



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО(19) UA (11) 10512 (13) A(51) C 12 N 9/00ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23 XII. 1993 рПублікується
в редакції заявника(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ

1

(21) 93060599
(22) 12.02.93
(24) 25 12 96
(46) 25 12 96 Бюл. № 4
(56) Авторское свидетельство СССР
№ 798173, 1981.
(72) Буглова Тетяна Трифонівна, Еланська
Ірина Олексіївна, Маланчук Валентина Ми-
хайлівна, Захарова Ірина Яківна, Жданова
Неля Миколаївна, Кульман Роберт Августо-
вич, Соколова Олена Василівна, В'юницька
Валентина Олексіївна
(73) Інститут мікробіології та вірусології
ім. Д.К.Заболотного АН України
(57) Способ получения α -галактозидазы,
предусматривающий культивирование про-
дуцирующего фермент микроорганизма на
питательной среде, содержащей соевую му-
ку, моносахарид, сульфат аммония, мочеви-

2

ну, фосфат калия однозамещенный, сульфат
магния, хлорид кальция, дрожжевой экс-
тракт и воду, отличающийся тем, что
используют штамм микроорганизма
Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries
1603⁹ при следующем соотношении компо-
нентов вышеупомянутой питательной сре-
ды, г/л:

соевая мука	20,0-40,0
моносахарид	3,0-7,0
сульфат аммония	2,0-3,0
мочевина	0,25-0,55
фосфат калия одно- замещенный	
сульфат магния	1,5-3,5
хлорид кальция	0,4-0,8
дрожжевой экстракт	2,5-5,5
вода	остальное

Изобретение относится к микробиологи-
ческой промышленности, а именно к способу
получения внеклеточной α -галактозидазы
при помощи микробиологического синтеза.

Наиболее близким к данному изобре-
тению по технической сущности является способ
получения α -галактозидазы с использовани-
ем в качестве продуцента микромицета
Serphalosporium ascremonium 237, который куль-
тивируется глубинным методом при темпера-
туре 26-28°C в течение 48 час на
полусинтетической питательной среде следу-
ющего состава, г/л воды:

соевая мука	2,5
глюкоза	0,15
сульфат аммония	1,4
мочевина	0,3
сульфат магния	0,3
хлорид кальция	0,3
фосфат калия однозамещн.	2,0
дрожжевой экстракт	0,05
pH среды	5,5

α -Галактозидазная активность в конце фер-
ментации достигала 1,15 Е/мл культураль-
ной жидкости.

(19) UA (11) 10512 (13) A

Недостатком указанного способа является сравнительно низкая продуктивность используемого штамма вследствие чего выход целевого продукта невысок.

Задачей настоящего изобретения является разработка способа получения α -галактозидазы с высоким выходом.

Поставленная задача решается тем, что согласно изобретению предусматривается культивирование продуцирующего фермент микроорганизма на питательной среде, содержащей источники углерода, азота, минеральные соли и воду, глубинным методом в условиях аэрации, а в качестве продуцирующего микроорганизма впервые используется представитель рода *Cladosporium*, а именно штамм *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries 16038.

Предлагаемый штамм выделен нами в 1986 г. методом серийных разведений из искусственной ассоциации микроорганизмов, создаваемой для выращивания шампиньонов в условиях тепличного хозяйства фирмы "Лето" (г. Ленинград). Мутагенному воздействию штамм не подвергался.

Культурально-морфологические признаки штамм *C. cladosporioides* 16038 отличаются хорошим спороншением на следующих агаризованных средах: сусло-агаре, картофельно-глюкозном агаре, среде Чапека, Сабуро, Ролена-Тома.

На сусло-агаре колонии широко распростертые, бархатистые, оливково-коричневые, обратная сторона черного цвета. Конидиеносцы хорошо выражены 300-350 мкм длиной, 3-5 мкм шириной, бледно-оливковые, гладкие, с возрастом слегка шероховатые, образуют многочисленные ветвящиеся конидиальные цепочки. Базальные конидии с 1-2 перегородками или одноклеточные размером 2-3 x 30 мкм, вначале гладкие, с возрастом слегка мелкобугорчатые. Конидии в длинных ветвящихся цепочках — одноклеточные, эллиптические, овальные или почти шаровидные, гладкие, бледно-оливковые, размером 2-4 x 3-7 мкм.

