокрема целюлози.

У патенті UA62219 (опубл. 25.08.2011) описується штам *Cellulomonas* sp. 3-1 IMB B-7303, який призначений для деструкції целюлози паперу. Основною особливістю штаму є його висока активність щодо розкладання целюлози в присутності жирів та білків. Одним з недоліків вказаного штаму є те, що він в основному є ефективним для розкладання паперу при очищенні промислових та побутових стічних вод та є непридатним для осінньої та весняної обробки ґрунту з метою ферментації рослинних залишків зібраного врожаю.

Патент UA95427 (опубл. 25.12.2014) описує штам гриба *Chaetomium globosum* IMB F-100063, призначений для одержання комплексу целюлаз з метою розкладання рослинних решток та підвищення урожайності сільськогосподарських культур. У лабораторному досліді

вивчали здатність гриба розкласти соломку озимої пшениці. Ефективність деструкції за результатами лабораторного експерименту складала 31,5 %. Проте представники *C. globosum* являють собою алергени для людини та можуть виступати як опортуністичні агенти нігтьового панарицею та неврологічних інфекцій.

З патенту RU2287571 (опубл. 20.11.2006) є відомими штам міцеліального гриба *Trichoderma longibrachiatum* ВКМ F-3865D, що є продуцентом комплексу карбогідраз, що містить целюлази, бета-глюканазу, ксиланазу, мананазу та пектиназу. Даний винахід є вибраним як прототип заявленої корисної моделі. Проте ефективність вказаного штаму знижується при високих температурах, крім того, значний вплив на активність штаму виявляє також значення pH. Крім того, використання мікроорганізмів роду *Trichoderma* є обмеженим їх властивістю спороносити у культурі, що може призвести до забруднення навколишнього середовища та створювати загрозу для споживача такої продукції.

Задача даної корисної моделі полягає у створенні штаму-продуцента ферментів з целюлозолітичною активністю, який є термостабільним та стійким у широкому діапазоні значень pH.

Вказана задача вирішується за рахунок одержання нового штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7516, який є продуцентом комплексу ферментів з целюлозолітичною активністю.

Штам *Bacillus subtilis* IMB B-7516 ізолюваний із лікувальних грязей озера Грутас (Литва) та класифікований у відповідності з Берджі (Определитель бактерий Берджи, 9-ое изд., М.: Мир, 1980).

Штам отримують шляхом посіву на поживні середовища: МПА, ТСА, сусло-агар, Гаузе № 2, КА та ін.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості заявленого штаму: Грампозитивні аеробні спороутворюючі палички, які продукують каталазу. На МПА, ТСА, Гаузе № 2, середовищі Громико, картопляному агарі відмічено значний ріст.

На МПА утворює складчасті колонії, консистенція пастоподібна, брудно-білого чи білого кольору, краї правильної форми.

На ТСА утворює складчасті колонії з підвищеним центром, консистенція пастоподібна, краї правильної форми.

На картопляному агарі - колонії брудно-білого кольору - консистенція пастоподібна, краї рівні, середовище навколо колонії забарвлюється в сірий або чорний з зеленуватим відтінком колір внаслідок продукції позаклітинних меланіноподібних пігментів.

В мазках з колоній, які вирости на ТСА, через 18 годин можна побачити прямі паличковидні клітини $2,5 \times 0,4$ мкм, які розташовані поодинокі, парно та ланцюгом. Клітина при спороутворенні не роздувається, після росту на глюкозному агарі в протоплазмі вакуолі не утворюються.

На МПБ культура утворює плівку. Ферментує глюкозу, фруктозу, арабінозу, маніт, ксилізу з утворенням кислоти, дає позитивну реакцію Фогеса-Проскауера, гідролізує ескулін, крохмаль, казеїн, желатину, росте при 7 % NaCl, не утилізує цитрат, не використовує пропіонат. Культура не росте в анаеробних умовах і при 10 % NaCl, не утворює газу з NO_3^- в анаеробних умовах. Каталазна та оксидазна реакції позитивні.

