



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006123547/13, 04.07.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.07.2006

(45) Опубликовано: 20.01.2008 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2208633 C1, 20.07.2003. SU 1440022
A1, 30.01.1988. RU 2070921 C1, 27.12.1996.
ГРАЧЕВА И.М., КРИВОВА А.Ю. Технология
ферментных препаратов. - М.: ЭЛЕВАР, 2000,
с.381, 382.

Адрес для переписки:

111033, Москва, ул. Самокатная, 4Б, ГНУ ВНИИ
пищевой биотехнологии РАСХН, Л.В. Римаревой

(72) Автор(ы):

Римарева Любовь Вячеславовна (RU),
Оверченко Марина Борисовна (RU),
Морозова Кира Анатольевна (RU),
Синицын Аркадий Пантелеймонович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт пищевой биотехнологии Российской
академии сельскохозяйственных наук (RU)(54) ШТАММ ГРИБА ASPERGILLUS ORYZAE - ПРОДУЦЕНТ КИСЛЫХ И СЛАБОКИСЛЫХ
ПРОТЕАЗ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к созданию нового штамма, используемого для получения фермента - комплекса кислых и слабокислых протеаз. Штамм получен селекцией из известного штамма *Aspergillus oryzae* 387 (ВКПМ F-683) путем многоступенчатой селекции с использованием эффективных методов мутагенеза. Штамм хранится в виде лиофильно высушенной культуры и на косяках с суслон-агаром в отделе

биотехнологии ферментных препаратов в пищевой промышленности государственного научного учреждения ВНИИ пищевой биотехнологии г. Москвы. Изобретение обеспечивает получение штамма, обладающего высоким уровнем синтеза кислых и слабокислых протеаз с высокой общей активностью в культуральной жидкости, превышающей аналог в 2,0-2,6 раза, при сокращении длительности процесса культивирования. 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)**C12N 9/62** (2006.01)**C12R 1/69** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006123547/13, 04.07.2006**(24) Effective date for property rights: **04.07.2006**(45) Date of publication: **20.01.2008 Bull. 2**

Mail address:

**111033, Moskva, ul. Samokatnaja, 4B, GNU VNII
pishchevoj biotekhnologii RASKhN, L.V. Rimarevoj**

(72) Inventor(s):

**Rimareva Ljubov' Vjacheslavovna (RU),
Overchenko Marina Borisovna (RU),
Morozova Kira Anatol'evna (RU),
Sinitsyn Arkadij Pantelejmonovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie
Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij
institut pishchevoj biotekhnologii Rossijskoj
akademii sel'skokhozjajstvennykh nauk (RU)**

**(54) FUNGUS STRAIN ASPERGILLUS ORYZAE AS PRODUCER OF ACID AND SUBACID
PROTEASES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, microbiology, biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to development of a novel strain used for preparing enzyme representing a complex of acid subacid proteases. Strain is prepared by selection from the known strain *Aspergillus oryzae* (VKPM F-683) by multistep selection using effective methods of mutagenesis. Strain is stored as lyophilic dried culture and on slants with wort-agar in the biotechnology section of enzyme preparations in

the food processing department of the State Scientific Institute VNII of food processing technology in Moscow. Invention provides preparing the strain possessing the high level of synthesis of acid and subacid proteases and high total activity of enzyme in cultural fluid exceeding activity of analogue by 2.0-2.6-fold and in reducing culturing process time.

EFFECT: improved and valuable properties of strain.

2 tbl, 5 ex

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к созданию нового штамма *Aspergillus oryzae* 107 - продуцента кислых протеаз с высокой общей и удельной активностью в культуральной жидкости. Штамм получен селекцией из известного штамма *Aspergillus oryzae* 387 (ВКПМ F-683) путем многоступенчатой селекции с использованием эффективных методов мутагенеза. Изобретение обеспечивает высокий уровень синтеза кислых протеаз при сокращении длительности культивирования.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к созданию нового штамма, используемого для получения фермента, - комплекса кислых и слабокислых протеаз.

Протеолитические ферменты широко применяются в различных отраслях

промышленности: спиртовой, мясомолочной, пивоваренной, винодельческой, сельскохозяйственной и других. Это обусловлено тем, что перерабатываемое сельскохозяйственное сырье содержит высокомолекулярные белковые полимеры.

Наиболее характерное практическое применение комплексных препаратов кислых и слабокислых протеаз связано с интенсификацией биотехнологических процессов в

бродильных отраслях при производстве спирта, пива, мясомолочной промышленности, сыроделии и т.д. Кислые протеазы применяются также для протеолиза микробного белка с целью получения биологически активных пищевых и кормовых добавок. Протеолитические ферменты получают как продукт биосинтетической деятельности грибов или бактерий (1, 2). Однако использование грибов более предпочтительно, чем бактерий, так как они синтезируют сложный комплекс протеаз, в состав которого входят активные пептидазы и протеиназы, осуществляющие более эффективный катализ белковых полимеров в кислой зоне pH. В связи с этим селекция новых грибных штаммов для получения кислых протеаз актуальна.

