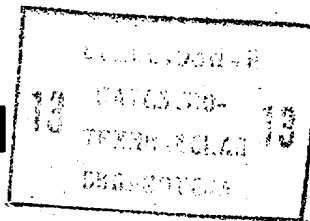


SU 1026656 A

3 (5) C 12 N 9/08

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ



ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

- (21) 2930501/28-13
(22) 04.06.80
(31) Р 2924875.7
(32) 20.06.79
(33) ФРГ
(46) 30.06.83. Бюл. № 24
(72) Хельмгард Гауль, Георг Шаволь,
Ханс Зайдель и Клаус Бокамп (ФРГ)
(71) Бёрингер Маннхайм ГмБХ (ФРГ)
(53) 577.15(088.8)

(56) 1. Патент США № 4093517,
кл. С 12 D 13/10, опублик. 1978
(прототип).

(54) (57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНОКСИДАЗЫ, предусматривающий культивирование продуцирующего микроорганизма, в том числе и рода *Streptomyces*, на питательной среде, содержащей дрожжевой экстракт, минеральные соли K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и воду, с последующим выделением фермента из культуральной жидкости и/или из клеток, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что, с целью

удешевления процесса, в качестве продуцирующего микроорганизма из рода *Streptomycetaceae* используют *Streptomyces griseofuscus* DSM 40191 или *Streptomyces hirsuticulus* DSM 40771 или *Streptomyces acidomyceticus* DSM 40798 и/или *Arthrobacter paraffineus* DSM 312.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивирование ведут на среде, в состав которой дополнительно вводят растворимый крахмал, пептон и минеральные соли CaSO_4 , KNO_3 , NaCl при следующем соотношении компонентов, вес. %:

Растворимый крахмал	10-30
Пептон	2-10
Дрожжевой экстракт	2-10
CaCO ₃	1-3
KNO ₃	0,5-3
K ₂ HPO ₄	0,2-2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5-3
NaCl	0,2-2
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01-0,05
Вода	Остальное

SU ⁽¹¹⁾ 1026656 A

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается способа получения холестериноксидазы из микроорганизмов.

Известны различные виды микроорганизмов - продуцентов холестериноксидазы и способы получения этого фермента.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату к предлагаемому является способ получения холестериноксидазы, предусматривающий культивирование продуцирующего микроорганизма, в том числе и рода *Streptomyces*, на питательной среде, содержащей дрожжевой экстракт, минеральные соли K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и воду, с последующим выделением фермента из культуральной жидкости и/или из клеток [1].

Недостаток такого способа состоит в необходимости добавления индукторов для повышения активности фермента, которая невелика и достигает небольшой величины порядка 100 U/л.

Цель изобретения - удешевление процесса.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу получения холестериноксидазы, предусматривающему культивирование продуцирующего микроорганизма, в том числе и рода *Streptomyces*, на питательной среде, содержащей дрожжевой экстракт, минеральные соли K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и воду, с последующим выделением фермента из культуральной жидкости и/или из клеток, в качестве продуцирующего микроорганизма из рода *Streptomyces* используют *Streptomyces griseofuscus* DSM 40191 или *Streptomyces hirscentius* DSM 40771 или *Streptomyces acidomyceticus* DSM 40798 и/или *Arthrobacter paraffin* DSM 312.

Кроме того, культивирование ведут на среде, в состав которой дополнительно вводят растворимый крахмал, пептон и минеральные соли $CaCO_3$, KNO_3 , $NaCl$ при следующем соотношении компонентов, вес. %:

Растворимый крахмал	10-30
Пептон	2-10
Дрожжевой экстракт	2-10
$CaCO_3$	1-3
KNO_3	0,5-3
K_2HPO_4	0,2-2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5-3
$NaCl$	0,2-2
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01-0,05
Вода	Остальное
Сущность изобретения состоит в использовании штаммов продуцентов	

холестериноксидазы, способных продуцировать фермент без индуктора на сбалансированной по ростовым факторам питательной среде подобранного состава.

Ниже представлены характеристики используемых согласно изобретению штаммов микроорганизмов.

Streptomyces griseofuscus

BMU 1616, DSM 40191,

ATCC 23916

Общая характеристика: грамположительный, аэробный организм, который образует воздушный мицелий.

Окраска: колонии воздушного мицелия при росте на дрожжево-солодовом агаре, агаре из овсяных хлопьев, на крахмальном агаре с минеральными солями и на глицерин-аспарагиновом агаре могут быть серии красных или серых тонов (коричнево-коричнево-серый). На задней стороне колоний не видно никаких специфических пигментов.