На среде Чапека воздушный мицелий слабо развит, колонии порошистые или слабо войлочные. Мицелий состоит из узких неокрашенных гиф шириной 2-4 мкм и темноокрашенных гиф шириной 4-10 мкм. Конидиеносцы образуются терминально или латерально из растущих гиф, длиной 25-350 мкм и шириной 2-55 мкм, гладкие или слегка шероховатые, нерегулярно септированные, темноокрашенные с более или менее одинаковым диаметром на протяжении всей длины с одной или двумя короткими промежуточными септами. Конидиальные головки от 50 до 100 мкм в диаметре, конидиальные цепочки тер-

минальные на конидиеносцах или латеральные, возникающие из прорастающих веточек. Конидии гладкие или слегка шероховатые двух типов: одноклеточные, размером в среднем 2-8 x 2-4 мкм, овальные, лимоновидные, эллиптические, слегка суженные с одного или двух концов; второй тип конидий — двух-, трехклеточные, цилиндрические, базальные, с двумя — тремя перегородками, размером 12-14 x 4-6 мкм.

На картофельной среде колонии бархатистые, слабо развитые, зеленовато-коричневого цвета, обратная сторона — оливково-черного цвета. Конидиеносцы достигают размера 350 мкм длиной и 26 мкм шириной, конидии эллиптической или лимоновидной формы, в основном гладкие, редко шиповатые, коричнево-оливкового цвета. Конидии двух видов: одноклеточные 3-7 x 2-4 мкм и базальные размером 3-25 x 3-6 мкм в основном шероховатые, удлиненной, цилиндрической или эллиптической формы.

Линейный рост колоний на агаризованных средах: на сусло-агаре на 5-ый день 3,8 см, на 10-ый день — 5,5 см; на картофельно-глюкозной среде на 5-ый день — 2,4 см, на 10-ый — 4,2 см; на среде Чапека — на 5-ый день — 3,6 см, на 10-ый день — 4,6 см.

Из источников углерода усваивают глюкозу, галактозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, арабинозу, крахмал, сорбит, дульцит и др. Хорошо растет на нитратных, аммонийных и органических источниках азота.

Штамм растет в широких пределах pH от 3,5 до 8,5, при температуре 26-28°C, хранится на косяках с сусло-агаром, периодичность пересевов — один раз в 3-4 месяца.

Культура *C. cladosporioides* 16038 не патогенна, а культуральная жидкость, полученная при глубинном культивировании штамма, не токсична. Штамм хранится в Коллекции музея культур промышленных микроорганизмов института "ВНИИ генетики" под номером F-581.

Штамм *C. cladosporioides* 16038 синтезирует внеклеточную α -галактозидазу при выращивании глубинным методом при скорости вращения мешалки 220 об/мин и температуре 26-28°C на среде следующего состава, г/л воды:

соевая мука	20-40
лактоза	3-7
сульфат аммония	2-3
мочевина	0,25-0,55
фосфат калия однозам.	3,0-7,0
сульфат магния	1,5-3,5
хлорид кальция	0,4-0,8
дрожжевой автолизат	2,5-5,5

Для приготовления среды используют дистиллированную воду, pH доводят до 5,3-

5,5. сред у разливают по 100 мл в 0,5 л качалочные колбы и стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин. После охлаждения сред у засевают кусочками (0,5x0,5 см) вегетативного мицелия и выращивают инокулюм в течение 72 часов на качалке в указанных выше условиях. Полученным инокулюмом в количестве 3 об.% засевают ферментационные колбы со средой того же состава и продуцент культивируют глубинным методом в течение 120-144 час до достижения максимальной α -галактозидазной активности в культуральной жидкости (см.рис.)

После окончания ферментации мицелий удаляли путем фильтрования и в фильтрате определяли α -галактозидазную активность, используя синтетические (п-нитрофенил- α -Д-галактопиранозид) и естественные (мелибиоза, рафиноза) субстраты.

При определении α -галактозидазной активности с использованием в качестве субстрата п-нитрофенил- α -Д-галактопиранозид (п-НФГ) к 0,1 мл культуральной жидкости соответствующего разведения добавляют 0,1 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 4,6, 0,1 мл 0,01 М раствора п-НФГ, смесь инкубируют 10 мин при 37°C и останавливают реакцию добавлением 2 мл 1 М раствора углекислого натрия. Оптическую плотность раствора определяют при длине волны 400 нм и по калибровочной кривой находят количество отщепившегося п-нитрофенола. За единицу активности α -галактозидазы принято то количество фермента, которое отщепляет 1 мкмоль п-нитрофенола в минуту.

