

**Патент Соединенных Штатов****Ферментообразующий штамм бактерий *Bacillus*****РЕЗЮМЕ**

Данное изобретение представляет недавно открытый, новый штамм бактерий *Bacillus*, который вырабатывает ферменты *липазы* для расщепления жирных веществ, таких как жир, сало, кулинарные масла, ферменты *протеазы* для расщепления протеинов и ферменты *амилазы* для расщепления крахмала. Существует ряд возможностей применения нового штамма и вырабатываемых им ферментов, среди прочего очистка сточных вод, сельскохозяйственные нужды, производство стиральных порошков, средств для мытья посуды, очистителей сточных труб и пятновыводителей.

**10 пунктов, 4 страницы со схемами/чертежами**

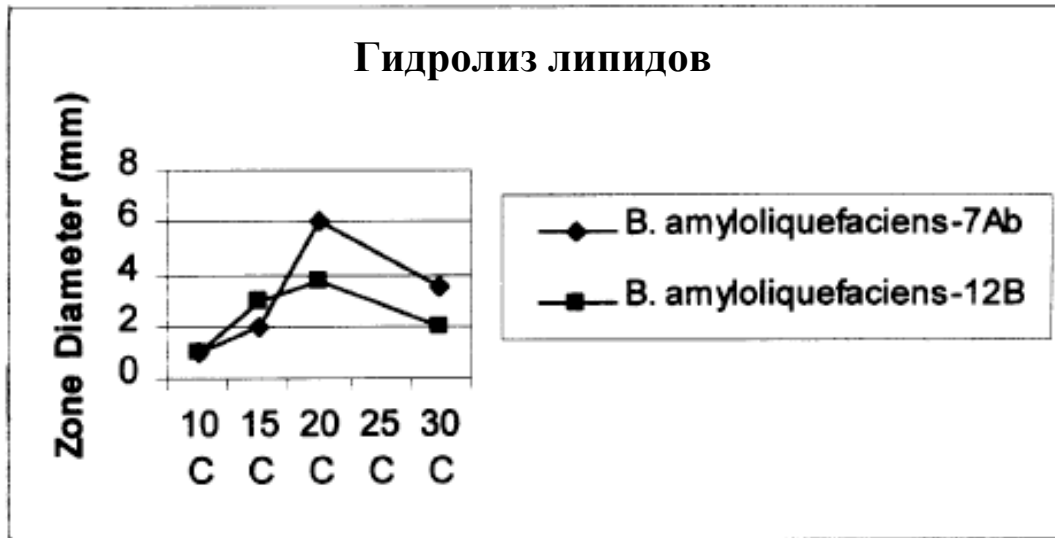
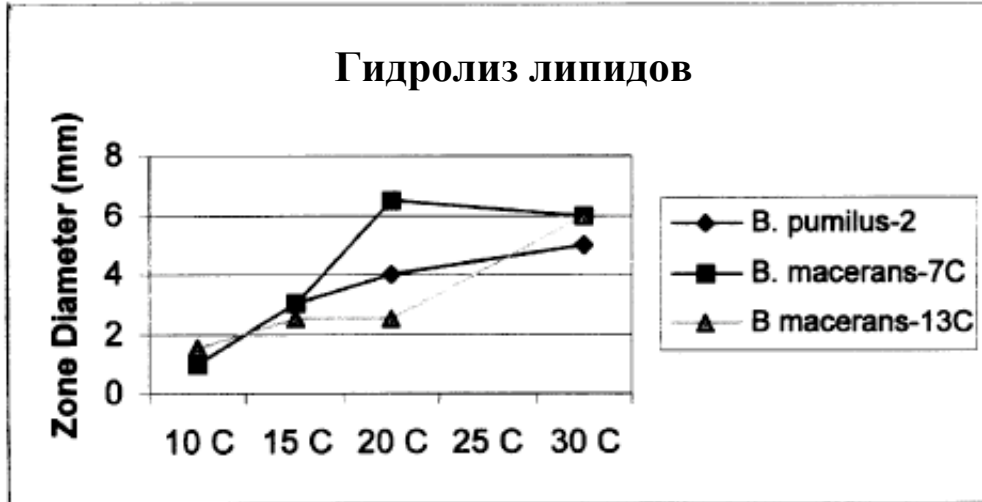