Растворимые пигменты: никакого образования меланоидных пигментов в пептон-дрожжевом агаре с железом, тирозиновом агаре или триптон-дрожжевом питательном растворе, а также образования пигментов в дрожжево-солодовом агаре, агаре из овсяных хлопьев, крахмальном агаре с минеральными солями или глицерин-аспарагиновом агаре нет.

Морфология цепи спор: спиральные участки. Зрелые, узкоспиральные цепи спор содержат 10-50 спор, поверхность спор гладкая.

Использование С-источников.

Использование D-глюкозы, L-арабинозы, D-ксилозы, D-маннита и D-фруктозы. Никакого роста или скудный рост на сахарозе, инозите, рамнозе, рафинозе и лактозе.

Образцы алифатических жирных кислот: для представителей семейства *Streptomyces* характерно преимущественное наличие изо/антеизо-С-15 и изо/антеизо-С-17.

Стенка клетки содержит типичную для *Streptomyces* LL-диаминопимелиновую кислоту. DL-Диаминопимелиновая или окси-DL-диаминопимелиновая кислота отсутствует.

Streptomyces nigroscopicus

BMU 2093, DSM 40771,

ATCC 10976

Общая характеристика: грамположительный, аэробный организм, который образует воздушный мицелий.

Окраска: колонии воздушного мицелия при росте на дрожжево-солодовом агаре, агаре из овсяных хлопьев и крахмальном агаре с минеральными солями могут быть серии красных и серых тонов (коричнево-коричнево-серый). На задней стороне колоний не

видно никаких специфических пигментов.

Растворимые пигменты: никакого образования меланоидных пигментов в пептон-дрожжевом агаре, а также образования пигмента в дрожжево-солодовом агаре, крахмальном агаре с минеральными солями и агаре из овсяных хлопьев нет.

Морфология цепей спор: спиральные участки. Цепи спор в узких, х замкнутых спиралях, часто на ножках, состоят из 10-50 спор, поверхность спор гладкая.

Использование С-источников.

Использование D-глюкозы, D-ксилозы, D-фруктозы и D-маннита. Никакого роста или очень скудный рост на L-арабинозе, рамнозе, сахарозе, рафинозе, инозите и лактозе.

Образцы алифатических кислот: для представителей семейства Streptomycetaceae характерно преимущественное наличие изо/антеизо-С-15 и изо/антеизо-С-17-алифатических кислот.

Стенка клетки содержит типичную для Streptomyces LL-диаминопимелиновую кислоту. DL-Диаминопимелиновая или окси-DL-диаминопимелиновая кислота отсутствует.

Streptomyces acidomyceticus
BMTU 1873, DSM 40798,
ATCC 11611

Общая характеристика: грамположительный, аэробный организм, который образует воздушный мицелий.

Окраска: колонии воздушного мицелия при росте на дрожжево-солодовом агаре, агаре из овсяных хлопьев и крахмальном агаре с минеральными солями могут быть серии красных (серых) тонов (розовый, корице-коричневый). На задней стороне колоний при росте на дрожжево-солодовом агаре заметен пигмент желто-коричневого цвета, на агаре из овсяных хлопьев - красно-коричневого цвета и на крахмальном агаре с минеральными солями - черного цвета.

Растворимые пигменты: образование меланоидных пигментов в пептон-дрожжевом агаре с железом. Другие пигменты типа упомянутых не образуются.

Морфология цепей спор: участки Retinasculiarerti со многими прямыми гибкими цепями спор при росте на дрожжево-солодовом агаре. На агаре из овсяных хлопьев и крахмальном агаре с минеральными солями - образование крючков, петель и коротких нерегулярных спиралей. Поверхность спор гладкая.

Использование С-источников.

Использование D-глюкозы, L-арабинозы, D-фруктозы и сахарозы. Ни-

какого роста на рамнозе, лактозе, рафинозе, D-манните и инозите.

Для представителей семейства Streptomycetaceae характерны изо/антеизо-С-15 и изо/антеизо-С-17-образцы алифатических кислот.

Стенка клетки содержит типичную для Streptomyces LL-диаминопимелиновую кислоту. DL-Диаминопимелиновая кислота или окси-DL-диаминопимелиновая кислота отсутствуют.

