



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ №

(19) **SU** (11) **1722056** **A1**

(51) **С 12 Р 19/04, С 12 N 15/01**

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГНТ СССР

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4775177/13

(22) 26.12.89

(71) Ладыжинское производственное  
биофармацевтическое объединение  
"Энзим"

(72) В.А. Болоховская, О.В. Нагорная,  
Н.Б. Мартынюк, Л.Н. Шинкаренко,  
В.В. Дерябин, Р.И. Гвоздяк  
и И.И. Майко

(53) 663.15 (088.8)

(56) Опытно-промышленный регламент  
на получение полимиксана сухого,  
г. Ладыжин, 1989.

Авторское свидетельство СССР  
№ 1231877, кл. С 12 Р 19/04, 1986.  
(непублик.).

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *BACILLUS POLYMU-*  
*XA* - ПРОДУЦЕНТ ПОЛИМИКСАНА

(57) Изобретение относится к биотех-  
нологии и касается получения нового  
штамма бактерий - продуцента полисахар-  
ида полимиксана, который может быть  
использован в пищевой, медицинской  
промышленности, а также в нефтедобы-  
че в районах засоленных почв, где эф-  
фективность применения других полисахаридов существенно снижается.

Целью изобретения является получение  
штамма бактерий *Bacillus polymyxa*  
ВКПМ В-4902 (1459-ПЗ), обладающего  
повышенным накоплением полимиксана  
и высокой стабильностью. Штамм спо-  
собен на среде с гидролизированным ку-  
курузным крахмалом после 36 ч куль-  
тивирования накапливать в культураль-  
ной жидкости до 22 г/л полимиксана.  
1 табл.

Изобретение относится к биотех-  
нологии и касается получения нового  
штамма бактерий - продуцента поли-  
сахарида полимиксана, который может  
быть использован в пищевой, медицин-  
ской промышленности, а также в нефте-  
добыче в районах засоленных почв,  
где эффективность применения других  
полисахаридов существенно снижается.

Известен штамм *Bacillus polymyxa*  
1459 - продуцент полимиксана. Однако  
штамм обладает низкой продуктив-  
ностью.

Известен штамм *B. polymyxa* ВКПМ  
В-3015 (1459-В), полученный из штам-  
ма *B. polymyxa* 1459 посредством мута-  
генеза и последующей селекции Не-  
11-92.

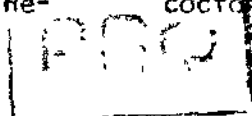
достатком штамма является относитель-  
но низкая продуктивность и легкая дис-  
социируемость, что затрудняет про-  
мышленное производство полимиксана.

Целью изобретения является получе-  
ние штамма бактерий *B. polymyxa* ВКПМ  
В-4902 (1459-ПЗ), обладающего повы-  
шенным накоплением полимиксана и  
высокой стабильностью.

Штамм получен из штамма *B. po-*  
*lymyxa* ВКПМ В-3015 путем отбора спон-  
танно возникающих крупных (быстрорас-  
тущих) колоний 5-типа, синтезирую-  
щих много слизи и не диссоциирующих  
при пересевах.

Штамм хранят в лиофилизированном  
состоянии на регламентной питатель-

(19) **SU** (11) **1722056** **A1**



ной среде (см. пример 1) или в холодильнике при температуре 4°C на косяках с картофельным агаром. Периодичность пересевов раз в 2-3 месяца.

Штамм имеет следующую характеристику.

Культурально-морфологические признаки. Палочки с закрепленными концами размером (2,0-5,0) x (0,6-1,0) мкм, одиночные и в цепочках по две клетки, грамположительные, подвижные (перитрихальное жгутикование), окружены мощной капсулой. Споры цилиндрические, расположены в клетке центрально или терминально.

На картофельном агаре (КА) колонии крупные (7-10 мм), сероватые, обильно слизистые, выпуклые, круглые или бесформенные из-за растекающейся слизи; поверхность гладкая, блестящая; консистенция вязкая. Расщепление на R-формы крайне редко.

На мясо-пептонном агаре (МПА) колонии мелкие (2-4 мм), прозрачные, плоские, с фестончатым краем.

На скошенном МПА рост умеренный, сплошной, с волнистым краем.

На скошенном КА рост обильный, сплошной, с ровным краем.

На мясо-пептонном бульоне рост умеренный, помутнение однородное, пленки нет, осадок слабый, хлопьевидный.

Рост на среде, содержащей гидролизированный кукурузный крахмал, ускоренный, помутнение однородное; пленка кольцеобразная толстая, плотная слизистая, гладкая; осадка нет.

Физико-биохимические признаки.

Отношение к источникам углерода: утилизирует глюкозу, сахарозу, арабинозу, ксилозу, галактозу; не утилизирует лактозу; гидролизует крахмал.

Отношение к источникам азота: использует аммонийную и нитратную формы азота, а также органические источники азота (кукурузный экстракт, гидролизат казеина, белково-витаминный концентрат, пептон, дрожжевой автолизат).

Разжижает желатину.

Рост возможен при температуре от 20 до 40°C; оптимальная область 24-29°C.

