

Изобретение относится к отраслям микробиологической промышленности, производящим бактериальные и ферментные препараты и может быть использовано при получении препаратов для сельского хозяйства с целью их использования для профилактики и лечения крупного рогатого скота, повышения продуктивности сельскохозяйственных животных, а также для использования при обработке масличного сырья для повышения выхода эфирного и растительных масел, для интенсификации мочки луко-волоконистого сырья и силосования трудносилосуемых сельскохозяйственных культур, и для повышения выхода и получения экстрактивных и других ценных веществ из растительного сырья.

Известен *Cl. pectinoformans* штамм 15 - анаэробный продуцент мацерирующих ферментов, Предназначенный для применения в льноперерабатывающей промышленности (1). *Cl. pectinoformans* 15 синтезирует в процессе глубинного культивирования экзо-пектаттрансэлиминазу, экзо-полигалактуроназу, пектиноэстеразу и не синтезирует эндо-полигалактуроназу и целлюлазу. Отсутствие у комплекса ферментов, образуемых *Cl. pectinoformans* эндо-ферментов гидролитического и элиминативного действия снижает мацерирующий эффект препаратов, полученных из этой культуры.

Известен штамм *B. macerans* ЦМГПМ В-2692 - продуцент пектолитических ферментов, который в условиях глубинного культивирования образует комплекс мацерирующих ферментов, в том числе экзо-полигалактуроназу с активностью 5,0 ед/см³, пектат-трансэлиминазу с активностью 9000 ед/см³, эндо-полигалактуроназу с активностью 6,5 ед/см³. Максимальное содержание ферментов в культуральной жидкости достигается к 18-20 часу культивирования (2). Существенным недостатком указанного штамма является низкая активность эндо- и экзо-полигалактуроназ, а также отсутствие синтеза ксиланазы. Из литературных источников известно, что мацерирующий эффект максимально проявляется при сочетании комплекса ферментов: пектат-трансэлиминазы, экзо- и эндо-полигалактуроназы (1). Кроме того, в описании изобретения отсутствует такой важный показатель как титр клеток, что не дает возможности использовать штамм без проведения специальных исследований при получении бактериальных препаратов.

Условия культивирования штамма *B. macerans* характеризуются узким диапазоном температуры и pH (оптимальная температура от 32 до 35°C, pH - 6,8-7,2). Нейтральная pH и невысокая температура культивирования создает возможные предпосылки для инициирования, что является отрицательным фактором при промышленном внедрении штамма. Область применения штамма *Bac. macerans* распространяется только на первичную обработку льна и грубых кормов, что охватывает более узкую зону применения по сравнению с применением заявляемого штамма.

Известен *Bac. circulans* - шт. 31 ЦМГПМ В-1741 - продуцент мацерирующих ферментов (4). *Bac. circulans*-31 является факультативным анаэробом, оптимальными условиями культивирования являются: pH среды 8,1-8,3; температура - (37-42)°C, время культивирования - 36 часов. Продуцент синтезирует комплекс пектолитических ферментов: пектат-трансэлиминазу от 2 до 10 ед/см³ эндо-полигалактуроназу - 25 ед/см³.

Существенными недостатками штамма *Bac. circulans* - 31 являются:

- низкая активность пектат - трансэлиминазы (ПТЭ);
- не достаточно высокая активность эндо-полигалактуроназы (эндо-ПГ);
- отсутствие синтеза экзо-полигалактуроназы (экзо-ПГ) и ксиланазы;
- длительный период культивирования продуцента.

Отсутствие в описании изобретения такого важного показателя как накопление биомассы не дает возможности использовать продуцент без проведения специальных исследований по накоплению биомассы при получении ферментно-бактериальных и бактериальных препаратов.