РИСУНОК 1



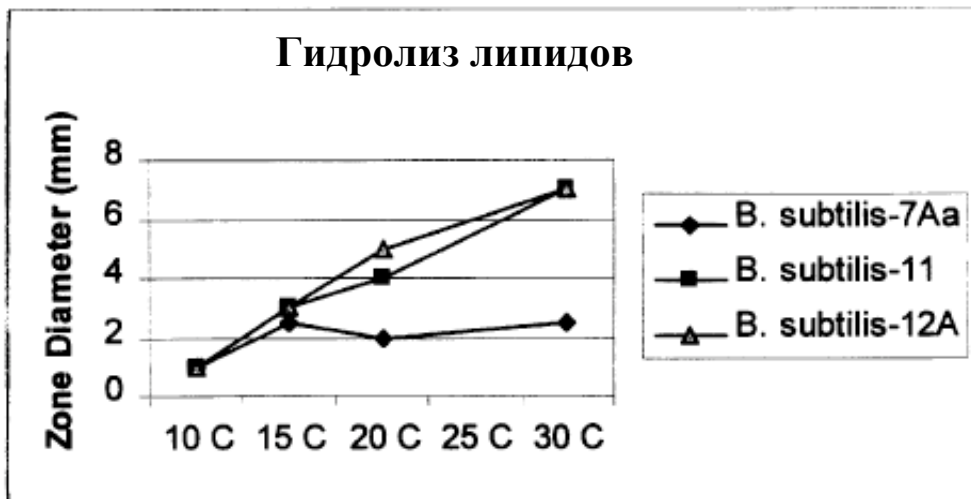
## РИСУНОК 2

Патент США

23.01.2001

Стр. 3 из 4

US 6177012B1



## РИСУНОК 3

ID: 25750		ROE RLM-013C		DATE OF RUN: 17-FEB-98 15:35:43																			
BOTTLE: 7		SAMPLE [AEROBE]																					
RT	AREA	ARHT	RESPON	ECL	NAME	%	COMMENT 1	COMMENT 2															
1.986	417172224	0.038	..	6.988	SOLVENT PEAK	..	< MIN RT																
7.750	1696	0.052	0.970	13.999	14:0	1.59	ECL DEVIATES -0.001	REFERENCE -0.009															
8.715	36488	0.049	0.966	14.622	15:0 ISO	33.96	ECL DEVIATES 0.001	REFERENCE -0.005															
8.855	36744	0.050	0.966	14.713	15:0 ANTEISO	34.20	ECL DEVIATES 0.002	REFERENCE -0.005															
9.299	1024	0.052	0.965	14.999	15:0	0.95	ECL DEVIATES -0.001	REFERENCE -0.007															
10.565	5104	0.055	0.965	15.758	16:1 W11C	4.75	ECL DEVIATES 0.001																
10.966	7664	0.055	0.966	15.998	16:0	7.13	ECL DEVIATES -0.002	REFERENCE -0.009															
11.644	3408	0.058	0.967	16.389	ISO 17:1 W10C	3.18	ECL DEVIATES 0.002																
11.800	1120	0.057	0.968	16.479	SUM IN FEATURE 5	1.04	ECL DEVIATES 0.003	17:1 ISO WANTEI B															
12.060	8520	0.056	0.968	16.630	17:0 ISO	7.95	ECL DEVIATES 0.001	REFERENCE -0.006															
12.221	5608	0.059	0.969	16.723	17:0 ANTEISO	5.24	ECL DEVIATES 0.001	REFERENCE -0.006															
.....	1120	..	..	..	SUMMED FEATURE 5	1.04	17:1 ISO WANTEI B	17:1 ANTEISO BII															
SOLVENT AR	TOTAL AREA	NAMED AREA	% NAMED	TOTAL AMNT	NBR REF	ECL DEVIATION	REF ECL	SHIFT															
417172224	107376	107376	100.00	103779	7	0.002		0.007															
TSBA (REV 3.90): PAENIBACILLUS					0.415	(BACILLUS)																	
P. MACERANS					0.415	(BACILLUS)																	
P. M. GC SUBGROUP A					0.415	(BACILLUS)																	
BACILLUS					0.372																		
B. SUBTILIS*					0.372																		
B. AMYLOLIQUEFACIENS					0.367	(BACILLUS SUBTILIS GROUP)																	
B. PUMILUS					0.234	(OTHER THAN TYPE STRAIN)																	
B. P. GC SUBGROUP B*					0.234	(OTHER THAN TYPE STRAIN)																	
B. P. GC SUBGROUP A					0.206	(SIMILAR TO TYPE STRAIN)																	
COMPARISON WITH TSBA (REV 3.90): PAENIBACILLUS-MACERANS-GC SUBGROUP A (BACILLUS) DISTANCE: 4.711																							
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100		
13:0 ISO	x+																						
14:0	-x-																						
15:0 ISO																							
15:0 ANTEISO																							
15:0	+x-																						
16:0 ISO	x+																						
16:1 W11C	-x+																						
16:0		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ISO 17: W10C	+x-																						
17:0 ISO		-x-																					
17:0 ANTEISO		-x+																					
SUMMED FEATURE 5	x+																						

РИСУНОК 4

1  
**ФЕРМЕНТООБРАЗУЮЩИЙ ШТАММ БАКТЕРИЙ**  
**BACILLUS**

СФЕРА ОТКРЫТИЯ

Настоящее изобретение состоит из открытого в недавнем времени, нового штамма бактерий *Bacillus*, которые продуцируют ферменты многостороннего использования. Существует ряд возможностей применения нового штамма и производимых им ферментов, среди прочего очистка сточных вод, сельскохозяйственные нужды, производство стиральных порошков, средств для мытья посуды, очистителей сточных труб и пятновыводителей. В частности, штамм *Bacillus*, представленный в настоящем открытии, вырабатывает ферменты *липазы* для расщепления жирных веществ, таких как жир, сало, кулинарные масла, а также ферменты *протеазы* для расщепления протеинов и ферменты *амилазы* для расщепления крахмала.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Использование биостимуляции, т.е. добавление инородных бактерий в сточные воды для обеспечения полной очистки воды, становится все более необходимым, так как срок службы и возрастающая нагрузка муниципальных очистительных установок требуют усовершенствований. Биостимуляция, которую также называют бактериальной стимуляцией, может использоваться в разных областях. Например, бактериальная стимуляция может улучшать качество и эффективность очистки муниципальных сточных вод, пищевых стоков, сточных вод в жилых районах, особенно в системах утилизации на месте, таких как отстойники и сточные колодцы, а также предварительной очистки сточных вод, содержащих большое количество жирных веществ, и обработки трубопроводов, фильтров, водопроводно-канализационных систем зданий и жируловителей.