Продукт, що синтезується штамом, являє собою комплекс гідролітичних ферментів, що здатні розщеплювати целюлозовмісні рослинні рештки.

В лабораторних умовах штам *Bacillus subtilis* IMB B-7516 здатний розщеплювати рослинні рештки на 20-60 % в залежності від їх типу.

Умови культивування: культивується на таких середовищах, як сусло-агар, МПА, середовище Громико, картопляний агар.

Спосіб визначення: Штам культивується на мінеральному середовищі з додаванням поживних залишків (1-2 %) в якості єдиного джерела карбону. По закінченню культивування (10-12 діб) відзначається зменшення маси рослинних решток на 15-20 % для пшеничної соломи, 40-60 для кукурудзи та соняшника.

Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового культивування штаму: зберігається на середовищі сусло-агар, Громико (МПА+СА), агаризованому середовищі Гаузе № 2 під шаром стерильного вазелінового масла. Пересів 1 раз в рік.

Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму: розмноження можна проводити на середовищах аналогічного складу.

Відомості про патогенність: штам не патогенний для теплокровних тварин.

Приклад 1. Вирощування штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7516

Культивування бактерій *Bacillus subtilis* IMB B-7516 здійснювали в колбах місткістю 750 мл з 100 мл середовища на качалці (220 об/хв.) при 37 °C, pH 5,0-9,0 (оптимальне значення pH 6,0-

8,0) упродовж 18-36 год. на рідкому мінеральному середовищі наступного складу (г/л): K_2HPO_4 - 6,0; KH_2PO_4 - 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2, $(NH_4)_2SO_4$ - 1,15. Як джерело вуглецю та енергії використовували глюкозу (10 г/л), натрієву сіль карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) 0,5 %, фільтрувальний папір 1 %, бавовняну вату 1 %, целобіозу 1 %, пшеничну солому 1 %, соняшник 1 % та кукурудзу 1 % (мас). Як посівний матеріал використовували добову культуру вказаного штаму, вирощену на МПА, а також культуру в експоненціальній фазі росту, вирощену на середовищі, яке має приведенний вище склад. Як джерело вуглецю і енергії при одержанні посівного матеріалу використовували глюкозу. Посівний матеріал вносили з розрахунку 5 об. % мікробної суспензії, оптична густина якої становила 10 од. за стандартом мутності ДІСК ім. Л.А. Тарасевича.

Приклад 2. Дослідження целюлозолітичної активності штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7516 при різних температурах та значеннях pH.

Ферментативну активність *Bacillus subtilis* IMB D-7516 в умовах глибинного культивування визначали в безклітинних центрифугатах культуральних рідин після вирощування на синтетичному середовищі з заміною глюкози на відповідний субстрат-індуктор. Для індукції синтезу целюлозолітичних ферментів використовували як целюлозу та її похідні (Na-КМЦ, бавовняна вата, фільтрувальний папір, целобіоза), так і целюлозовмісні рослинні рештки (пшенична солома, кукурудза, соняшник).

Активність ферментів вивчали за дією на субстрат (Na-КМЦ, фільтрувальний папір, бавовняна вата, целобіоза, ксилан, пектин) в реакційній суміші при 50 °C протягом 1 год. Реакційна суміш містила 2,5 мл розчину субстрату в фосфатному буфері (pH 8,0) та 1 мл ферментного розчину (у вигляді супернатанту). Супернатант отримували шляхом центрифугування (6000 об./хв. упродовж 20 хв.) культуральної рідини досліджуваного штаму.