Наиболее близким прототипом к заявляемому штамму является способ получения пектат-трансэлиминазы (А.С. №1349250) заключающийся в культивировании факультативно-анаэробного продуцента *Bac. circulans*-31 в аэробных условиях при постепенном увеличении концентрации растворенного кислорода в питательной среде, при температуре 35-50°C и дозе спорового посевного материала 0,015-0,03% к объему питательной среды, при использовании в составе среды в составе питательной среды в качестве индукторов биосинтеза пектат-трансэлиминазы продуктов щелочной деградации пектина свекловичного жома, в результате достигается повышение синтеза ПТЭ до уровня 1300-1600 ед/см³, экзо-ПГ до 87-114 ед/см³, эндо-ПГ до 4-9 ед/см³, увеличение синтеза биомассы до $1,4 \times 10^9$.

Целью настоящего изобретения является получение нового штамма факультативно-анаэробной бактерии *Bac. circulans* БТ ВКПМ В-5622 с повышенной способностью синтезировать комплекс пектолитических ферментов и накапливать биомассу, и обладающим более широким спектром синтезируемых ферментов, а также характеризующегося быстрым циклом роста.

Предлагаемый штамм выделен в результате многократного посева исходного штамма *Bac. circulans* шт. 31 ЦМГПМ В-1741 и выделения многоспоровых вариантов. Полученный штамм *Bac. circulans* БТ подвергали проверке на ферментативную активность, накопление биомассы и скорость роста. Причем основным критерием отбора продуцента по ферментативной активности является синтез ПТЭ, как одного из ведущих ферментов, ответственных за мацерацию тканей.

Полученный штамм имеет следующие морфологические и физиологические характеристики.

Морфологические признаки.

Вегетативные клетки прямые, подвижные палочки, величиной 2,0-4,5 x 0,9-1,0 мкм. На 6-12 часу роста образуются цепочки из 2-4 клеток. Грамположительны. Споры эллиптические, без экзоспориума, размером 1,6 x 1,2 мкм, расположены центрально.

Культурально-биохимические и физиологические признаки;

- на картофельном агаре колонии плоские, середина складчатая, края колонии неровные, блестящие; непрозрачные, на 3-й сутки роста вся поверхность колонии становится блестящей, размер колонии от 3-8 мм, цвет колонии бежевый;

- МПА - колонии плоские, с выпуклой серединой, в центре матовые, края колонии неровные блестящие, непрозрачные, размер колонии 1-2 мм, цвет колонии от светло-бежевого до бежевого;

- на сусле агаре колонии плоские, шероховатые (R-форма), матовые, середина колонии блестящая,

шероховатая, края колонии неровные, матовые, непрозрачные, размер колонии от 3 до 15 мм, цвет колонии бежевый;

- на агаризованном капустном отваре колонии плоские с более темной выпуклой серединой, края колонии зубчатые, непрозрачные, на 3-й сутки роста вся поверхность колонии становится блестящей, размер колонии 2-5 мм, цвет колонии от светло-бежевого до бежевого;

- на среде Чапека с глюкозой колонии выпуклые, непрозрачные, неблестящие (Реформа), с сильно складчатой и выпуклой серединой, края колонии неровные, неблестящие, непрозрачные, размер колонии от 2 до 7 мм, цвет колонии от бежевого до бордового;

- на среде Чапека с крахмалом колонии выпуклые, непрозрачные, неблестящие (R-форма), с сильно складчатой и выпуклой серединой, края колонии неровные, неблестящие, непрозрачные, размер колонии от 2 до 6 мм, цвет колонии розово-бежевый.

По отношению к кислороду является факультативным анаэробом. Оптимальными условиями культивирования штамма являются: pH среды 7,8-8,6; температура 36-45°C, время культивирования в анаэробных условиях 10-18 часов, в условно-анаэробных 18-36 часов, минимальная температура роста -5°C, максимальная +54°C.

Казеин разлагает. Крахмал гидролизует. Усваивает галактозу, глюкозу, глицерин, ксилозу, ксилит, инозит, мальтозу, маннит, рафинозу, сахарозу, фруктозу, целлобиозу. Не усваивает рамнозу, арабинозу, лактозу, дульцит. Нитраты восстанавливает. Мидол не продуцирует. Фенилаланин не дезаминирует. Тирозин не расщепляет, образует каталазу. Молоко "не пептонизирует". Растет на средах с 0,001% лизоцима и 7% хлористого натрия. Хорошо растет на ломтиках моркови, картофеля, репы, тыквы с полной мацерацией субстрата.