Определение α -галактозидазной активности с использованием в качестве субстратов мелибиозы и рафинозы осуществляли следующим образом: к 1 мл культуральной жидкости добавляли 0,5 мл 0,06 М раствора мелибиозы (или рафинозы) и 0,5 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 5,2, смесь инкубировали 2 часа при температуре 40°C, реакцию останавливали путем прогрева пробы в кипящей водяной бане в течение 5 мин, затем добавляли к охлажденной пробе по 1 мл 1,8% раствора гидроксида бария и 2% раствора сульфата цинка для осаждения белка. Полученную смесь центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли содержание глюкозы глюкозооксидазным методом, а содержание галактозы — по методу Шомоди-Нельсона. За единицу активности фермента принято то его количество, которое отщепляет 1 мкмоль глюкозы (субстрат мелибиоза) или 1 мкмоль галактозы (субстрат рафиноза) за 1 минуту.

Активность инвертазы определяли аналогичным образом, используя в качестве субстрата 0,06 М раствор сахарозы. Количество инвертного сахара определяли по методу Шомоди-Нельсона. За единицу активности принято то количество фермента, в результате действия которого отщепляется 1 мкмоль глюкозы в минуту.

В таблице приведены сравнительные данные по биосинтезу α -галактозидазы заявляемым штаммом и прототипом при глубинном культивировании в оптимальных для каждого из них условиях.

Как видно из таблицы, α -галактозидазная активность заявляемого штамма, учитываемая по гидролизу п-НФГ, в 4,5 раза выше, чем у прототипа. В культуральной жидкости *C.cladosporioides* 16038 не обнаружена инвертазная активность, примеси которой ухудшают качество препаратов α -галактозидазы. Установлено также, что α -галактозидаза заявляемого штамма способна гидролизовать α -галактозидные связи в естественных субстратах — олигосахаридах мелибиозе и рафинозе, что указывает на перспективность применения данного фермента в пищевой промышленности с целью улучшения качества соевых продуктов и увеличения выхода сахара в свеклосахарном производстве.

Пример 1.

Готовится питательная среда следующего состава, г/л:

Соевая мука	10,0
Лактоза	1,0
Сульфат аммония	1,5
Мочевина	0,1
Фосфат калия однозамещенный	1,0
Сульфат магния	0,5
Хлорид кальция	0,2
Дрожжевой автолизат	1,0
Дистиллированная вода	1000 мл

Кислотность среды должна находиться в пределах 5,3-5,5, готовая среда разливается по 100 мл в качалочные колбы емкостью 0,5 л и стерилизуется при 0,5 атм в течение 30 мин. Для получения посевного материала колбы засеваются в асептических условиях кусочками вегетативного мицелия (0,5 x 0,5 см) и культура выращивается при температуре 26-28°C на качалке со скоростью вращения 220 об/мин. Затем 3-х суточным посевным материалом в количестве 3 об.% засеваются ферментационные колбы со средой того же состава, продолжительность выращивания культуры — 120 часов, α -галактозидазная активность в конце ферментации составляет 2,4 Е/мл культураль-

ной жидкости. Инвертазная активность отсутствует.

Пример 2.

Все, как в примере 1, за исключением того, что для культивирования штамма *C. cladosporioides* 16038 используется питательная среда следующего состава, г/л:

Соевая мука	20,0	
Лактоза	3,0	
Сульфат аммония	2,0	10
Мочевина	0,25	
Фосфат калия однозамещенный	3,0	
Сульфат магния	1,5	
Хлорид кальция	0,4	15
Дрожжевой автолизат	2,5	
Дистиллированная вода	1000 мл	

α -Галактозидазная активность культуры, выращенной в течение 144 час составляла 3,5 Е/мл культуральной жидкости, инвертазная активность отсутствовала.

Пример 3.

Все, как в примере 1, за исключением того, что для культивирования штамма *C. cladosporioides* 16038 используется питательная среда следующего состава, г/л:

Соевая мука	30,0	
Лактоза	5,0	
Сульфат аммония	2,5	30
Мочевина	0,4	
Фосфат калия однозамещенный	5,0	
Сульфат магния	2,5	
Хлорид кальция	0,6	35
Дрожжевой автолизат	4,0	
Дистиллированная вода	1000 мл	

α -Галактозидазная активность после 144 час культивирования штамма составля-

40

ла 5,2 Е/мл культуральной жидкости, инвертазная активность отсутствовала.