За одиницю активності ферментів приймали таку кількість ферменту, яка каталізувала утворення 1 мг глюкози та ксилози в інкубаційній суміші за 1 год. при 50 °C. Редукуючі речовини визначали модифікованим методом Шомоді-Нельсона. Для визначення ендоглюканазної (КМЦ-азної) активності застосовували спосіб, що базується на збільшенні редукуючої здатності реакційної суміші з 0,5 % Na-КМЦ. Екзоглюканазну активність вимірювали за кількістю редукуючих цукрів, що утворювались при гідролізі бавовняної вати та фільтрувального паперу, відповідно. Целобіазну активність визначали за збільшенням редукуючої здатності реакційної суміші з 0,2 % розчином целобіози у 1/15 М фосфатному буфері. Реакційна суміш складалася з 2 мл відповідного субстрату в буфері та 1 мл розчину ферменту (культуральної рідини). Дані стосовно ферментативної активності запропонованого штаму в інтервалі значень pH від 4 до 9 приведені у Таблиці 1. У досліді також визначали ферментативну активність запропонованого штаму за високих температур (дані представлені у Таблиці 2).

Таблиця 1

Активність целюлозолітичних ферментів *B. subtilis* IMB B-7516 при різних значеннях pH

pH середовища	Ендоглюканазна активність, од./мг <i>B. subtilis</i> IMB B-7516	Целобіазна активність, од./мг <i>B. subtilis</i> IMB B-7516	Екзоглюканазна активність од./мг <i>B. subtilis</i> IMB B-7516
4	0,1	0,12	0,06
5	0,25	1,3	0,18
6	0,3	1,25	0,18
7	0,33	1,19	0,18
8	0,23	1,06	0,18
9	0,23	н/в	0,12

Таблиця 2

Активність целюлозолітичних ферментів *B. subtilis* IMB B-7516
за високих значень температури середовища

Температура середовища, °C	Ендоглюканазна активність, од./мг <i>B. subtilis</i> IMB B-7516	Целобіазна активність, од./мг <i>B. subtilis</i> IMB B-7516	Екзоглюканазна активність, од./мг <i>B. subtilis</i> IMB B-7516
30	0,025	0,91	0,16
40	0,23	1,19	0,2
50	0,27	1	0,29
60	0,23	0,63	0,11

Як видно з даних, приведених у Таблиці 1, стабільне значення активності комплексу целюлазних ферментів спостерігали у досить широкому інтервалі pH від 5 до 8 (а для ендоглюканазної активності навіть до pH 9,0). Як випливає з Таблиці 2, оптимальні значення ферментативної активності спостерігається в межах температури середовища 40-50 °C. Проте здатність синтезувати целюлази різних класів зберігається в діапазоні температур від 30 до 60 °C. Таким чином, запропонований штам є термостабільним та демонструє ефективність в межах широкого діапазону значень pH.

Приклад 3. Дослідження розкладання целюлозовмісних решток штамом *B. subtilis* IMB B-7516

При дослідженні ступеню розкладання целюлозовмісних субстратів при використанні запропонованого штаму замість глюкози в синтетичне поживне середовище вносили поживні залишки із розрахунку 1 г абсолютно сухої маси целюлозовмісного субстрату на 100 мл поживного середовища. Після 14 діб культивування залишки целюлозовмісного субстрату відокремлювали від культуральної рідини, висушували та розраховували відсоток його розкладання за формулою:

$$A = \left(1 - \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100$$

де A_0 - початкова вага субстрату; A_1 - кінцева вага субстрату.

Як поживні залишки у досліді використовували пшеничну солому, сояшникове та кукурудзяне бадилля, оскільки дані культури є основними продуцентами поживних решток в нашій країні та значно відрізняються один від одного полісахаридним складом. Так, до складу пшеничної соломи входять значні кількості целюлози та лігніну, сояшника - пектинових речовин, кукурудзяного бадилля - геміцелюлози.

У досліді використовували різні джерела азотного живлення (сечовина та NH_4NO_3).

