



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1726513 A1

(51) С 12 N 9/20, 1/14

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4836674/13

(22) 11.06.90

(46) 15.04.92. Бюл. № 14

(71) Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д.К.Заболотного

(72) Т.И.Билай, В.Л.Айзенберг, В.А.Захар-  
ченко, А.П.Капичон, В.А.Вьюницкая,  
М.Э.Церетели, Д.А.Долидзе, Г.И.Квеситад-  
зе, А.Е.Мысак, Л.Н.Шинкаренко, Г.Е.Зин-  
гер, В.А.Ющенко, Л.И.Бовика и Л.Л.Корчун  
(53) 663.18(088.8)

(56) ЕР № 0117553, кл. С 12 N 9/20, опублик.  
1984.

Авторское свидетельство СССР  
№ 467932, кл. С 12 N 9/20, 1973.

(54) ШТАММ ГРИБА RHIZOPUS COHNII  
BERL ET DE TONI – ПРОДУЦЕНТ ЛИПАЗЫ  
С КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Изобретение представляет собой новый  
штамм (Ш) микроскопического гриба  
*Rhizopus cohnii* Berl et de Toni ВКПМ F-408  
– продуцент термостабильной липазы с ка-  
талазной активностью – и позволяет расши-  
рить ассортимент продуцентов липазы.  
Выделен Ш из образцов темно-каштановой  
почвы целинной типчаково-полынной сте-  
пи (Аскания Нова) на глубине 3–5 см. Гриб

2

атоксичен, мало спороносит, не пылит, не  
подвержен лизису, устойчив к антибактери-  
альным веществам. Ш не продуцирует про-  
теазу, чем выгодно отличается от  
микроскопических – продуцентов липаз, обра-  
зующих наряду с липазой протеазу, что сни-  
жает со временем липолитическую  
активность. Как термофиллон характеризу-  
ется повышенной биохимической активнос-  
тью, высокой скоростью роста по  
сравнению с мезофилами, обуславливая ин-  
тенсификацию получения конечного про-  
дукта. Препарат внеклеточной липазы из  
*Rhizopus cohnii*, полученный осаждением  
ацетоном, характеризуется термостабиль-  
ностью. Липаза из штамма *Rhizopus cohnii*  
стабильна при 30, 40, 50, 60 и 65°C (100%  
относительной активности) в течение 60  
мин, а при 80°C активность достигает нуле-  
вого значения в течение 30 мин. Липолити-  
ческая активность образцов препарата из  
*Rhizopus cohnii* составляет 50000–100000  
ед/г. Препарат обладает каталазной актив-  
ностью, которая составляет 200000–250000  
ед/г, что обеспечивает применение его в  
бытовой химии в качестве биодобавки в со-  
ставе синтетических моющих средств. 3 ил.

Изобретение относится к микробиоло-  
гической промышленности и касается пол-  
учения нового штамма гриба для  
использования в бытовой химии при произ-  
водстве синтетических моющих средств.

Целью изобретения является получение  
нового штамма гриба *Rhizopus cohnii* Berl et  
de Toni – продуцента липазы с каталазной  
активностью.

Штамм депонирован во Всесоюзный  
коллекции промышленных микроорганиз-

мов Института "ВНИИГенетика" под номе-  
ром ВКПМ F-408.

Штамм *Rhizopus cohnii* выделен из об-  
разцов темно-каштановой почвы.

Культурально-морфологические свойст-  
ва штамма. Штамм *Rhizopus cohnii* Berl et de  
Toni быстрорастущий, образует хорошее  
спороношение при выращивании на ага-  
ризованных средах, например на сусловом  
агаре (фиг.1). На картофельно-дрожжевом  
агаре при 37°C образует колонии рыхлой-

(19) SU (11) 1726513 A1

лочные до 1 см высотой, вначале светло-серые, затем пепельно-серые. Ризоиды простые или слабо разветвленные, светло-коричневатые. Спорангиеносцы простые, прямые или слабо изогнутые, отходят по 1-3 от шейки ризоида или столонovidных гиф, 82-520 x 5-13 мкм. Спорангии 45-90 мкм в диаметре. Спорангиоспоры неправильно шаровидные, шаровидные, 4-6 (7) мкм в диаметре, гладкие, в массе бледно-голубоватые. Хламидоспоры многочисленные, цилиндрические, шаровидные, 15,6-21,3 x 10,1-15,4 мкм.

