



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(61) Дополнительное к авт. свид-ву —

(22) Заявлено 15.07.80 (21) 2956199/30-15

с присоединением заявки № —

(23) Приоритет —

Опубликовано 30.11.81. Бюллетень № 44

Дата опубликования описания 30.11.81

119670
(11) 885253

(51) М. Кл.³
С 12 N 9/28
С 12 N 9/56

(53) УДК 577.156.
.577.154.31
(088.8)

(72) Авторы
изобретения

Т.И.Иванова, А.С.Кривиский, Л.М.Ермакова, Н.П.Шурупова,
Г.В.Ставинская, В.А.Удовченко, А.П.Шарапов,
К.А.Калуныц и В.М.Степанов

(71) Заявитель

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов

13 ПАТЕНТНО-
ТЕХНИЧЕСКИЙ

(54) ШТАММ *BACILLUS SUBTILIS* ФУ-79-
-ПРОДУЦЕНТ α -АМИЛАЗЫ И ПРОТЕАЗЫ

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается получения штаммов-продуцентов α -амилазы и протеазы.

Препараты, содержащие α -амилазу и протеазу, широко используются в народном хозяйстве: в животноводстве, пищевой, текстильной, бумажной промышленности.

Лучшим из известных в настоящее время продуцентов α -амилазы, используемым в производстве, является штамм *Bac.subtilis* ВНИИ генетика-44 [1].

Известно также, что некоторые штаммы бацилл продуцируют наряду с α -амилазой щелочную и нейтральную протеазы [2].

Существенным недостатком известных штаммов-продуцентов α -амилазы и продуцентов протеазы, в том числе и штаммов, принятых в качестве базовых образцов, является их чувствительность к производственным фагам.

В тех случаях, когда фаговый фон на производстве повышается, не исключены операции, сопровождающиеся лизисом культуры.

Цель изобретения — получение штамма-продуцента α -амилазы и про-

теазы, обладающего широким спектром фагоустойчивости по отношению к специфическим фагам, встречающимся в производственных условиях, и не уступающего лучшим известным штаммам по основному производственному показателю: уровню ферментативной активности и скорости роста.

5
10
15
20
25
30

Новый штамм *Bac.subtilis* ФУ-79, являющийся предметом предлагаемого изобретения, получен в результате селекции на фагоустойчивость к ряду выделенных образцов фагов среди потомства колоний, развившихся после посева на газон фагочувствительного штамма *Bac.subtilis* 103, фаголизата из производственного ферментера, засеянного культурой штамма *Bac.subtilis* У-43.

Таким образом, исходным для получения предлагаемого продуцента α -амилазы и протеазы штамма *Bac.subtilis* ФУ-79, является штамм *Bac.subtilis* 103. На производстве штамм 103 используется, как продуцент амилитических и протеолитических ферментов. Предлагаемый штамм *Bacillus subtilis* ФУ-79 в зависимости от условий культивирования может продуцировать α -амилазу или протеазу.

Штамм *Bacillus subtilis* ФУ-79— продуцент α -амилазы и протеазы хранится в Центральном музее промышленных микроорганизмов Всесоюзного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов и имеет регистрационный № ЦМПМ В-1989.

Биологическая характеристика штамма ФУ-79.

Культурально-морфологические признаки штамма *Bac. subtilis* ФУ-79.

Морфология. Клетки штамма представляют собой грамположительные, спорообразующие палочки размером $1,7-3,0 \times 0,4-0,7$ мк. Размер спор: $1,0-1,2 \times 0,5-0,7$ мк.

Мясо-пептонный агар (МПА). Через 48 ч роста при 37°C на МПА культура образует беловатые; выпуклые, морщинистые колонии диаметром 2,5-4 мм.

Мясо-пептонный бульон (МПБ). При выращивании в МПБ через 24 ч при 37°C без встряхивания на поверхности образуется морщинистая пленка. Рост без помутнения среды. При встряхивании на качалке среда мутнеет. При стоянии образуется пленка.

Агаризованная среда Хоттингера. При выращивании в течение 24 ч при 37°C культура образует желтовато-серые круглые, выпуклые, морщинистые колонии с лопастным краем диаметром 3,5-4,5 мм.

На синтетической среде с минеральным азотом (среда Спецайзена). Культура растет в виде мелких, круглых колоний диаметром 1-2 мм серовато-белого цвета.

На ломтиках картофеля культура образует морщинистую, складчатую пленку серовато-белого цвета. Со временем пленка ослизняется.

Желатину разжижает. Крахмал гидролизует. Молоко пептонизирует.

Отношение к источникам углерода. Глюкозу, лактозу, фруктозу, сахарозу усваивает.

Хранение штамма производят в лиофильно высушенном состоянии в стеклянных ампулах.

Предлагаемый штамм *Bac. subtilis* ФУ-79— продуцент α -амилазы и протеазы отличается широким спектром фагоустойчивости.

Штамм ФУ-79 стабильно сохраняет признаки фагоустойчивости, что было многократно проверено в ряде пере-seвов. В процессе роста он не отщепляет фагочувствительных клонов и не вытесняется фагочувствительным штаммом (например, У-43) в смешанной культуре. Помимо устойчивости к производственным фагам штамм *Bac. subtilis* ФУ-79 характеризуется тем, что достигает высокого уровня активности α -амилазы за более короткий срок ферментации (240 ед/мл за 44 ч), в то время как штамм *Bac. subtilis*

В-44, принятый в качестве базового образца (304 ед/мл за 62 ч), а также более высокой активностью протеазы по сравнению со штаммом *Bac. subtilis*-50.