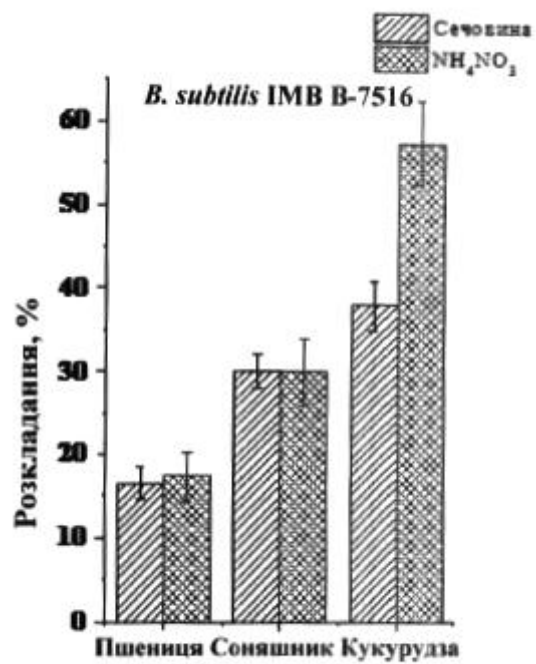
Було встановлено, що штам *B. subtilis* IMB B-7516 здатний до деструкції пшеничної соломи на рівні 10-24 %, сояшника - 37-38 % і кукурудзи - на рівні 21-42 % у залежності від типу використаного джерела азотного живлення. Дані експерименту приведені на Фіг. 1.

Відомо, що на ефективність розкладання рослинних решток значно впливає кількісний вміст целюлозовмісних решток. Тому, нами було досліджено ефективність розкладання поживних залишків при їх різному вмісті в середовищі культивування (1 мас. % та 2 мас. %). Дані експерименту є приведеними на Фіг. 2.

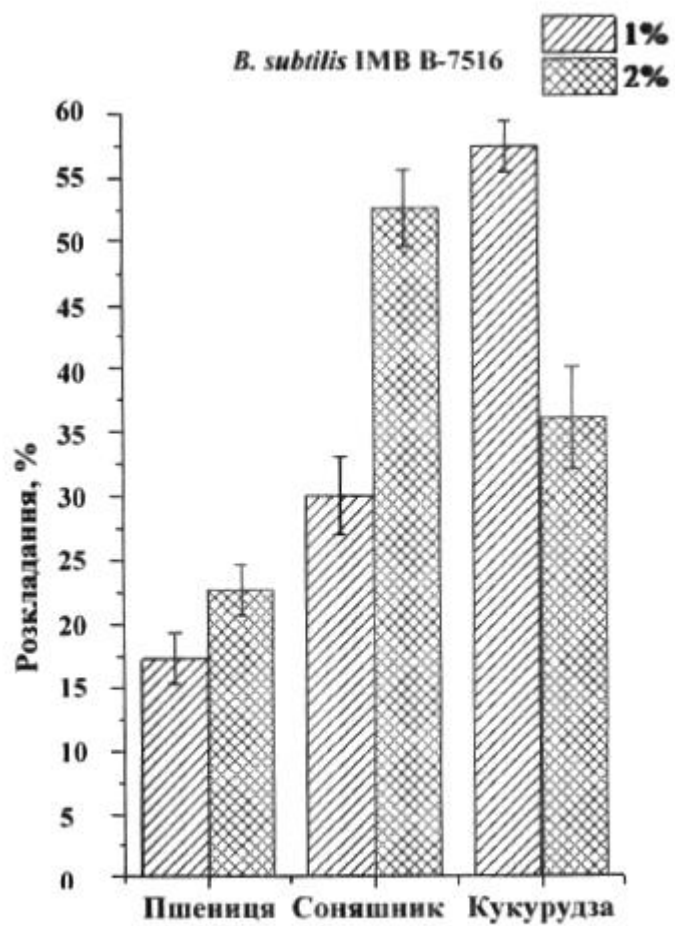
Як видно з приведених даних, штам *B. subtilis* IMB B-7516 - запропонований штам - є продуцентом ферментів з целюлозолітичною активністю, що розщеплюють поживні рослинні рештки різного походження. Вказаний штам може використовуватися у сільському господарстві для деструкції целюлозовмісних матеріалів з високою ефективністю.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам *B. subtilis* IMB B-7516 - продуцент комплексу ферментів з целюлозолітичною активністю.



Фиг. 1



Фиг. 2

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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

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