



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **24388** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 1/00
C12N 9/00
C12N 9/26

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ З ГЛУТАМІНТРАНСФЕРАЗНОЮ АКТИВНІСТЮ**

1

(21) u200702674
(22) 13.03.2007
(24) 25.06.2007
(46) 25.06.2007, Бюл. № 9, 2007 р.
(72) Капельянець Леонід Вікторович, Зинов'єв Андрій Андрійович
(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
(57) Спосіб одержання ферментного препарату з глутамінтрансферазною активністю, що включає культивування мікроорганізмів класу актиноміцетів на поживному середовищі, яке містить крохмаль,

2

дріжджовий екстракт, білковий гідролізат, а також солі магнію, калію і фосфорної кислоти, який **відрізняється** тим, що як культуру актиноміцетів використовують мікроорганізм *Streptomyces tobaraeensis*, який культивують на поживному середовищі, що містить наступні компоненти, %:

поліпептон	1,5-2,5
розчинний крохмаль	1,5-2,5
K ₂ HPO ₄	0,1-0,3
MgSO ₄	0,1-0,3
дріжджовий екстракт	0,1-0,3.

Корисна модель відноситься до біотехнологій, зокрема до виробництва препаратів мікробного синтезу, конкретно до способу одержання ферментного препарату транслугтамінази, не залежної від іонів кальцію, за допомогою мікробіологічного синтезу.

Найближчим до корисної моделі, що заявляється, є спосіб отримання не залежної від іонів кальцію транслугтамінази за допомогою мікроорганізму роду *Streptovorticillium* [Патент США 5156956 від 20 жовтня 1992р]. В способі за прототипом фермент одержують шляхом культивування мікроорганізму роду *Streptovorticillium*, який є продуцентом екзо-транслугтамінази. Культивували на рідкому поживному середовищі з глибинним аеруванням та перемішуванням проводили при температурі 25 - 30°C на протязі 2-4 діб.

Даний спосіб обрано найближчим аналогом.

Загальною суттєвою ознакою цього способу і способу, що заявляється, є використання мікроорганізмів класу актиноміцетів та культивування на поживному середовищі, яке містить крохмаль, дріжджовий екстракт, білковий гідролізат, а також солі магнію, калію і фосфорної кислоти, для отримання не залежного від іонів кальцію ферменту транслугтамінази.

Але спосіб за найближчим аналогом не використовує всіх можливостей і має вузьку спрямованість отримання даного ферменту.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу розширити можливості отримання даного ферментного препарату шляхом використання нового штаму-продуценту.

Поставлена задача вирішена в способі одержання ферментного препарату з глутамінтрансферазною активністю, що включає культивування мікроорганізмів класу актиноміцетів на поживному середовищі, яке містить крохмаль, дріжджовий екстракт, білковий гідролізат, а також солі магнію, калію і фосфорної кислоти тим, що як культуру актиноміцетів використовують мікроорганізм *Streptomyces tobaraeensis*, який культивують на поживному середовищі, що містить наступні компоненти, %:

поліпептон	1,5-2,5
розчинний крохмаль	1,5-2,5
K ₂ HPO ₄	0,1-0,3
MgSO ₄	0,1-0,3
дріжджовий екстракт	0,1-0,3

Новим в заявленому способі є використання іншого мікроорганізму, який також здатен синтезувати не залежну від іонів кальцію екзо-транслугтаміназу - мікроорганізм *Streptomyces tobaraeensis*, що депонований у Всеросійській колекції мікроорганізмів (ВКМ) за номером Ас-928. Даний мікроорганізм був обраний шляхом мікробіологічного скрінінгу як активний продуцент

(13) **U**(11) **24388**(19) **UA**

трансглютамінази. Умови біосинтезу ферменту були отримані шляхом оптимізації.

Трансглютамінази являються ферментами, які каталізують реакцію ацильного переносу 7-карбоксимідної групи залишку глутаміну в пептидному ланцюгу. Трансглютамінази утворюють внутрішньомолекулярні чи міжмолекулярні 6-(γ -Glu)-Lys поперечні зв'язки, де б-аміногрупа залишку лізину в білку служить як рецептор ацильної групи. Якщо як рецептор ацильної групи служить вода, трансглютамінази каталізують дезамінування залишків глутаміна з утворенням залишків глутамінової кислоти.

Продукти желірування, одержувані з використанням трансглютаміназ, застосовуються в якості йогуртів, желе, сирів, гелевих косметичних засобів і т.д., включаючи звичайні гелеві харчові продукти і гелеві косметичні засоби. Крім того, продукти желірування можуть бути отримані в нагрітому стані, вони є термостабільні і тому також можуть бути використані в широкому діапазоні, наприклад, як матеріали для мікрокапсул, носіїв для іммобілізації ферментів і т.д. Трансглютаміназу застосовують у різних білкових системах для покращення фізичних властивостей харчових продуктів, а також в якості загусника та гелеутворювача. Додавання її до зернових продуктів дозволяє отримати високоякісні вироби навіть при використанні муки із зниженим вмістом клейковини. Також може використовуватись в якості присмаку, покращуючи смак і запах, а також збільшуючи строк зберігання готових блюд. Застосування трансглютамінази в м'ясній промисловості дозволяє отримувати вироби із заданою пружністю, соковитістю, а також отримувати реструктуризовані вироби. Також ефективно застосування цього ферменту в молочній промисловості та рибопереробній.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Спочатку проводили культивування мікроорганізму *Streptomyces mobaraensis* на рідкому

поживному середовищі з таким складом: поліпептон, розчинний крохмаль, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ та дріжджовий екстракт. Термін культивування - 2-4 доби, з постійним аеруванням при температурі 25-35°C. Потім проводили центрифугування та фільтрування культуральної рідини. Це обумовлено тим, що при культивуванні на рідкому поживному середовищі трансглютаміназа, розчинена в культуральній рідині, є екзоферментом і може бути вилучена з фільтрату культуральної рідини шляхом відділення твердих компонентів.

Для вимірювання активності мікробіологічної трансглютамінази проводили реакцію з використанням в якості субстратів бензилоксикарбоніл-L-глутамінілгліцину і гідроксиламіну. В результаті реакції отримали γ -моногідроксамову кислоту L-глутамінової кислоти, яка в присутності трихлороцтової кислоти утворює пофарбовану комплексну сполуку з хлорним залізом. Потім вимірювали поглинання при $\lambda = 525\text{nm}$ і визначали кількість гідроксамової кислоти по каліброваній кривій для обчислення активності. Активність ферменту виражали в міжнародних одиницях активності. Одиниця активності - це кількість ферменту, який за одну хвилину утворює 1 мкмоль гідроксамової кислоти.

Приклад.

Streptomyces mobaraensis з ВКМ Ac-928 висівали на 50 см³ поживного середовища (pH = 7) з таким складом: поліпептон - 2,0%; розчинний крохмаль - 2,0%; K_2HPO_4 - 0,2%; $MgSO_4$ - 0,1%; дріжджовий екстракт - 0,2%. Культивування проводили протягом 24 годин при 30°C. Отриману посівну культуру вносили в 500 см³ серед (pH=7) з таким же складом, з послідовним культивуванням при 30°C протягом 3 діб. Після центрифугування протягом 15 хвилин при 6000 обертів на хвилину та фільтруванні отримали 462,5 см³ культурального розчину, активність дорівнювала 0,25 ед/см³.