



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

№ 622282

(61) Дополнительное к авт. свид-ву --

(22) Заявлено 07.12.76 (21) 2427603/28-13

с присоединением заявки № --

(23) Приоритет --

(43) Опубликовано 23.12.81. Бюллетень № 47

(45) Дата опубликования описания 23.12.81.

(51) М. Кл.³
С 12 D 13/10

(53) УДК 663.13
(088.8)

(72) Авторы В. Ю. Авиженис, П. К. Томкявичюс, В. Д. Паюодис,
изобретения П. Д. Валанчюс, Т. Ю. Падегимас, А.-С. А. Глемжа
и В. И. Лауцюс

(71) Заявитель Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной энзимологии

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА *N*-АЦЕТИЛ-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗЫ

1

Изобретение относится к микробиологической промышленности и может быть использовано для получения разной степени очистки ферментов *N*-ацетил-глюкозаминидазы на основе выращивания бактерий *Bacillus subtilis* G — 19.

Известны способы получения ферментного препарата *N*-ацетил-глюкозаминидазы путем глубинного культивирования микроорганизмов, например *Streptomyces griseus*, АТСС № 27800, который выращивают трое суток на качалках в колбах емкостью 2 л, содержащих 1 л питательной среды, состоящей из раствора 1%-ной коллоидной суспензии хитина и минеральных солей. Эндо-β-*N*-ацетил-глюкозаминидазы выделяют из культуральной жидкости путем отделения биомассы через бумажный фильтр с последующим многостадийным осаждением ее из фильтра солями цинка и сернокислого аммония и очисткой на хроматографических колоннах с целлюлозой [1].

Наиболее близким по технической сущности является способ получения препарата *N*-ацетил-глюкозаминидазы путем культивирования бактерий *Bacillus subtilis* глубинным способом в ферментере емкостью 40 л, наполненном 20 л питательной среды. В качестве источника углерода используют

2

1 г/л глюкозы, 5 г/л азота-бактопелтон и (K_2HPO_4), минеральной соли: K_2HPO_4 — 0,4 г/л, $MgSO_4 \cdot H_2O$ — 0,05 г/л, $NaCl$ — 0,1 г/л, $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,017 г/л, 5 $(NH_4)_2HPO_4$ — 0,5 г/л. Ферментацию проводят при 37°C с постоянной подачей стерильного воздуха со скоростью 20 л/мин. Продолжительность ферментации 20 ч. Бактерии выделяют *N*-ацетил-глюкозаминидазу в культуральную жидкость, в основном в виде нерастворимой формы, адсорбированной на клетках бактерий. После ферментации фермент и клетки бактерий собирают центрифугированием. *N*-ацетил-глюкозаминидазу экстрагируют из осадка 0,1М трис-буфером (рН — 8,0), содержащим 3—4 М $NaCl$. Потери на данной стадии составляют 62,5%. Далее фермент очищают при помощи ультрафильтрации, гель-фильтрации и ионной хроматографии [2].

Однако существующий способ получения *N*-ацетил-глюкозаминидазы является неперспективным потому, что для биосинтеза фермента требуются дорогостоящие и дефицитные органические источники питательной среды. Фермент выделяется в культуральную жидкость в виде нерастворимой формы. Для его экстракции необходимы дополнительные технологические операции, 30 причем потери на данной стадии слишком

велики. Процесс ферментации сравнительно продолжителен.

Цель изобретения — получение препарата *N*-ацетил-глюкозаминидазы с повышенным выходом и его удешевлением.

Цель достигается тем, что в качестве продуцента бактерий из вида *Bacillus subtilis* используют штамм *Bacillus subtilis* G-19, при этом культивирование осуществляют в течение 13—15 ч, а в качестве источника углерода и азота используют осахаренный крахмал, кукурузный экстракт и пивные дрожжи.

Штамм характеризуется следующими морфологическими и культурально-физиологическими признаками.

Морфологические признаки. Клетки имеют форму палочек размерами 1,7—3,3 мк на 0,5—0,6 мк. Палочки располагаются цепочками. Палочки подвижные с помощью перетриховых жгутиков, грамположительны. Культура образует споры размером 1,0—1,5 мк на 0,7—0,9 мк, форма спор эллипсоидальная, реже цилиндрическая. Прорастают споры экваториально, путем разрыва мембраны вдоль экватора.

Культуральные признаки. На мясо-пептонном агаре после 24-часовой инкубации в термостате культура образует колонии диаметром 2—6 мм. Колонии сероватые, желтоватые, непрозрачные, иногда края гладкие, складчатые в центральной части поверхности.

Иногда культура твердо врастает в агар. На ломтиках картофеля после 48 ч роста образует пленку бело-желтого цвета.