Ферментообразующие бактерии также могут использоваться в сельском хозяйстве в качестве силосной затравки для повышения продуктивности домашнего скота, потребляющего обработанный силос. Определенные бактерии, называемые микробами прямого потребления, также могут быть добавкой к животным кормам для стимуляции пищеварения. По заявлению Ассоциации Американских служб контроля качества продуктов питания (AAFCO), в недавнее время Администрация по контролю за продуктами питания и лекарствами обнаружила, что *Bacillus subtilis* и *Bacillus pumilus* являются небезопасными при использовании в продуктах с содержанием микробов прямого потребления (Официальное издание AAFCO, 1999, стр. 221). Кроме того, передовые исследования в области биоинженерии продемонстрировали, что генетические характеристики одного биологического вида, включая бактерии, можно внедрить в ДНК другого биологического вида. Основным примером является включение гена, отвечающего за выработку инсектицидных протеинов из *Bacillus thuringiensis* в семена кукурузы. Полученная кукурузная культура способна вырабатывать протеин, который уничтожает насекомых-вредителей, таких как кукурузный листоед, тем самым обеспечивая рост более здоровых кукурузных культур и повышая урожайность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Объектом настоящего изобретения является получение нового штамма бактерий, продуцирующих особые виды полезных ферментов.

Последующим объектом настоящего изобретения является получение нового штамма бактерий, вырабатывающих ферменты *липазы* для расщепления жира, *протеазы* для расщепления протеинов и *амилазы* для расщепления крахмала.

Дополнительным объектом изобретения является разработка нового штамма много-ферментных бактерий, которые могут применяться в очистке сточных вод для стимуляции расщепления органических компонентов, и как следствие для повышения качества и эффективности очистки воды.

2

Дальнейшим объектом изобретения является получение штамма много-ферментных бактерий, используемых в сельском хозяйстве как микробы прямого потребления в составе кормов для домашнего скота, в качестве затравки силоса и для обработки навоза.

К объектам изобретения относится также разработка новых бактерий и /или производимых данными бактериями ферментов, которые могут использоваться в качестве моющих средств, а также получение ферментов, применяющихся в производстве пятновыводителей или продуктов питания.

Настоящее изобретение представляет новый штамм бактерий *Bacillus*, вырабатывающий *липазу* для расщепления жиров, *протеазу* для расщепления протеинов и *амилазу* для расщепления крахмала. Новый штамм, представленный и заявленный в настоящем изобретении, является одним из восьми новых штаммов, полученных авторами данного изобретения. Для полноты описания приведена спецификация всех восьми штаммов, однако в данном документе заявлен только один *Bacillus* штамм, обозначенный ATCC 202135. Восемь новых штаммов бактерии *Bacillus* 05.06.1998 были внесены в Американскую коллекцию типовых культур ("ATCC"), 10801 Юниверсити бульвар, г. Манассас, Вирджиния, 20110-2209, США, и согласно Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры были обозначены следующим образом:

Биологический вид	Штамм	№ ATCC
<i>Bacillus pumilus</i>	RLM-002	ATCC 202136
<i>Bacillus subtilis</i>	RLM-007Aa	ATCC 202138
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	RLM-007Ab	ATCC 202134
<i>Bacillus macerans</i>	RLM-007C	ATCC 202132
<i>Bacillus subtilis</i>	RLM-011	ATCC 202137
<i>Bacillus subtilis</i>	RLM-012A	ATCC 202139
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	RLM-012B	ATCC 202133
<i>Bacillus macerans</i>	RLM-013C	ATCC 202135

Биологические виды бактериальных штаммов *Bacillus* были определены методом анализа эфира жирной кислоты и метила (FAME), проведенном в Микрочек Инк., Норфилд, Вермонт, с использованием Триптического Соевого Агара (TSBA) версия 3.9 при 28.0 С базы данных компании Микрочек. Штамм RLM-013C, обозначенный ATCC 202135, с помощью анализа FAME был определен как генетический код подгруппы А *Penibacillus macerans*, который также иногда называют *Bacillus macerans*.

Существует целый ряд возможностей потенциального применения восьми новых штаммов *Bacillus*, включающих очистку сточных вод (муниципальных, пищевых, стоков в жилых районах); предварительную очистку сточных вод с высоким содержанием жирных веществ; очистку систем утилизации на месте, таких как отстойники и сточные колодцы; сельскохозяйственные нужды, а именно при обработке навоза или в качестве микробов прямого потребления в добавках к кормам для стимулирования пищеварения; а также очистку трубопроводов, фильтров, водопроводно-канализационных систем зданий и жируловителей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

**РИС. 1** изображает образование бактерией *Bacillus amyloliquefaciens* (штаммы RLM-007, ATCC 202134 и RLM-012, ATCC 202133) ферментов липазы в разных точках температурного диапазона.

**РИС. 2** изображает образование бактерией *Bacillus macerans* (штаммы RLM-013C, ATCC 202135 и RLM-007, ATCC 202132) и бактерией *Bacillus pumilus* (RLM-002, ATCC 202136) ферментов липазы в разных точках температурного диапазона.