Заметный рост и биосинтез экзополисахарида (ЭПС) возможен в диапазо-

не pH 6,0-8,0; оптимальные условия pH 7,0-7,5.

Максимум накопления полимиксана (20-27 г/л) достигается на 36-40 часу роста; динамическая вязкость культуральной жидкости составляет 200-250 сПз при 300 об/мин.

Синтез ЭПС повышается при увеличении в среде концентрации источника углерода (см. таблицу)

Влияние концентрации углерода в среде на синтез полимиксана штаммом В. polyuxa ВКПМ В-4902

Концентрация углеводов в среде, г/л	Удельный выход полимиксана, г/л	Удельная скорость роста, ч
10	1,52±0,10	0,76
30	4,36±0,15	0,83
50	4,58±0,17	0,82
70	4,82±0,08	0,73

В отличие от известных предложенный штамм образует количество полимиксана одного уровня на средах, содержащих крахмал различной степени расщепления

Влияние степени гидролиз крахмала на биосинтез ЭПС штаммом В. polyuxa ВКПМ В-4902:

Степень гидролиза крахмала, %	Концентрация полимиксана, г/л
10	22,9
30	22,4
70	22,3

Пример 1. Штаммом В. polyuxa ВКПМ В-4902 засевают посевную питательную среду следующего состава, %: гидролизированный кукурузный крахмал 1,5 (по РВ); кормовые дрожжи (БВК) 0,75; однозамещенный фосфат калия 0,05; двухзамещенный фосфат калия 0,05; сульфат магния 0,02; хлористый кальций 0,02; углекислый кальций 0,75.

В качестве исходного материала используют трехдневную культуру, выращенную на скошенном картофельном агаре при температуре  $28 \pm 1^\circ \text{C}$ .

Предварительно посевную питательную среду по 150 мл разливают в колбы объемом 750 мл. Выращивание посевного материала осуществляют при температуре  $28 \pm 1^\circ \text{C}$  в течение 24 ч. Затем по 10 мл посевного материала вносят в асептических условиях в 15 качалочных колб объемом 750 мл, содержащих по 200 мл питательной среды следующего состава, %: гидролизированный кукурузный крахмал 4,0; кормовые дрожжи (БВК) 0,5; однозамещенный фосфат калия 0,05; двухзамещенный фосфат калия 0,05; сульфат магния 0,02; хлористый кальций 0,02; углекислый кальций 0,75.

Колбы помещают на круговую качалку со скоростью вращения  $220 \pm 5$  об/мин. Температура культивирования  $28 \pm 1^\circ \text{C}$ , время биосинтеза 36 ч.

По окончании процесса определяют уровень накопления полимиксана путем осаждения разбавленной в два раза культуральной жидкости трехкратным объемом этанола. Уровень накопления полимиксана в культуральной жидкости составляет 22,1 г/л.

**Пример 2.** Штаммом *P. polymyxa* ВКПМ В-4902, смывом с косяка картофельного агара, засевают посевную питательную среду состава по примеру 1. Выращивание 30 колб посевного материала осуществляют в течение 24 ч при температуре  $28 \pm 1^\circ \text{C}$  на круговой качалке ( $220 \pm 5$  об/мин). Затем в асептических условиях полученный посевной материал переносят в сте-

рильную колбу объемом 5 л и закрытым способом производят засев посевного аппарата объемом 6,3 м<sup>3</sup>. Коэффициент загрузки 0,5. Питательная среда в посевном аппарате аналогична описанной в примере 1.

Выращивание посевного материала в аппарате 13 ч при температуре  $28 \pm 1^\circ \text{C}$ ; начальный pH 7,2; аэрация 0,4-0,5 об. на 1 об./мин, противодавление в аппарате 0,5 атм, интенсивность перемешивания 150 об/мин.

Выращенную культуру используют как посевной материал для выращивания штамма в промышленном аппарате.

В ферментер емкостью 63 м<sup>3</sup> при загрузочном коэффициенте 0,5 загружают питательную среду, содержащую мас. %: гидролизированный кукурузный крахмал 2,7 (по РВ); кормовые дрожжи (БВК) 0,25; калий фосфорнокислый однозамещенный 0,05; калий фосфорнокислый двухзамещенный 0,05; сульфат магния 0,02; кальция хлорид 0,02. Начальный pH 7,1; температура  $28 \pm 1^\circ \text{C}$ ; аэрация 0,4-0,5 об./1 об. среды в 1 мин; интенсивность перемешивания 175 об/мин; противодавление 0,5 атм. Проводят корректировку значения pH до 6,8 - 7,2 с помощью 10%-ного раствора NaOH.

Время биосинтеза полимиксана 37 ч. Накопление полимиксана в культуральной жидкости 18,4 г/л, эффективная вязкость  $235 \pm 5$  сПз.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Штамм бактерий *Bacillus polymyxa* ВКПМ В-4902 - продуцент полимиксана.

Редактор А. Бер  
Составитель Л. Минеева  
Техред Л. Олиньных

Корректор А. Обручар

Заказ 1093/ДСП

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101.