Физиолого-биохимические свойства. Аэроб, гетеротроф, растет в широких пределах pH 2-9. Гриб термотолерантный, температурные границы его роста: от 17-19 до 51-52°C, оптимальная температура роста 42-45°, спороношения 37-40°C.

В качестве источников углерода усваивает сахарозу, глюкозу, галактозу, мальтозу, лактозу, фруктозу, декстрозу, крахмал, инулин, сорбит, маннит и др., этанол и метанол слабо. Усваивает нитратный, нитритный, аммонийный азот, из органических источников азота ассимилирует аминокислоты, мочевину, пептон, кукурузный экстракт.

Признаки штамма устойчивы. Штамм атоксичный, не подвержен лизису, устойчив к антибактериальным веществам; не продуцирует протеазу. Штамм является продуцентом липазы, обладает каталазной активностью.

Липазу получают глубинным культивированием продуцента на среде описанного ниже состава.

Пример 1. Культивирование продуцента *Rhizopus cohnii* проводят на качалках с 220 об./мин при 40° на среде состава, %: соевая мука 1,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2; KCl 0,05; CaCO<sub>3</sub> 0,05; MgSO<sub>4</sub> 0,05; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,3; масло подсолнечное 1,0 (величина pH до стерилизации 7,0±0,1; после стерилизации 6,5-0,1) по 150 мл в колбах емкостью 750 мл. Посев 5% односуточного инокулюма, полученного на среде состава, %: вытяжка из пшеничных отрубей 10,0; сахароза 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2; KCl 0,05; CaCO<sub>3</sub> 0,05; MgSO<sub>4</sub> 0,05; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,3. Длительность ферментации 72 ч. Активность липазы 600-700 ед/мл, каталазы 10-12 ед/мл.

Пример 2. Культивирование осуществляется в ферментере при 40°, аэрации питательной среды 1 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup>/мин при работе мешалки 280 об./мин, величина pH в пределах значений 5,8-6,2. Пенообразование

снижают уменьшением степени аэрирования до 0,8 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup>/мин длительность процесса биосинтеза липазы 60-62 ч. Липолитическая активностью 1000-1100 ед./мл, каталазы 12-15 ед/мл.

Препарат внеклеточной липазы выделяют из культуральной жидкости /к.ж./ *Rhizopus cohnii* осаждением тремя объемами ацетона к одному объему к.ж. с последующим высушиванием. Активность образцов препарата липазы из *Rhizopus cohnii* составляет 50000-100000 ед/г, каталазы - 200000-250000 ед/г. Температурный оптимум действия препарата внеклеточной липазы из *Rhizopus cohnii* 45°, pH-оптимум действия - в пределах pH 6-7.

В то время как липаза из *Rhizopus microsporus* УзЛТ-1 (прототип) при 50°C утрачивает активность на 50% за 120 мин, при 60° на 50% за 40 мин, а при 70° фермент инактивируется полностью за 20 мин, липаза из *Rhizopus cohnii* стабильна при 30, 40, 50, 60 и 65° (100% относительной активности) в течение 60 мин, а при 80° активность достигает нулевого значения в течение 30 мин (фиг.2).

Липаза из *Rhizopus cohnii* проявляет стабильность (100% относительной активности) при значениях pH 7,8,9 в течение 60 мин; при pH 10 теряется 60% активности за 60 мин; при pH 11 теряется до 80% активности за 30 мин (фиг.3).

*Rhizopus cohnii* не продуцирует протеазу, что отличается от значительного числа микроорганизмов, в том числе микромицетов - продуцентов липаз, накапливающих в к.ж. наряду с липазой протеазу, которая снижает со временем липолитическую активность.