Продуцент подвержен сезонным влияниям, так в весенний и осенний периоды допускается снижение ферментативной активности на 20-30%.

Пример 1.

Продуцент *Vac. circulans*-31 (прототип) выращивали в условно-анаэробных условиях в колбах 0,75 дм³ при коэффициенте заполнения 0,8 в течение 36 часов при температуре 40°C и pH нач. 8,2 на среде, имеющей следующий состав (г/дм³):

картофельная мезга	30,0
свекловичный жом молотый	5,0
аммоний фосфорнокислый	
двузамещенный	7,5
калий фосфорнокислый	
1-замещенный	1,0
кальций углекислый	5,0
кукурузный экстракт	5,0
вода водопроводная	остальное.

Колбы засеивали 48 часовой культурой выращенной на картофельном агаре. По окончании культивирования проводили определение ферментативных активностей и накопления биомассы. Результаты приведены в таблице.

Для определения активности ферментов культуральную жидкость центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин и использовали супернатант.

ПТЭ определяли прямым спектрофотометрированием ненасыщенных продуктов реакции пектолиза, имеющих максимальную оптическую плотность при длине волны 230-235 нм, определение проводили по ТУ оп. 64-13-167-90. За единицу активности принято такое количество фермента, которое за 1 час при 40°C вызывает образование ненасыщенных продуктов реакции, увеличивающих оптическую плотность на 0,1. Эндо-ПГ определяли вискозиметрическим методом по ГОСТ 20264.3-81. Экзо-ПГ определяли титриметрическим методом по увеличению восстанавливающих групп по ГОСТ 20334.3-81. Ксиланазную активность определяли по Appl. Microbiol. Biochem 1985, 22, p.177-180.

Определение, накопления биомассы проводили методом предельных разведений.

Пример 2,

Продуцент *Vac. circulans* 31 (прототип) выращивали в аэробных условиях в колбах объемом 0,75 дм³ при коэффициенте заполнения 0,13 на среде, имеющей следующий состав (г/дм³):

жом свекловичный молотый	27,5
карбамид	7,5
калий сернокислый	2,0
калий углекислый	2,5
экстракт кукурузный	12,5
сода кальцинированная	2,0
вода водопроводная	до 1 дм³

Компоненты питательной среды, за исключением мочевины, растворяют произвольным образом в 900 см³ водопроводной воды, разливают по 90 см³ раствора в колбы и стерилизуют при избыточном давлении 0,1 МПа или 1 кгс/см² в течение 45 мин. Раствор карбамида с массовой долей 7,5% готовят и стерилизуют отдельно в течение 30 мин при избыточном давлении 0,05 МПа или 0,5 кгс/см² и вносят в асептических условиях по 10 см³ в колбы со стерильной питательной средой перед посевом. Посевным материалом являются споры штамма *Vac. circulans* 31, образующиеся на поверхности скошенного картофельного агара. Смесью с 1 косяка засеивали 3 колбы.

Культивирование проводили в качалочных колбах при температуре 42°C на качалке при перемешивании

190 ± 10 об/мин в течение 16 часов, pH 8,2.

Примеры 3-7.

Продуцент *Vac. circulans* БТ выращивали на среде примера 1 в аэробных условиях.

Питательную среду разливали по 100 см³ в качалочные колбы объемом 750 см³. В качестве посевного материала использовали споры штамма *Vac. circulans* БТ, которые образуются на поверхности скошенного картофельного агара после инокулирования и выращивания в течение 48 часов при 40°C. Смывом с одного косяка засеивали колбы.

Культивирование проводили в колбах на качалке при перемешивании 190 ± 10 об/мин в течение 8-24 час при температуре от 33 до 48°C и pH 7,4-9,0.