**РИС. 3** изображает образование бактерией *Bacillus subtilis* (RLM-011, ATCC 202137, RLM-012, ATCC 202139 и RLM-007Aa, ATCC 202138) ферментов липазы в разных точках температурного диапазона.

3

РИС. 4 представляет данные, полученные методом анализа эфира жирной кислоты и метила (FAME), проведенном в Микрочек Инк., Норфилд, Вермонт, с использованием TSBA при 28.0 C версия 3.9 базы данных компании Микрочек, для определения вида *Bacillus macerans* ATCC 202135.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Восемь открытых в недавнем времени штаммов бактерии *Bacillus* были выделены из почвы с использованием стандартных микробиологических методов. Данные штаммы были получены методом из руководства Берджи Систематическая бактериология, Т.2, стр. 1104-1139. Процедура была выбрана для рода *Bacillus*, так как данный род способен выдерживать процесс пастеризации путем выработки спор, которые устойчивы к температурам процесса пастеризации. В ходе процедуры ок. 1 грамма почвы из района г. Сиэтла, Вашингтон, был добавлен к 300 мл триптической соевой питательной среды (Difco). Данная смесь был пастеризован нагреванием до 70 C в течение 10 мин. Колба была помещена в инкубатор при температуре 30 C. Культуру помещали в плашки с триптическим соевым агаром (TSA) в начале инкубационного периода – спустя 24 часа с начала инкубации, и в конце инкубационного периода – спустя 48 часов. Данные плашки подвергли аэробной инкубации при 30 C и исследовали на предмет роста бактерий. Колонии бактерий собирались и последовательно перемещались в плашки с TSA каждые 24-48 часов, пока не были выделены стабильные бактериальные колонии.

Таксономическая детерминация выполнялась на основе колониальной структуры, клеточной структуры, красителя Грама, биохимических тестов и анализа эфира жирной кислоты и метила (FAME), проведенном в Микрочек Инк., Норфилд, Вермонт, с использованием TSBA при 28.0 C версия 3.9 базы данных компании Микро чек.

Все восемь штаммов бактерии *Bacillus* настоящего изобретения являются грам-положительными палочкообразными бактериями, растущими в аэробных условиях. Как типично для данного рода, они производят споры, из которых развиваются вегетативно размножающиеся клетки.

Штаммы бактерий *Bacillus*, описанные в настоящем изобретении, представлены в табл.1. В таблице приведен Микробный номер лаборатории Roebic (RLM) и идентификация вида, который определен методом анализа FAME, проводимым в Микрочек Инк., Норфилд, Вермонт, с использованием TSBA при 28.0 C версия 3.9 базы данных компании Микро чек.

Таким образом, в правой колонке приведены индексы подобия / стандартные отклонения (SI/SD).

ТАБЛИЦА 1

Ссылка	Идентификация вида	SI/SD
RLM-002	<i>Bacillus pumilus</i>	0.628
RLM -007Aa	<i>Bacillus subtilis</i>	0.475
RLM-007Ab	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.608
RLM-007C	<i>Bacillus macerans</i>	0.729
RLM-011	<i>Bacillus subtilis</i>	0.519
RLM-012A	<i>Bacillus subtilis</i>	0.435
RLM-012B	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.593
RLM-013C	<i>Bacillus macerans</i>	0.415

Для более полного описания каждого штамма бактерий *Bacillus* были выполнены дополнительные биохимические тесты с демонстрацией возможности применения различных углеводов в качестве источников питания, и применения мочевины и цитрата в качестве источников усвояемого углерода. Результаты представлены в таблице 2.

4

ТАБЛИЦА 2  
Использование углеводов  
Штамм RLM-

	002	007Aa	007Ab	007C	011	012A	012B	013C
<b>Углеводы</b>								
Адонитол	-	-	-	-	-	-	-	-
Арабиноза	-	-	-	-	+	-	-	-
Дульцит	-	-	-	-	-	-	-	-
Глюкоза	-	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	-	-	-	-	-	-	-	-
Мальтоза	-	-	-	-	-	-	-	-
Маннитол	-	-	+	-	+	-	+	+
Сорбит	-	-	-	+	+	-	-	-
Сахароза	+	+	+	+	-	-	+	-
Ксилоза	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Источники углерода</b>								
Мочевина	-	+	+	+	+	+	+	+
Цитрат	-	-	-	+	+	-	+	+

Проведены тесты Becton Dickenson Enterotube II и Oxi/Ferm Tube II, 48 часов при температуре 34 C. Данные тесты были проведены в соответствии с инструкциями производителя, колонии инокулировались 24 часовым триптическим соевым агаром (TSA). Все восемь штаммов *Bacillus*, Кроме штамма RLM-002 (ATCC 202136) были способны преобразовать нитрат в нитрит, что может использоваться в очистке сточных вод, где наблюдается низкий уровень содержания кислорода и высокий уровень содержания нитратов. Это может применяться в системах очистки стоков на месте, таких как отстойники и сточные колодцы. Для дальнейшей идентификации особых свойств штаммов бактерий *Bacillus* с использованием триптической соевой питательной среды (Difco) (TSB) были проведены тесты, определяющие минимальную и максимальную температуру роста каждого штамма. В ходе опыта пробирки с TSB подвергались инкубации в течение 14 дней при указанных температурах. Результаты представлены в табл. 3.