5 Для проверки ферментативной активности предлагаемого штамма ФУ-79 проводят опыты по глубинному культивированию его в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащими 50 мл питательной среды. Для биосинтеза α -амилазы штамм выращивают на среде следующего состава, %: крахмал осажаренный 10; CaCO_3 0,03; лактоза 0,3; K_2SO_4 0,3; MgSO_4 0,015; NaCl 0,03; CuSO_4 0,00039; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,84; кукурузный экстракт 1,2, БВК 0,24; вода водопроводная (рН до стерилизации 7) 2. Число оборотов качалки 180 об/мин. Выращивание осуществляют при 37°C в течение 46 ч. Амилолитическую активность в культуральной жидкости определяют по методу БЕРА.

20 Для биосинтеза используют среду состава, %: крахмал осажаренный 8; CaCO_3 0,05; MgSO_4 0,05; KCl 0,15; CaCl_2 0,01; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1,2; кукурузный экстракт 0,8; БВК 0,4 (рН до стерилизации 7) 4. Число оборотов качалки 220 об/мин. Выращивание осуществляют при 37°C в течение 44 ч.

30 Протеолитическую активность определяют модифицированным методом Ансона (ГОСТ 20264.2-74). Параллельно в этих же условиях выращивают штаммы *Bac. subtilis*-103 и У-43.

35 Амилолитическая (АС) и протеолитическая (ПС) активности штаммов *Bac. subtilis* ФУ-79, 103 и У-43 приведены в таблице.

Опыт	Штамм	АС ед/мл	ПС, ед/мл
40	ФУ-79	357	14,7
	103	210	6,8
45	У-43	315	9,6
	ФУ-79	364	13,8
50	103	207	6,4
	У-43	333	8
55	ФУ-79	342	14,2
	103	221	6,3
60	У-43	308	10,2
	Средняя актив-ность по 3 опытам	ФУ-79 354,3	14,2
65	103	212,7	6,5
	У-43	318,7	9,3

Из таблицы видно, что амилолитическая активность предлагаемого штамма ФУ-79 превышает активность штаммов 103 и У-43 на 66,6 и 11,2%, а протеолитическая активность на 118,5 и 52,7% соответственно.

Использование штамма *Bac.subtilis* ФУ-79 для получения α -амилазы и протеазы в производственных условиях.

Пример 1. Посевной материал получают выращиванием штамма *Bac.subtilis* ФУ-79 в колбах в виде пленки в жидкой питательной среде состава, %: крахмал 10; аммоний лимоннокислый 2-х замещенный 3; KH_2PO_4 0,2; Na_2HPO_4 0,03; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,15; CaSO_4 0,14; FeSO_4 0,002; MnSO_4 0,000125; CuSO_4 0,00075; p -аминобензойная кислота 0,001; вода 86,2; pH 6,0-6,3. Температура 37°C. Полученным посевным материалом, составляющим 0,01% объема среды в ферментере, засевают аппарат объемом 20 м³ с 10 м³ ферментационной среды следующего состава, %: крахмал осахаренный 22,5 (10% вносится сразу, остальное в виде подпитки); CaCO_3 0,03; NaCl 0,03; K_2SO_4 0,3; MgSO_4 0,015; CuSO_4 0,00039; БВК 0,24; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,84; кукурузный экстракт 1,2; пропинол (пеногаситель) 0,05. Ферментацию ведут при 37°C с аэрацией в течение 44 ч. Культуральную жидкость с амилолитической активностью 240 ед/мл (колориметрический метод ГОСТ 20264.4-74) высушивают на распылительной сушилке. Выход готового продукта равен 72%.

Пример 2. Штамм-продуцент и среда для приготовления посевного материала те же, что и в примере 1. Культивирование проводят в ферментере объемом 20 м³ с 10 м³ ферментационной среды, %: крахмал осахаренный 13; CaCO_3 0,05; KCl 0,15; CaCl_2 0,01; MgSO_4 0,05; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1,2; кукурузный экстракт 0,8; пеногаситель пропинол 0,05; pH 6,6.

Процесс ферментации идет при 37°C с аэрацией в течение 38 ч. Культуральную жидкость, имеющую активность протеазы, равную 30 ед/мл, определенную по модифицированному методу Ансона (ГОСТ 20265.2-74), высушивают на распылительной сушилке. Выход сухого продукта 60%.

Таким образом, предлагаемый штамм *Bac.subtilis* ФУ-78 может быть использован как продуцент α -амилазы от исходного штамма *Bac.subtilis* 103 и других известных штаммов-продуцентов α -амилазы и продуцентов протеазы широким спектром устойчивости к фагам, распространенным на Вышеволоцком заводе, ряду фагов, выделенных на других ферментных заводах, ряду лабораторных штаммов фагов, специфичных для *Bac.subtilis*.

Использование фагоустойчивости штамма ФУ-79 позволит обеспечить более стабильное производство ферментных препаратов. Кроме того, по сравнению с другими продуцентами, штамм *Bac.subtilis* ФУ-79 обладает более высокими уровнями активности α -амилазы и протеазы.

Формула изобретения

Штамм *Bacillus subtilis* ФУ-79-продуцент α -амилазы и протеазы. Штамм хранится в Центральном музее промышленных микроорганизмов Всесоюзного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов и имеет регистрационный номер ЦМПМ В-1989.

Источники информации,

принятые во внимание при экспертизе
1. Авторское свидетельство СССР по заявке № 2711504/13, кл. С 12 D 13/10, 1979.

2. Klay L., Moser P.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 34, p. 600-604, 1969.

Составитель Т.Тулякова

Редактор М.Лысогорова Техред Е.Харитончик Корректор М.Коста

Заказ 10446/33 Тираж 531 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д.4/5

филиал ППП "Патент", г.Ужгород, ул.Проектная, 4.