Известны штаммы - продуценты грибных протеаз из рода *Aspergillus oryzae* 251-90, 824-32 (3, 4), при глубинном культивировании которых синтезируются кислые и слабокислые протеазы. Недостатком этих продуцентов является их низкая продуктивность, сложный состав питательных сред, а также длительный период роста продуцентов.

Наиболее близким к заявляемому объекту является штамм *Aspergillus oryzae* 387, регистрационный номер ВКПМ F-683 (2), один из наиболее активных продуцентов протеаз. В глубинной культуре известного штамма *Asp. Oryzae* 387 на 42 часа роста протеолитическая активность достигает 11,5 ед. ПС/см³ в зависимости от состава питательной среды.

Недостатком этого штамма является низкий уровень протеолитической активности культуральной жидкости (к.ж.), особенно в кислой области pH (2,5-4,0).

Задачей, поставленной настоящим изобретением, является получение штамма гриба *Aspergillus oryzae*, обладающего высокой способностью к образованию комплекса протеаз, проявляющих максимальную активность в кислой и слабокислой зоне pH.

Технический результат, получаемый от использования нового штамма *Aspergillus oryzae* 107, заключается в получении кислых и слабокислых протеаз с высокой общей активностью в культуральной жидкости, превышающей аналог в 2,0-2,6 раза, при сокращении длительности процесса культивирования.

Задача решается созданием нового штамма путем селекции и мутагенеза из известного штамма *Aspergillus oryzae* 387 (5), способного к быстрому росту на простых по составу питательных средах.

Заявляемый штамм *Aspergillus oryzae* 107 получен путем многоступенчатой селекции с использованием эффективных методов мутагенеза, депонирован в ВКПМ под №F-929.

В результате мутагенеза после неоднократного отбора и рассева вариантов был получен штамм *Aspergillus oryzae* 107 - продуцент кислых и слабокислых протеаз, обладающий высокой скоростью роста и продуктивностью комплекса кислых и слабокислых протеаз.

Изучали уровни продукции кислых и слабокислых протеаз в культуральной жидкости, полученной путем выращивания заявляемого штамма и известных штаммов в жидкой питательной среде с аэрацией и перемешиванием. Общую протеолитическую активность

определяли модифицированным методом Ансона с использованием в качестве субстрата бычьего гемоглобина при различных значениях pH и оптимальной температуре действия протеаз. Сравнительные показатели уровней протеолитической активности культуральной жидкости штамма *Asp.oryzae* 107 с прототипами представлены в табл.1.

5 Таким образом, в результате селекции и мутагенеза получен новый штамм *Aspergillus oryzae* 107, обладающий высоким уровнем синтеза протеаз и сокращенной длительностью процесса культивирования, что позволяет повысить технологичность процесса получения ферментов кислых и слабокислых протеаз при использовании штамма *Aspergillus oryzae* 107. Штамм отличается от известного и по культурально-морфологическим признакам.

10 Штамм хранится в виде лиофильно высушенной культуры и на косяках с суслон-агаром, в отделе биотехнологии ферментных препаратов в пищевой промышленности государственного научного учреждения ВНИИ пищевой биотехнологии г. Москвы.

Штамм *Aspergillus oryzae* 107 характеризуется следующими свойствами.

15 Культуральные признаки. Через 6 суток роста на сусле-агаре образуются колонии диаметром 50-53 мм, поверхность колонии шероховатая с концентрическими окружностями, профиль колонии плоский, форма колонии неправильная, края волнистые, цвет - зеленый, края светло-желтые, с возрастом цвет колонии темнеет. Цвет с обратной стороны - серый.

20 При росте на агаризованной среде Чапека размер колонии через 6 суток 30-32 мм, цвет колонии коричнево-зеленый, форма колоний округлая, края ровные.

На всех средах наблюдается обильное спорообразование, пигменты в среду не выделяются, эксудата нет, слабый запах плесени.

25 Морфология штамма. Мицелий гриба септированный, разветвленный, со вздутиями, конидии формируются экзогенно; поверхность конидий гладкая, форма, в основном, округлая; толщина гиф 4-6 мкм.

Физиолого-биохимическая характеристика. Тип катаболизма - дыхание. Отношение к кислороду - аэроб. Оптимальная температура роста 30-32°C, максимальная - 50°C, минимальная - 18°C. Оптимальное значение pH среды для роста гриба и биосинтеза ферментов 5,4; рост продуцента имеет место в зоне pH от 2,5 до 10,0.

30 В качестве источника углерода гриб использует крахмал, глюкозу, сахарозу, ксилозу, мальтозу, маннит, глицерин, галактозу. Продуцент ассимилирует нитраты, аммонийный и аминный азот, белки.

Штамм непатогенный.

35 Штамм *Aspergillus oryzae* 107 использовали для получения кислых и слабокислых протеаз.