ТАБЛИЦА 3  
ДИАПАЗОН ТЕМПЕРАТУР РОСТА

Штамм	10C	15C	40C	45C	50C
RLM-002 <i>B. pumilus</i> ATCC 202136	+	+	+	+	+
RLM -007Aa <i>B. subtilis</i> ATCC 202138	+	+	+	+	-
RLM-007Ab <i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 202134	-	+	+	+	-
RLM-007C <i>B. macerans</i> ATCC 202132	-	+	+	+	-
RLM-011 <i>B. subtilis</i> ATCC 202137	+	+	+	+	+
RLM-012A <i>B. subtilis</i> ATCC 202139	-	+	+	+	-
RLM-012B <i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 202133	-	+	+	+	-
RLM-013C <i>B. macerans</i> ATCC 202135	-	+	+	+	-

Способность всех восьми штаммов *Bacillus* расти при температуре 15 C позволяет широко применять их в сельском хозяйстве. Также два штамма *Bacillus subtilis* (RLM -007Aa и RLM-011) и *Bacillus pumilus* (RLM-002) были способны расти при температуре 10 C. Второй штамм, наряду с *Bacillus subtilis*, RLM-011 мог также расти при температуре 50 C. Два данных штамма показали самый широкий самый широкий температурный диапазон роста в группе из восьми штаммов.

5

Способность этих бактерий расти в таком широком диапазоне температур значительно увеличивает область их применения. Табл. 4 представляет полезные ферменты, вырабатываемые вышеуказанными восемью штаммами.

ТАБЛИЦА 4  
ПОЛЕЗНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Штамм	Протеаза			
	Амилаза	Липаза	Желатин	Казеин
RLM-002 <i>B. pumilus</i> ATCC 202136	-	+	+	+
RLM-007Aa <i>B. subtilis</i> ATCC 202138	+	+	+	+
RLM-007Ab <i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 202134	+	+	+	+
RLM-007C <i>B. macerans</i> ATCC 202132	-	+	+	-
RLM-011 <i>B. subtilis</i> ATCC 202137	+	+	+	+
RLM-012A <i>B. subtilis</i> ATCC 202139	+	+	+	+
RLM-012B <i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 202133	+	+	+	+
RLM-013C <i>B. macerans</i> ATCC 202135	+	+	+	+

#### ЭКСПЕРИМЕНТ 1

Свойство бактерий вырабатывать амилазу может быть широко использоваться во многих сфера, включая очистку сточных вод и производстве пищевых продуктов. Способность новых штаммов, описанных в настоящем изобретении, вырабатывать амилазу была определена использованием бактокрахмального агара (Difco). Были применен метод простых полосок, а также дисковый гидролиз. Бактокрахмальный агар состоит из бактомясного экстракта (3 г/л) и, растворимого крахмала (10 г/л) и бактоагара (12 г/л). Для подготовки плашек с агаром, бактокрахмальный агар (25 г/л) поместили в деионизированную воду, которая нагревалась до полного растворения крахмала. Водный раствор крахмала был стерилизован в течении 15 мин. при температуре 120 C, затем раствору дали остыть. Препарат поместили на плашки для затвердения и высыхания в течение ночи.

В опыте с полосками с помощью стерильной платиновой иглы были нанесены полосы чистого штамма на отдельные плашки крахмального агара. Затем плашки были инкубированы при 30 C. Через 24 часа плашки были залиты йодным раствором Грама. Процедура повторилась по истечении 48 часов. Положительный результат был зафиксирован благодаря появлению желтой зоны вокруг растущих бактерий. Если бы крахмал не подвергся гидролизу, агар бы имел темно-пурпурный цвет.

В опыте дискового гидролиза стерильные бумажные диски были помещены на плашки с сухим крахмальным агаром и пропитаны 24-часовой чистой культурой. Данные плашки были инкубированы в течение 24 часов и затем залиты йодовым раствором Грама. Эта процедура также повторялась спустя 48 часов с момента начала инкубации. Был зафиксирован положительный результат в виде желтой зоны вокруг диска.

Табл. 5 представляет результаты выработки амилазы штаммом бактерий в данном опыте.

6

ТАБЛИЦА 5  
РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТОВ ПО ВЫРАБОТКЕ АМИЛАЗЫ

Опыт с полосками после 48 часов		Опыт с дисковым гидролизом 48 часов		Зона (мм)*
Штамм	+/-	Штамм	+/-	
RLM-002	-	RLM-002	-	0
RLM-007Aa	+	RLM-007Aa	+	2
RLM-007Ab	+	RLM-007Ab	+	2
RLM-007C	-	RLM-007C	-	0
RLM-011	+	RLM-011	+	2,5
RLM-012A	+	RLM-012A	+	1
RLM-012B	+	RLM-012B	+	1
RLM-013C	+	RLM-013C	+	1,5

\* Измерения проводились от границы колонии или бумажного диска до границы зоны гидролиза.

Данные свидетельствуют, что все штаммы, кроме штамма RLM-002 и RLM-007C способны вырабатывать фермент амилазы. *Bacillus subtilis* RLM-011 образует самые большие зоны и, очевидно, вырабатывает самое большое количество фермента.