Arthrobacter paraffineus
BMTU 501, DSM 312.

Морфология: от коротких до средней длины, коринеобразные столбики с типичным "снэппинг" -делением. Нет никакого явно выраженного цикла развития, клетки на всех фазах развития столбикообразные. Клетки грамположительны и неподвижны. Никакого образования спор. Колонии на HD-агаре бело-кремовой окраски и блестящие; нет никакого образования пигментов.

Физиологические свойства.

Отношение к кислороду - ярко выраженное аэробное; образования кислот из глюкозы и лактозы не происходит; катализата образуется; оксидаза не определяется; восстановление нитрата - положительное; расщепление крахмала, желатины и казеина - отрицательное; расщепление трибутина - слабо положительное; уреазы образуется; образование индола и H_2S - отрицательное; использование цитрата - положительное; солевая толерантность - расчет в случае 5% NaCl, никакого роста при 10% NaCl.

Пептидогликан стенки клетки содержит мезо-диамино-пимелиновую кислоту.

Пример 1. Streptomyces griseofuscus DSM 40191 (равноценен ATCC 23916 и IFO 12870) культивируют в среде следующего состава, г/л:

45	Растворимый крахмал	20
	Дрожжевой экстракт (Дифко)	4
	Пептон (мясной)	5
50	Карбонат кальция	3
	Нитрат калия	1
	Дикалий-фосфат K_2HPO_4	0,5
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,03
	Хлористый натрий	0,5
55	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02

Штамм культивируют 2 дня в 10 мл среды в колбе Эрленмейера на 100 мл, затем переносят в 40 мл такой же среды в колбе Эрленмейера (3 дня), отбирают пробу и проверяют активность холестерина дозы в отделенном культуральном растворе и в экстракте-сырце. Экстракт-сырец получают центрифугированием 5 мл культу-

рального раствора, промыванием биомассы 0,05 М фосфатным буфером pH 7, торным суспендированием в 5 мл такого же буфера и распределением посредством добавки 0,2 мл 10%-ного раствора продукта "Тритон-Х-100". После 10 мин выдержки при комнатной температуре центрифугируют и получают отделившийся культуральный раствор в виде экстракта-сырца.

Для проведения определения активности измеряют образование холестерина посредством прироста погасания (экстинкции) при 240 мм, при pH 7,5 в 0,5 моль/л фосфатном буфере. Для контроля каждый раз определяют холостую величину без добавления холестерина.

Были получены следующие значения ν /л:

Общее - культурального раствора 5741

Экстракта-сырца, полученного из этого раствора 1118

Отделенного культурального раствора 4623

Пример 2. Повторяют способ по примеру 1 с применением *Streptomyces higroscopicus* DSM 4077 (соответствует ATCC 10976).

Определения проводят через 3 и 4 дня в течение культивирования.

Значения активности приведены в таблице.

В случае культивирования в присутствии 2% холестерина в качестве

индуктора прирост активности составляет величину меньше половины.

Пример 3. Повторяют способ по примеру 1 с применением *Streptomyces acidomyceticus* DSM 40789 (соответствует ATCC 11611 и IFO 3125).

Результаты при длительности культивирования 3 и 4 дня показаны в таблице.

10 При проведении культивирования при наличии 2% холестерина в качестве индуктора прирост активности увеличивается на 50%.

15 Пример 4. Повторяют способ по примеру 1 с применением *Arthrobacter paraffineus* DS 312 (соответствует ATCC 15591), однако при условии добавления к среде 3% холестерина в виде суспензии в дрожжевом экстракте (суммарное количество 10 г/л). После четырехдневного культивирования в экстракте-сырце обнаружено значение ν /л = 4470. В культуральном растворе после отделения также установлена значительная активность.

20 Применение изобретения позволяет существенно удешевить способ производства за счет достижения более высоких значений активности холестериноксидазы. При этом особое преимущество заключается в возможности исключения индуктора холестериноксидазы, что приводит не только к дополнительному удешевлению способа, но также к значительному повышению воспроизводимости способа.

Пример	Длительность культивирования, дни	Общее, ν /л	Экстракт-сырец, ν /л	Культуральный раствор после отделения, ν /л
2	3	4765	1260	3506
	4	5223	1423	3800
3	3	1656	721	935
	4	2052	711	1341

Редактор Н. Безродная Составитель И. Привалова Техред О. Неце Корректор В. Бутяга

Заказ 4591/51 Тираж 523 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ИПП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4