Пленка сморщена и окружена выступами, быстро образует субконечные споры, иногда центральные не деформирующиеся. Пленка сухая в начале роста, становится далее вязкой. На поверхности мясо-пептонного бульона культура образует сморщивающуюся пленку бело-желтоватого цвета, мясо-пептонный бульон остается при этом прозрачным.

Физиологические признаки. Оптимальная температура роста 35—37°C при pH 6,2—6,6. Дыхание строго аэробное. Усваивает глюкозу, сахарозу и фруктозу с образованием кислоты без выделения газа. Не усваивает лактозу, мальтозу, ксилозу, арабинозу, рамнозу, сорбит, маннит, дульцит и инозит. Гидролизует крахмал, разжижает желатину, пептонизирует молоко с образованием сгустка. Растет в среде с цитратами. Нитраты восстанавливает до нитритов. На среде Кларка образует ацетилметилкарбинол.

Для выращивания бактерий *Bacillus subtilis* G-19 готовят питательную среду следующего состава, %: осахаренный крахмал 6,5; кукурузный экстракт 2,7; сухие пивные дрожжи 0,12; двухзамещенный фосфат аммония 0,5; калий сернокислый 0,33;

магний сернокислый 0,016; марганец сернокислый 0,1; кальций хлористый 0,013. Компоненты питательной среды для стерилизации разделяются на три группы и стерилизуются отдельно. Питательную среду засеивают посевным материалом *Bacillus subtilis* G-19, при 45°C и pH — 6,6. В начале ферментации pH снижается до 6,2, после чего автоматически поддерживается pH при подаче 20%-ной аммиачной воды в пределах 6,4—6,6. Продолжительность ферментации 13—15 ч. Активность *N*-ацетил-глюкозаминидазы определяется по вискозиметрическому методу.

Испытание изобретения проведено в лабораторных и полупроизводственных условиях.

Культивирование проводят глубинным способом в ферментере емкостью 1500 л, при коэффициенте заполнения 50%, т. е. в 750 л питательной среды. В ферментер передают 100 л осахаренного крахмала с 40—45 Б°; 225 л раствора солей содержащего K_2SO_4 2,48 кг; $MgSO_4$ 0,127 кг; $MnSO_4$ 0,75 кг; $NaCl$ 0,248 кг; $CaCl_2$ 0,1 кг. Раствор стерилизуют 30 мин при 130°C.

Для приготовления раствора азотистых веществ в чан заливают 220 л воды и добавляют 20 кг 50%-ного кукурузного экстракта, 0,9 кг сухих пивных дрожжей, 3 л подсолнечного масла. Раствор передают в сателит и стерилизуют 45 мин при 130°C. В другом сателите стерилизуют раствор двухзамещенного фосфата (55 л воды и 3,75 кг $(NH_4)_2HPO_4$) при 130°C в течение 30 мин.

После стерилизации компоненты охлаждают до 45°C и передают в ферментер, доводят pH среды аммиачной водой до 6,6. После того засеивают посевным материалом *Bacillus subtilis* G-19, затем включают мешалку и подают стерильный воздух со скоростью 0,4 м³/мин.

Спустя 4—6 ч температура среды понижается до 37°C и далее поддерживается постоянной во время ферментации pH среды в начале ферментации понижается до 6,2, после чего автоматически поддерживается в пределах 6,4—6,6.

Биосинтез *N*-ацетил-глюкозаминидазы начинается с 8 ч ферментации, а особенно интенсивно идет в конце ферментации. Активность *N*-ацетил-глюкозаминидазы в конце ферментации достигает 24 ед/мл.

При производстве ферментного препарата *N*-ацетил-глюкозаминидазы в объеме 55 т в год в системе Главмикробиопрома годовой экономический эффект составляет 109,5 тыс. руб.

Формула изобретения

Способ получения ферментного препарата *N*-ацетил-глюкозаминидазы путем культивирования продуцирующих его бактерий

вида *Bacillus subtilis* на питательной среде, содержащей источники углерода, азота, минеральные соли с последующим выделением фермента из культуральной жидкости, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода фермента и его удешевления, в качестве продуцента из вида *Bacillus subtilis* используют штамм *Bacillus subtilis* G-19, при этом культивирование осуществляют в течение 13—15 час, а в качестве

источника углерода и азота используют осахаренный крахмал, кукурузный экстракт и пивные дрожжи.

5

Источники информации,

принятые во внимание при экспертизе

1. Tarentino A. L. и Macly F. *Journal Biolog chemical*, 1974, 249, 3 p. 811—817.2. Ortiz I. M. и др. «*Biochem Biolhyc Asta*», 1972, 289 p. 174—186.

Редактор Т. Кузнецова Техред Л. Куклина Корректор Е. Хмелева

Заказ 8758

Изд. № 605

Тираж 530.

Подписное

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

Загорская типография Упрполиграфиздата Мособлсполкома