Пример 4.

Все, как в примере 1, за исключением того, что для культивирования штамма *C. cladosporioides* 16038 используется питательная среда следующего состава, г/л:

Соевая мука	40,0	
Лактоза	7,0	
Сульфат аммония	3,0	
Мочевина	0,55	
Фосфат калия однозамещенный	7,0	
Сульфат магния	3,5	
Хлорид кальция	0,8	
Дрожжевой автолизат	5,5	
Дистиллированная вода	1000 мл	

α -Галактозидазная активность в культуральной жидкости продуцента в конце ферментации составляла 4,5 Е/мл, инвертазная - отсутствовала.

Пример 5.

Все, как в примере 1, за исключением того, что для культивирования штамма *C. cladosporioides* 16038 используется питательная среда следующего состава, г/л:

Соевая мука	50,0	
Лактоза	9,0	
Сульфат аммония	3,5	
Мочевина	0,7	
Фосфат калия однозамещенный	9,0	
Сульфат магния	4,5	
Хлорид кальция	1,0	
Дрожжевой автолизат	7,0	

α -Галактозидазная активность в конце ферментации составляла 3,8 Е/мл культуральной жидкости, инвертазная активность отсутствовала.

Название штамма	α -галактозидазная активность, Е/мл			Инвертазная активность, Е/мл
	п-НФГ	Рафиноза	Мелибиоза	
Заявляемый штамм- <i>Cladosporium cladosporioides</i> 16038	5,2	2,23	1,3	0
Прототип- <i>Cephalosporium acremonium</i> 237	1,15	-	-	0

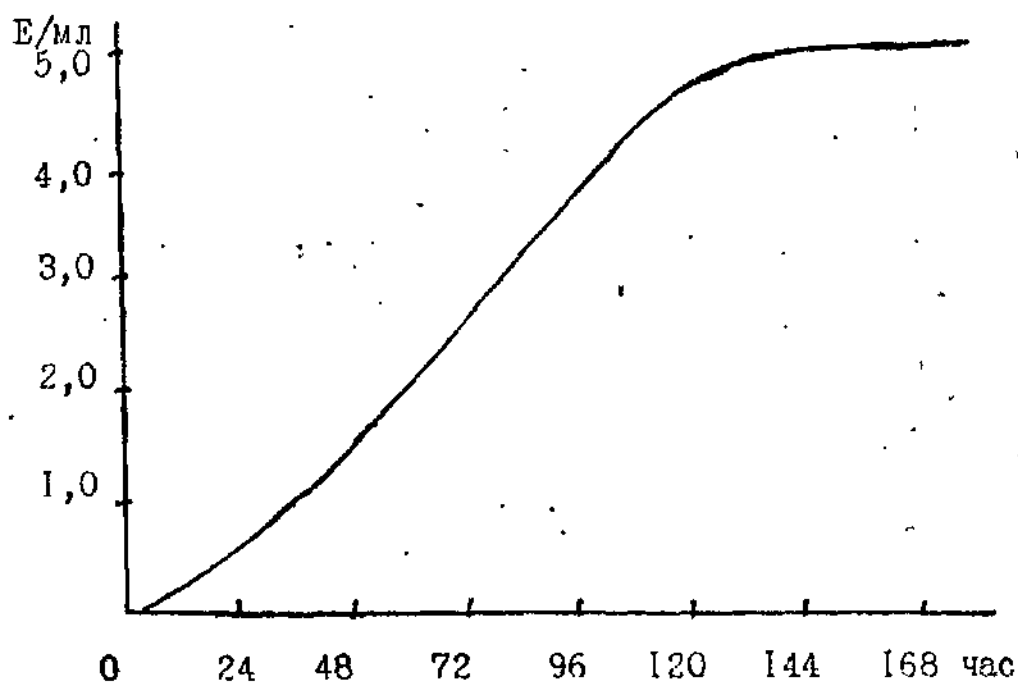


Рис. α -Галактозидазная активность штамма *C. cladosporioides* 16038 в динамике.

Упорядник В.Смирнов

Техред М.Моргентал

Коректор М.Самборська

Замовлення 4018

Тираж

Підписав

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