#### ЭКСПЕРИМЕНТ 2

Способность бактерий вырабатывать протеазы, или протеинащепляющие ферменты, также находит широкое применение. Данных бактерии и вырабатываемые ими ферменты могут использоваться в очистке сточных вод, пищевой промышленности и производстве стиральных порошков.

Восемь изучаемых штаммов *Bacillus* были протестированы с помощью двух белковых материалов, казеина и желатина, все штаммы показали различные свойства при расщеплении данных протеинов. Выработка ферментов протеазы определена путем анализа гидролиза казеина и питательного разжижения желатина. Бактопитательный желатин (Difco) состоит из бактомясного экстракта (3г/л), бактопептона (5 г/л) и бактожелатина (120 г/л). Для подготовки пробирки с питательным желатином 128 г бактопитательного желатина были растворены в 1 л деионизированной воды. Вода была нагрета до полного растворения желатина, и водный раствор был распределен по пробиркам, по 15 мл в каждую. Пробирки были стерилизованы в автоклаве в течение 15 мин. при температуре 121 C, а затем оставлены для остывания и затвердевания. Выделенная колония была взята из плашки TSA и перенесена с помощью стерильной в питательный желатиновый агар. После этого пробирки были инкубированы в течение 4 дней при температуре 37 C. После инкубационного периода пробиркам дали остыть. Индикатором положительного результата является разжиженное состояние желатина, который не застывает повторно.

Был проведен опыт по гидролизу казеина с помощью Бушнелл-Хааза-казеиновых плашек, и затем дискового анализа на TSA-казеиновых плашках.

Препарат Бушнелл-Хааза возможно приобрести в готовом виде (в лаборатории Difco или у дистрибьютора). Препарат состоит из сульфата магния (0,2 г/л), хлорида кальция (0,02 г/л), фосфат монокалия (1 г/л), фосфат дикалия (1 г/л), нитрат аммония (1 г/л), хлорид трехвалентного железа (0,05 г/л). Казеин, технический сорт, и агар можно также приобрести в Difco.

Для изготовления Бушнелл-Хааз-казеиновых (ВНС) плашек 3,25 г/л препарата Бушнелл-Хааза растворяют в 1 литре деионизированной воды. В водный раствор последовательно добавляют 20 г/л казеина и 20 г/л агара. Смесь нагревают до полного растворения содержимого, после чего стерилизуют в течение 15 мин. при 120 C. Затем агару позволяют остыть, затем разливают по плашкам для застывания.

В подготовленные ВНС плашки с агаром с помощью стерильной иглы переносится выделенная колония из плашки TSA. Затем плашки инкубируют в течение 48 часов при температуре 30 С. Оставляют на 2 дня при комнатной температуре. Результат положительный в случае осветления казеина.

Плашки с TSA-казеиновым агаром готовят из TSA лаборатории Difco и 20 г/л казеина технического сорта. TSA состоит из бактотриптона (15 г/л), бактосоетона (5 г/л), хлорида натрия (5 г/л) и бактоагара (15 г/л). Для подготовки TSA-казеиновых плашек 40 г/л TSA растворяют в 1 л деионизированной воды, после чего добавляют 20 г казеина. Водный раствор нагревают до полного растворения содержимого и стерилизуют в течение 15 мин. при 120 С. Затем раствор остывает, и его разливают в плашки для затвердевания и высыхания в течение ночи. В центре каждой плашки с агаром размещают бумажный диск, смоченный несколькими каплями 24-часового чистой культуры TSB опытного организма. Затем плашки инкубируют и периодически проверяют. Результат положительный в случае осветления казеина вокруг диска в течение 48 часов.

Ниже приводятся результаты казеин-гидролизного теста (Табл. 6) и разжижения желатина (Табл. 7).

ТАБЛИЦА 6

**РЕЗУЛЬТАТЫ КАЗЕИН-ГИДРОЛИЗНОГО ТЕСТА**  
ВНС-тест с полосками      TSA- казеиновый гидролизный тест с дисками, 48 часов

Штамм	+/-	Штамм	+/-	Зона (мм)*
RLM-002	-	RLM-002	+	2
RLM -007Aa	+	RLM -007Aa	+	1-2
RLM-007Ab	-	RLM-007Ab	+	1-2
RLM-007C	-	RLM-007C	-	0
RLM-011	+	RLM-011	+	3-5
RLM-012A	+	RLM-012A	+	3
RLM-012B	+	RLM-012B	+	3-4
RLM-013C	+	RLM-013C	+	3-4

\* Измерения проводились от границы колонии или бумажного диска до границы зоны гидролиза.

ТАБЛИЦА 7

**РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТА С ПИТАТЕЛЬНЫМ ЖЕЛАТИНОМ**

Штамм	2 дня (48 ч.)	4 дня (96 ч.)
RLM-002	-	+
RLM -007Aa	-	+
RLM-007Ab	-	+
RLM-007C	-	+
RLM-011	+	+
RLM-012A	-	+
RLM-012B	+	+
RLM-013C	-	+

**ЭКСПЕРИМЕНТ 3**

Способность восьми штаммов *Bacillus* вырабатывать липазу или жирно расщепляющие фермент(ы) находит широкое коммерческое применение.

Все ферменты проявляют максимальный уровень активности в различных, иногда достаточно узких диапазонах температур. Жирорасщепляющая активность была рассмотрена при нескольких температурах для установления активного диапазона выработки липазы, а также температуры оптимальной активности. Опыт по образованию липазы проводился с использованием бактоспиртового синего агара и бактолипазного реактива (Difco), который является широко применимым препаратом для определения жирно расщепляющих микроорганизмов.