Изобретение характеризуется следующими примерами.

40 Пример 1. Штамм *Aspergillus oryzae* 107 культивируют на питательной среде следующего состава, %: ячменная мука - 3,0; пшеничные отруби - 3,0; K_2HPO_4 - 1,5; остальное - водопроводная вода, pH - естественный. Ферментационную питательную среду засевают вегетативным посевным материалом в количестве 4%, выращенным при 30°C в течение 18 часов. Культивирование гриба осуществляют в колбах Эрленмейера объемом 750 см³, содержащих 50 см³, на круговой качалке (220-240 об/мин) при температуре 30-32°C в течение 38 часов. Активность внеклеточных протеаз составляет: при pH 2,5 - 3,6 ед. ПС/см³; при pH 4,0 - 12,6 ед. ПС/см³; при pH 4,5 - 18,0 ед. ПС/см³; при pH 5,5 - 18,5 ед. ПС/см³.

50 Пример №2. Штамм *Aspergillus oryzae* 107 культивируют на питательной среде следующего состава, %: ячменная мука - 3,0; пшеничные отруби - 3,0; K_2HPO_4 - 1,5; остальное - водопроводная вода, pH - естественный. Ферментационную питательную среду засевают вегетативным посевным материалом в количестве 4%, выращенным при 30°C в течение 18 часов. Культивирование гриба осуществляют в колбах Эрленмейера объемом 750 см³, содержащих 50 см³, на круговой качалке (220-240 об/мин) при температуре 28°C в течение 40 часов. Активность внеклеточных протеаз составляет 19,9 ед. ПС/см³.

Пример №3. Штамм *Aspergillus oryzae* 107 культивируют на питательной среде следующего состава, %: ячменная мука - 3,0; пшеничные отруби - 3,0; K_2HPO_4 - 1,5; остальное - водопроводная вода, pH - естественный. Ферментационную питательную среду засевают вегетативным посевным материалом в количестве 4%, выращенным при 30°C в течение 18 часов. Культивирование гриба осуществляют в колбах Эрленмейера объемом 750 см³, содержащих 50 см³, на круговой качалке (220-240 об/мин) при температуре 30°C в течение 40 часов. Активность внеклеточных протеаз составляет 20,8 ед. ПС/см³.

Пример №4. Штамм *Aspergillus oryzae* 107 культивируют на питательной среде следующего состава, %: ячменная мука - 3,0; пшеничные отруби - 3,0; K_2HPO_4 - 1,5; остальное - водопроводная вода, pH - естественный. Ферментационную питательную среду засевают вегетативным посевным материалом в количестве 4%, выращенным при 30°C в течение 18 часов. Культивирование гриба осуществляют в колбах Эрленмейера объемом 750 см³, содержащих 50 см³, на круговой качалке (220-240 об/мин) при температуре 32°C в течение 40 часов. Активность внеклеточных протеаз составляет 21,5 ед. ПС/см³.

Пример №5. Штамм *Aspergillus oryzae* 107 культивируют на питательной среде следующего состава, %: ячменная мука - 3,0; пшеничные отруби - 3,0; K_2HPO_4 - 1,5; остальное - водопроводная вода, pH - естественный. Ферментационную питательную среду засевают вегетативным посевным материалом в количестве 4%, выращенным при 30°C в течение 18 часов. Культивирование гриба осуществляют в колбах Эрленмейера объемом 750 см³, содержащих 50 см³, на круговой качалке (220-240 об/мин) при температуре 34°C в течение 40 часов. Активность внеклеточных протеаз составляет 20,5 ед. ПС/см³.

Штамм	Длительность культивирования, ч	Протеолитическая активность, ед. ПС/см ³			
		pH 2,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,5
251-90	72	0,6	3,9	5,7	5,9
387	42	2,0	6,9	11,0	11,5
107	38	4,1	18,0	23,0	22,5

Штамм	Длительность роста, ч	Протеолитическая активность, ед. ПС/см ³				
		28°C	30°C	32°C	34°C	36°C
387	40	8,9	10,1	8,5	6,0	4,2
	48	10,5	11,9	9,2	5,3	3,1
107	40	19,9	20,8	24,8	20,5	17,5
	48	21,0	21,3	23,9	19,5	12,0

Источники литературы

1. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. - М.: Изд. "Элеватор". 2000.
2. Патент РФ 2208633, кл. 12 N 1/20, 2001.
3. Зуева Р.В. Физиолого-биохимические исследования экспериментально полученного мутанта *Aspergillus oryzae* - активного продуцента кислой протеиназы. Автореферат канд. диссертации. - М.: 1971.
4. А.с. СССР №1440922, кл. C12N 1/14, 1988.
5. Патент РФ 2070921, кл. 12 N 1/14, 1993.

Формула изобретения

Штамм гриба *Aspergillus oryzae* 107, ВКПМ F-929 - продуцент кислых и слабокислых протеаз.