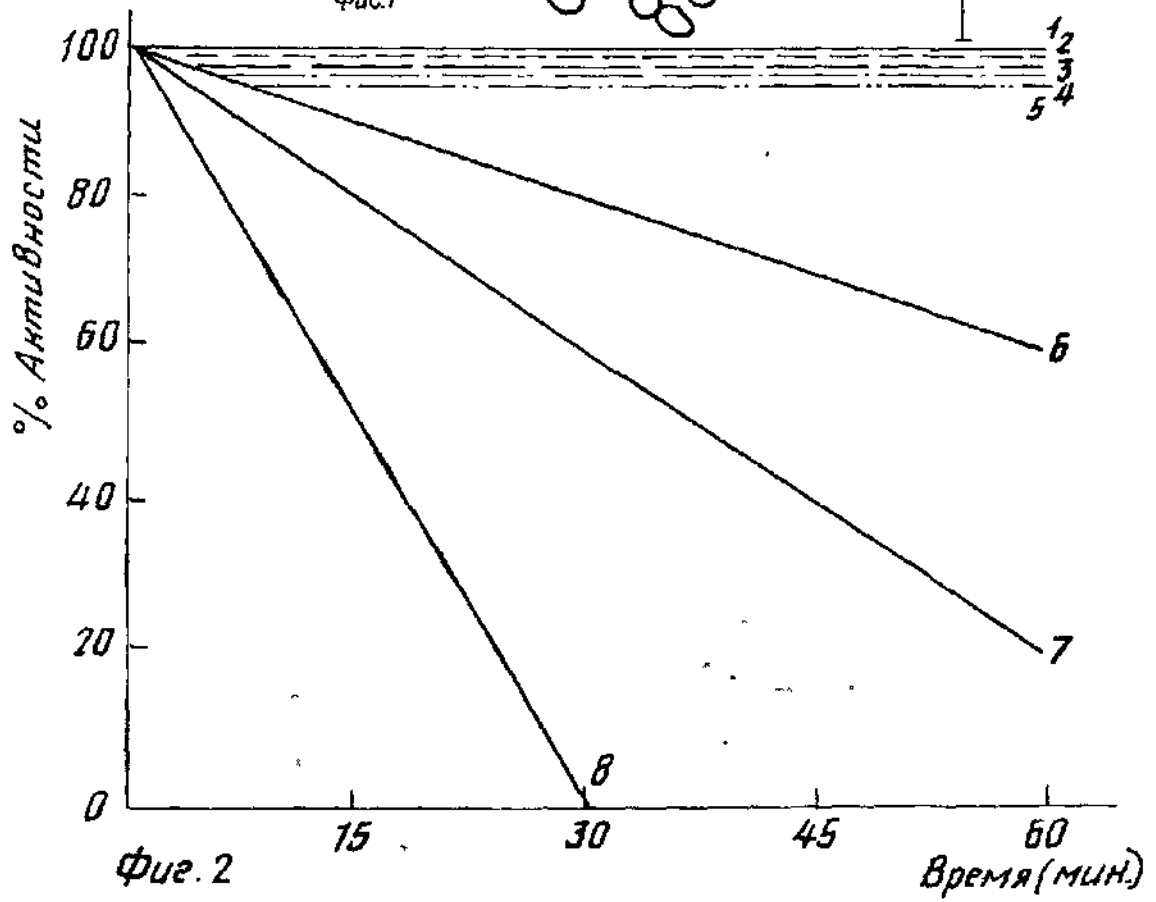
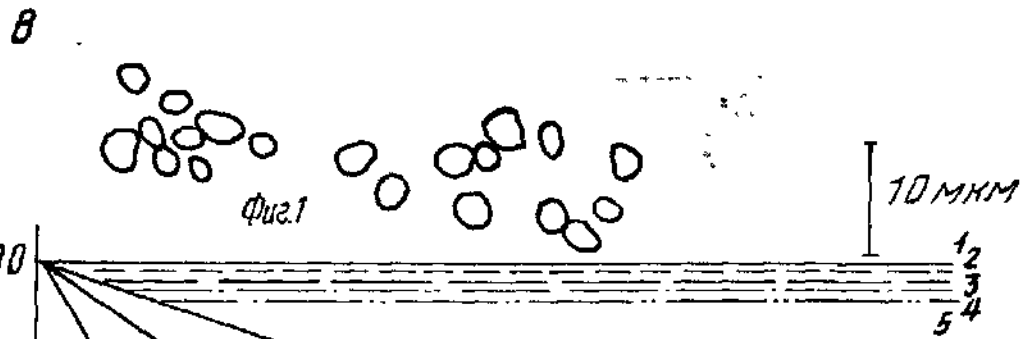
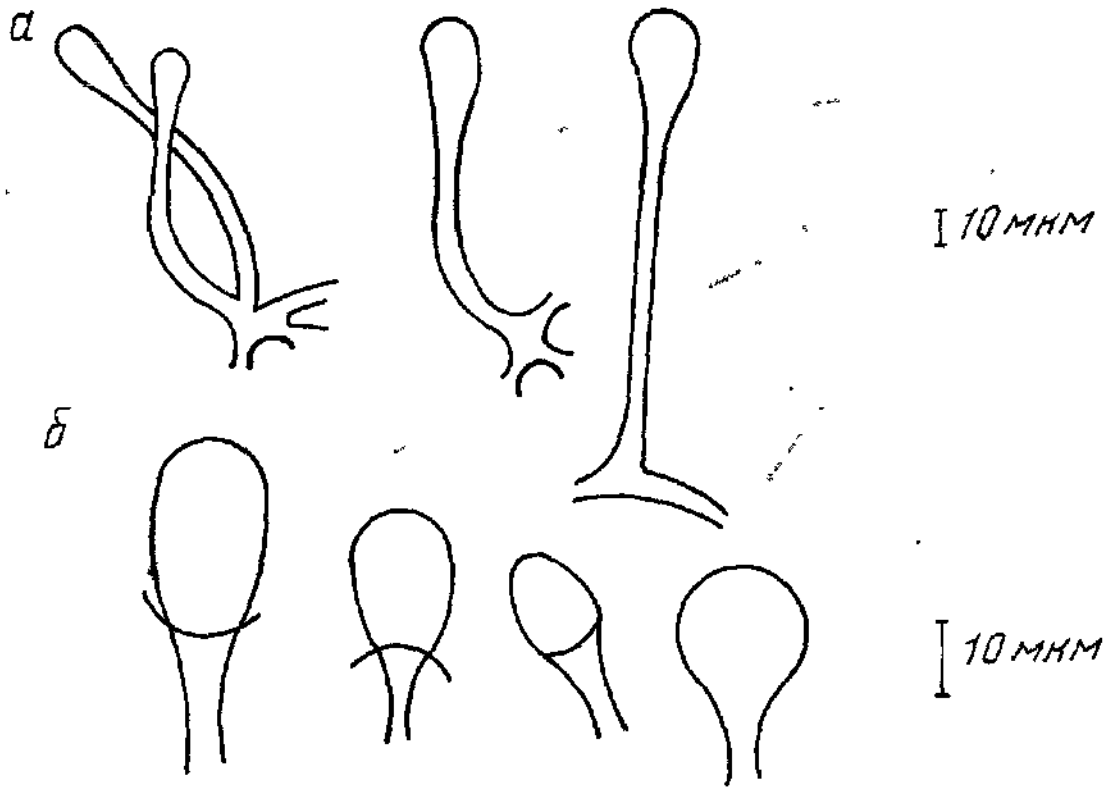
Полученный из штамма гриба *Rhizopus cohnii* липолитический ферментный препарат, содержащий каталазу, участвующую в расщеплении перекиси водорода и удалении ее остатков, перспективен для применения в составе отбеливающих моющих средств, содержащих неорганические перекиси.