Примеры 8-12.

Продуцент *Vac. circulans* БТ выращивали в качалочных колбах объемом 750 см³. Состав среды по примеру №2, условия культивирования аэробные.

Примеры 13-17.

Культивирование продуцента *Vac. circulans* БТ проводили на питательной среде по примеру №1, в условно-анаэробных условиях.

Примеры 18-22.

Продуцент *V. circulans* БТ выращивали в условно-анаэробных условиях. Состав среды соответствовал примеру 2.

Примеры 23-27.

Продуцент *V. circulans* БТ выращивали на среде, имеющей следующий состав (г/дм³):

картофельный крахмал	100,0
амилосубтилин ГЭх с АС	
550 ед/г	0,37
аммоний лимоннокислый	
2-замещенный	30,0
натрий фосфорнокислый	
2-замещенный	3,0
калий фосфорнокислый	
1-замещенный	2,0
магний сернокислый	1,5
кальций сернокислый	1,5
железо сернокислое	
закисное	0,02
марганец сернокислый	0,00125
медь сернокислая	0,0075
аминобензойная кислота	0,01
вода дистилли-	осталь-
рованная	ное
pH среды	6,0-6,2.

Картофельный крахмал, входящий в состав питательной среды, предварительно осахаривали амилазосубтилином. Питательную среду разливали в колбы объемом 2 дм³ по 300 см³ и стерилизовали при 1,5 атм 30 мин.

Культивирование проводили в течение 18-84 часов при температуре 42°C без перемешивания в термостате.

Примеры 28-32.

Состав среды и условия культивирования соответствовали примерам 23-27. Отличие: продуцент *V. circulans* 31.

Все опыты проводили в 3-х кратной повторности. Данные по результатам опытов представлены в таблице.

Анализ данных, представленных в таблице, позволяет сделать вывод о том, что заявляемый штамм *Vac. circulans* БТ отличается от прототипа:

1 - снижением продолжительности культивирования продуцента (в заявляемом решении продолжительность культивирования в аэробных условиях от 10 до 18 часов, в условно-анаэробных от 18 до 36 часов; в прототипе - 10-20 часов, в условно-анаэробных - 24-36 часов);

2 - синтезом биомассы (в заявляемом решении титр клеток от $1,3 \times 10^8$ до $2,8 \times 10^{11}$; в прототипе от $3,1 \times 10^5$ до $1,2 \times 10^9$);

3 - значительным синтезом пектат-трансэлиминазы (в заявляемом решении активность ПТЭ на среде, содержащей в качестве источника углерода свекловичный жом, в условно-анаэробных и аэробных условиях 2310-6700 ед/см³ против 38-1600 ед/см³ соответственно в прототипе; на среде содержащей в качестве источника углерода крахмал в условно-анаэробных условиях 10000-25000 ед/см³; в прототипе - 2200 ед/см³);

4 - увеличением эндо-полигалактуроназной активности (в заявляемом решении активность достигает 32,57-87,7 ед/см³; в прототипе - 3,0-9,0 ед/см³);

5 - увеличением экзо-полигалактуроназной активности (в заявляемом решении до 270 ед/см³, в прототипе от 8 до 114 ед/см³);

6 - диапазоном синтеза ферментов (в заявляемом решении, синтез ксиланазы - 30,8 ед/см³, в прототипе синтез ксиланазы отсутствует).

Использование предлагаемого штамма *Vac. circulans* БТ по сравнению с прототипом имеет следующие

преимущества:

- 1 - сверхсинтез пектат-трансэлиминазы, которая является основным показателем при получении ферментного препарата мацерирующего действия;
- 2 - увеличением эндо-полигалактуроназной и экзо-полигалактуроназной активностей;
- 3 - наличием синтеза ксиланазы;
- 4 - значительным усилением роста биомассы;
- 5 - возможность получения высокоактивного ферментного препарата как в аэробных, так и в условно-анаэробных условиях,

Таким образом предлагаемый штамм дает возможность получать высокоактивный ферментно-бактериальный препарат или высокоактивную культуральную жидкость, характеризующиеся широким спектром действия ферментов. Препарат, получаемый на основе *Vac. circulans* БТ может использоваться для профилактики и лечения ацидоза крупного рогатого скота, как биологическая добавка в рационы сельскохозяйственной птицы с целью повышения усвояемости корма и увеличения прироста животной массы, а также при обработке лубоволокнистого (например льна и конопли) и масличного сырья, и при силосовании и для повышения выхода или получения экстрактивных и других ценных веществ из растительного сырья.