В соответствии со своим наименованием спиртовой синий агар состоит из бактотриптона (10 г/л), бактодрожжевого экстракта (5 г/л), бактоагара (20г/л) и синего спирта (0,15 г/л). Данный препарат может быть приобретен в готовом виде (в лабораториях Difco или у локального дистрибьютора) или может быть приготовлен следующим образом: 35 г сухого препарата растворяют в 1 л дистиллированной или деионизированной воды, для полного растворения препарата водный раствор нагревают до температуры кипения. Затем его стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин при давлении 15 psi и 121 С. Когда он остывает до 50-55 С, добавляют 30 мл бактолипазного реактива и тщательно перемешивают. Полученный раствор помещают в 120 мл одноразовую чашку Петри (Falcon 1020). Авторы не уведомлены о составе липазного реактива, его можно приобрести в лаборатории Difco.

Спиртовой синий агар с плашками липазного реактива (SBLP) выдерживают при комнатной температуре в течение ночи, чтобы поверхность агара застыла и высохла. Активность фермента липазы была исследована простым бактериологическим нанесением полосок, инкубацией и количественным измерением зон осветления. Для нанесения полосок на плашку стерильная платиновая петля для инокуляции была помещена на минимум 48 часов в выделенную колонию, выращенную на TSA. Затем петлей аккуратно провели два раза вперед-назад по поверхности плашки с SBL. Последующая инкубация приводит к продолжительному и мощному росту бактерий, которые разделяют плашку на две части, позволяя наблюдать активность ферментов липазы в течение длительного времени. Вначале плашки подвергались инкубации в течение 24 часов при температуре 30 С., измерялись зоны осветления. Затем их выдерживали при комнатной температуре 7 дней, в течение которых проводились дополнительные замеры и наблюдения. Оценка жирорасщепляющей активности проводилась путем простого нанесения полос и измерением зон осветления.

Процедура нанесения полос повторялась при различных инкубационных температурах, которые поддерживались на постоянном уровне в течение 7 дней для изучения колебаний ферментообразующей активности штаммов в более широком диапазоне температур. Жиро расщепляющая активность каждого штамма фиксировалась при 10 С, 15 С, 20 С, 30 С. Положительный результат проявлялся в виде просветления мутной среды агара в местах роста бактерий. Чем больше хона просветления, тем больше жирорасщепляющая активность бактериального штамма. Цветовые изменения не всегда являются показателями жирорасщепляющей активности.

Результаты данного опыта представлены в табл. 8.

ТАБЛИЦА 8

**РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТА ЛИПАЗЫ: ЗОНЫ ОСВЕЩЕНИЯ (мм) ЧЕРЕЗ 7 ДНЕЙ ПРИ УКАЗАННЫХ ДИАПАЗОНАХ ТЕМПЕРАТУР (метод полосок)**

Штамм	Температура инкубации			
	10 С	15 С	20 С	30 С
RLM-002	1	3	4	5
RLM -007Aa	1	2-3	2	2-3
RLM-007Ab	1	2	6	3-4
RLM-007C	1	3	6,5	6
RLM-011	1	3	4	7
RLM-012A	1	3	5	7
RLM-012B	<1	3	3,5-4	2
RLM-013C	1,5	2-3	2-3	5-7

Данные, представленные в таблице 4 также изображены графически на рис. 1, 2, 3, четко демонстрируя образование ферментов липазы, расщепляющих жиры, смазки, масла и другие жирные вещества (гидролиз липидов). Рисунки отображают зависимость между температурой и образованием фермента

Липазы среди штаммов *Bacillus*, сгруппированных по видам. Согласно общеизвестному факту бактериальный обмен веществ усиливается с повышением температуры и ее приближением к некоторому оптимальному значению, на рис.1 ясно продемонстрировано, что два штамма *Bacillus amyloliquefaciens* RLM-007 Ab, ATCC 202134 и RLM-012B, ATCC 202133 проявляют большую липазообразующую активность при 20 С, чем при 30 С. Данная характеристика позволяет выбирать эти штаммы для использования при более низких температурах, например, в очистке сточных вод или очистке стоков пищевой промышленности в отстойных цистернах или сборниках. Кроме того, данное свойство обеспечит преимущество очистительному препарату, содержащему один или оба вида микробов, перед другими препаратами, менее эффективными при данных температурах.

Бактерии, представленные на рис. 2, демонстрируют различные примеры липазообразующей активности. *Bacillus macerans* RLM-013C, ATCC 202135 проявляет большую липазообразующую активность при 30 С, чем при 20 С. Другой штамм *Bacillus macerans* RLM-007C, ATCC 202132 ведет себя совершенно иным образом, демонстрируя резкое увеличение активности от 15 С до 20 С (пик активности), а затем с повышением температуры до 30 С постепенно снижается. *Bacillus pumilus* RLM-002, ATCC 202136 проявляет усиление активности с повышением температуры и достигает максимума активности при 30 С.

Три штамма *Bacillus subtilis*, представленные на рис. 3, являются третьим примером активности. Два штамма - RLM-011, ATCC 202137 и RLM-012A, ATCC 202139 – проявляют большую активность при повышении температуры, а штамм RLM-007Aa, ATCC 202138 не показывает такого увеличения. Его липазообразующая активность значительно ниже остальных и достигает своего максимума при 15 С.