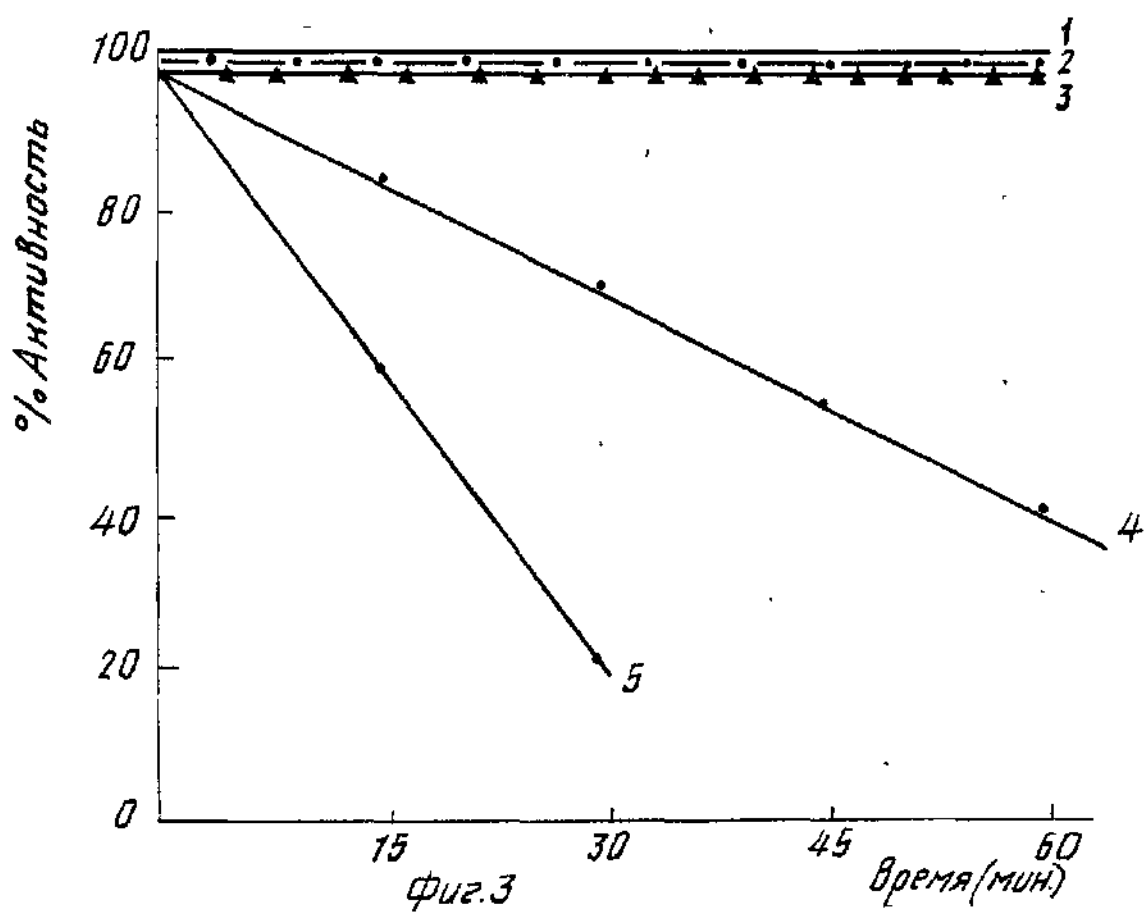
Использование культуры *Rhizopus cohnii* Berl et de Toni - продуцента липазы с каталазной активностью - обеспечивает получение ферментного препарата для применения в качестве биодобавки в составе синтетических моющих средств.

Формула изобретения

Штамм *Rhizopus cohnii* Berl et de Toni ВКПМ F-408 - продуцент липазы с каталазной активностью.

1726513





35

40

45

50

Редактор Н.Горват

Составитель Т.Билай  
Техред М.Моргентал

Корректор И.Муска

Заказ 1249

Тираж

Подписное

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

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