Штамм	№ примера	Условия культивирования по отношению к кислороду	pH	Температура культивирования, °C	Продолжит. культивирования, час	ПТЭ, ед/см ³	Экзо-ПГ, ед/см ³	Эндо-ПГ, ед/см ³	Ксиланазы, ед/см	Биомасса, титр
31	1	условно-анаэробные	8,2	40	36	8	-	25,0	-	1,2x10 ⁶
31	2	аэробные	8,2	42	16	1470	92,10	7,30	-	1,3x10 ⁹
	3	аэробные	7,4	33	8	61	3,10	8,80	3,4	-
	4	"-	7,8	36	10	2440	12,80	32,80	22,3	1,8x10 ⁹
	5	"-	8,2	42	14	5350	36,77	87,72	30,8	1,7x10 ¹⁰
	6	"-	8,6	45	18	5080	32,60	33,60	17,1	1,5x10 ⁹
	7	"-	9,0	48	24	1620	22,10	9,70	2,8	-
БТ	8	аэробные	7,4	33	8	360	9,10	8,20	12,3	-
	9	"-	7,8	36	10	2310	26,30	41,10	37,2	1,7x10 ⁹
	10	"-	8,2	42	14	6700	30,78	46,50	42,40	1,1x10 ¹⁰
	11	"-	8,6	45	18	5150	28,20	45,00	29,2	1,5x10 ¹⁰
	12	"-	9,0	48	24	3200	12,70	30,80	4,5	-
БТ	13	условно-анаэробные	7,4	33	14	263	8,70	8,80	7,1	-
	14	"-	7,8	36	18	2730	12,20	33,70	25,8	1,3x10 ⁸
	15	"-	8,2	42	32	4250	16,80	42,10	37,1	1,8x10 ⁹
	16	"-	8,6	45	36	4820	12,00	40,30	18,4	1,5x10 ⁸
	17	"-	9,0	48	48	253	2,30	9,1	1,5	-
БТ	18	условно-анаэробные	7,4	33	14	148	2,30	9,70	5,2	-
	19	"-	7,8	36	18	2520	12,30	32,57	22,3	1,2x10 ⁸
	20	"-	8,2	42	32	5550	17,10	34,95	28,1	1,9x10 ⁸
	21	"-	8,6	45	36	3175	17,10	33,30	20,1	1,8x10 ⁷
	22	"-	9,0	48	48	398	15,60	30,10	3,2	-
БТ	23	условно-анаэробные	6,2	42	18	2050	201,00	3,20	3,1	-
	24	"-	6,2	42	24	10000	235,00	8,60	7,2	2,3x10 ⁷
	25	"-	6,2	42	48	12100	248,00	12,50	35,2	1,5x10 ⁸
	26	"-	6,2	42	72	25000	278,00	25,80	32,1	2,0x10 ¹⁰
	27	"-	6,2	42	84	23200	265,00	24,20	32,0	2,8x10 ¹¹
	28	условно-анаэробные	6,2	42	18	4	3,00	1,40	-	-
	29	"-	6,2	42	24	38	8,00	2,20	-	2,5x10 ⁵
	30	"-	6,2	42	48	95	11,00	3,10	-	1,5x10 ⁶
	31	"-	6,2	42	72	1300	48,00	7,20	-	2,3x10 ⁷
	32	"-	6,2	42	84	2200	51,00	7,60	-	2,5x10 ⁹