Эти различные примеры липазообразующей активности среди штаммов *Bacillus* являются основой для создания комбинаций двух и более штаммов с целью применения в различных температурных условиях. Данная информация также может быть полезна для массового производства ферментов в «ферментерах», больших сосудах для приготовления «ферментных» партий бактерий, дрожжей, плесневых грибов и т.д. Независимо от того, созданы ли бактерии для продажи как полноценная культура, концентраты спор или ферменты выращены и очищены для особых рыночных нужд, температурные различия играют ключевую роль в выборе штамма для конкретного применения.

В ходе опытов установлено, что все восемь штаммов *Bacillus* являются доказательством жироращепляющей активности при 10 С, при этом только три штамма фактически способны расти при данной температуре (рис. 3). Факторами, обуславливающими различие, могут быть несхожесть методов и среды роста; но более вероятно, что, хотя наблюдается некоторая активность обменных процессов, такая как незначительное образование внеклеточных ферментов липазы, общая активность при 10 С была недостаточной для роста клеток и уровня репродукции, необходимого для получения положительных результатов. Тем не менее, результаты обнадеживающие, так как при подборе определенных питательных веществ или повышении уровня кислорода возможно вырастить более стойкие организмы при температуре 10 С в липидной среде.

Для продуктов, представленных в настоящем изобретении, существует большое количество возможностей использования. Заявленные бактерии и /или ферменты, производимые ими, могут применяться для очистки сточных вод, водопроводно-канализационных систем, включая очистку муниципальных и бытовых сточных вод, обработки систем очистки на месте, например, локальных систем и отстойников, предварительной очистки и/или очистки стоков пищевой промышленности, дренажных заслонок и фильтров сточных трубопроводов, колодцев, ямах и других канализационных систем.

Заявленные бактерии могут также использоваться в сельском хозяйстве, например в качестве микробов прямого потребления, которые можно добавлять в корма домашнего скота для улучшения пищеварения, в качестве силосной затравки и обработки навоза. Заявленные бактерии или ферменты могут применяться в качестве очистителей в разных сферах, а ферменты используются в производстве пятновыводителей и пищевой промышленности.

Бактерии, представленные в настоящем изобретении, обеспечивают оригинальный генофонд для рекомбинантного применения бактерий и дальнейшей рекомбинантной работы ДНК. Вероятно, опираясь на опыт современной рекомбинантной генетики, что ген(ы) одного или всех видов данных бактерий, контролирующее образование липазы, могут быть внедрены в ДНК других видов для получения аналогичной способности. И если эти другие виды являются пищей для людей или домашнего скота, то данные бактерии можно использовать для повышения качества производства пищевых продуктов и утилизации.

Ферменты липазы, полученные от бактерии *Bacillus*, могут использоваться в различных сферах, включая производство пищевых продуктов или в очистительных и моющих средствах, для расщепления жиров и масел на одежде, белье и для чистки поверхностей в кухнях и других столовых помещениях, а также в раковинах, дренажных трубах и масляных фильтрах.

Хотя данное изобретение было детально описано с пояснениями возможного использования в нескольких сферах, информацией о применении бактерий для повышения эффективности процессов, для опытного специалиста будет очевидным, что модификации, изменения и композиции с другими биологическими и химическими ингредиентами могут быть выполнены без отклонений от основной идеи данного исследования. Следовательно, опытные специалисты в рамках прилагаемых пунктов патента могут осуществить на практике данное изобретение способом, отличным от описанного выше. Поэтому целью прилагаемых пунктов патента является заявление своих прав на изобретение, описанного в пунктах.

Заявлено, что:

1. Выделенный микроорганизм штамма *Bacillus* 202135ю
2. Микроорганизм в пункте 1, определен методом анализа эфира жирной кислоты и метила (FAME), проведенном в Микрочек Инк., Норфилд, Вермонт, с использованием Триптического Соевого Агара (TSBA) версия 3.9 при 28.0 С базы данных компании Микрочек. Инк., Вермонт, как *B. macerans*.
3. Микроорганизм в пункте 1, определен методом анализа эфира жирной кислоты и метила (FAME), проведенном в Микрочек Инк., Норфилд, Вермонт, с использованием Триптического Соевого Агара (TSBA) версия 3.9 при 28.0 С базы данных компании Микрочек. Инк., Вермонт, как *Paenibacillus macerans*, генетический код подгруппы А.
4. Комбинация, состоящая из микроорганизма, заявленного в пункте 1 и одного или более других микроорганизмов.
5. Метод очистки сточных вод, включающий этап добавления в сточные воды комбинации, заявленной в пункте 4.
6. Метод очистки компонентов водопроводно-канализационных систем, включающий этап обработки компонентов комбинацией, заявленной в пункте 4.
7. Метод обработки кормов для животных, включающий этап добавления в корма комбинации, заявленной в пункте 4.
8. Метод очистки сточных вод, включающий этап добавления в сточные воды микроорганизм, заявленный в пункте 1.
9. Метод очистки компонентов водопроводно-канализационных систем, включающий этап обработки компонентов микроорганизмом, заявленным в пункте 1.
10. Метод обработки кормов для животных, включающий этап добавления микроорганизма, заявленного в пункте 1.