

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU⁽¹¹⁾2205872⁽¹³⁾ C2(51) МПК⁷ C12N1/20, C12P21/04
C12N1/20, C12R1:38

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 08.09.2014 - действует
Пошлина: учтена за 13 год с 10.08.2013 по 09.08.2014

(21), (22) Заявка: 2001122619/13, 09.08.2001

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.08.2001

(45) Опубликовано: 10.06.2003

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: LAYCOCK MAURICE V. et al. Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*, *J. Agr. and Food Chem.*, 1991, 39, №3, с. 483-489. NEU N.R. et al. Surface active properties of viscosin: a peptidolipid antibiotic, *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 1990, 32, №5, с. 518-520. BENABOURA W., TOUZI A. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil contaminated soils, 10th. *Conf. Glob. Impacts Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, Elsinore, 6-12 Aug., 1995. LIN SUNG-CHYR, *Biosurfactants: Recent advances*, *J. Chem. Technol. and Biotechnol.*, 1996, 66, №2, с. 109-120. US 5013654 A, 07.05.1991. RU 2153505 C1, 27.07.2000.

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия
Владивостока, 159, ТИБОХ ДВО РАН, зав. пат. отд.
Н.И.Стадниченко

(71) Заявитель(и):

ГУ Тихоокеанский институт биоорганической
химии ДВО РАН

(72) Автор(ы):

Иванова Е.П.,
Калиновская Н.И.,
Горшкова Н.М.,
Михайлов В.В.,
Кузнецова Т.А.

(73) Патентообладатель(и):

ГУ Тихоокеанский институт биоорганической
химии ДВО РАН

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS EXTREMIORIENTALIS* - ПРОДУЦЕНТ
ВИСКОЗИНОПОДОБНОГО ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНОГО ПЕПТИДА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Штамм бактерий *Pseudomonas extremiorientalis* - продуцент вискозиноподобного пептида, обладающего поверхностно-активными свойствами, который может найти применение в пищевой, косметической, нефтедобывающей промышленности, в биоочистке от загрязнений почвы и воды. Штамм выделен из питьевой воды природного резервуара (Богатинское водохранилище, Приморский край) методом прямого посева на триптиказный соевый агар. Штамм хранится в Коллекции морских микроорганизмов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН под номером КММ 3447, он депонирован в Бельгийской коллекции микроорганизмов под номером LMG 19695. Эксперименты по ДНК-ДНК гибридизации штамма КММ 3447 с филогенетически близкими типовыми штаммами позволили идентифицировать штамм 3447 как новый вид *Pseudomonas extremiorientalis*. Вискозиноподобный пептид, продуцируемый штаммом бактерий *Pseudomonas extremiorientalis* обладает поверхностно-активными свойствами и, являясь биосурфактантом, позволяет более эффективно проводить биоочистку от загрязнений почвы и воды, не накапливаясь в окружающей среде за счет их полной утилизации путем микробного разложения по сравнению с синтетическими поверхностно-активными веществами.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности, к штамму бактерий *Pseudomonas extremiorientalis* - продуценту вискозиноподобного пептида, обладающего поверхностно-активными свойствами, который может найти применение в пищевой, косметической, нефтедобывающей промышленности, в биоочистке от загрязнений почвы и воды.

Микроорганизмы синтезируют много потенциально важных биосурфактантов (БС). Наиболее эффективными среди них являются липопептиды такие, как сурфактин, полимиксин и грамицидин S. Возрастающий интерес к микробиальным БС диктуется широким спектром их свойств, а также их полной утилизацией по сравнению с синтетическими. Актуальность исследований вискозиноподобных соединений определяется также их значительным ингибирующим эффектом против *Mycobacterium tuberculosis, aviumintracellulare* [J. Nat. Prod. 1997. v. 60. p. 223-229] и патогенных растительных грибов [J. Appl. Microbiol. 1999. V. 86. p. 80-90].

Известен штамм *Pseudomonas reactans* NCPPB 387, выделенный из ассоциативного микробиального сообщества грибов и продуцирующий вещество пептидной природы с поверхностно-активными свойствами. [Tetrahedron. 1991, v. 47, p. 3645-3654].

Задача изобретения - расширение арсенала штаммов бактерий - продуцентов пептидов, обладающих поверхностно-активными свойствами.

Поставленная задача решена новым штаммом бактерий *Pseudomonas extremiorientalis*, продуцирующим вискозиноподобный поверхностно-активный пептид.

Штамм выделен из питьевой воды природного резервуара (Богатинское водохранилище, Приморский край) методом прямого высева на триптиказный соевый агар следующего состава (г/л): триптиказный соевый пептон - 10,0; дрожжевой экстракт - 2,0; NaCl - 5,0; агар-агар - 15,0; вода дистиллированная - 1000 мл, pH - 7,0. Культуру хранят в пробирках под слоем минерального масла на полужидкой среде приведенного выше состава при температуре 10°C и в 30% растворе глицерина при температуре -80°C.

Штамм хранится в Коллекции морских микроорганизмов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН под номером KMM 3447, он депонирован в Бельгийской коллекции микроорганизмов под номером LMG 19695.

Штамм *Pseudomonas extremiorientalis* имеет следующие характеристики.

Культурально морфологические признаки.

Штамм KMM 3447 образует на агаризованных средах круглые (4-6 мм), выпуклые, слизистые молочно-белые колонии. Клетки представляют собой небольшие подвижные (0,5-0,9x1,5x2,5 мкм) грамотрицательные палочки, имеющие аэробный тип метаболизма, способные расти при температуре от 10°C до 35°C.

Физиолого-биохимические признаки.

Штамм KMM 3447 оксидазолителен, характеризуется отсутствием ДНКазы, уреазы, гидролизует желатин, крахмал, казеин, твин-85; не продуцирует сероводород, индол, ацетон. Ассимилирует D-галактозу, D-арабинозу, D-рибозу, мальтозу, глицерин, сахарозу, ксилозу, D-глюкозу. Слабо ассимилирует цитрат. Не усваивает сорбозу, мелибиозу, лактозу, инозит, маннит, дульцит, адонит, рамнозу.

Хемотаксономические признаки.

Основные жирные кислоты представлены 16:1(n-7)(30%), 16:0(15,5%), 18:1(n-7) (13,1%).

На основании физиолого-биохимических и хемотаксономических признаков штамм KMM 3447 отнесен к бактериям рода *Pseudomonas*.

Молекулярно-генетические признаки.

Состав G+Ц оснований в ДНК составляет 61,0 mol%.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 16S рРНК гена выявил 99,6-99,8% гомологии с 16S рРНК генами *P. orientalis*, *P. tolaassii*, *P. rhodesiae*, *P. veronii*.

Эксперименты по ДНК-ДНК гибридизации штамма KMM 3447 с филогенетически близкими типовыми штаммами показали 61,7% гомологии со штаммом *P. rhodesiae* CIP 104664^T, 45% с *P. orientalis* CIP 105540^T 53% с *P. tolaassii* LMG 2342^T и 27% с *P. veronii* CIP W4663^T, что позволило идентифицировать штамм 3447 как новый вид (Int. J. Syst. Bacteriol, 1987, 37, p. 463-464), *Pseudomonas extremiorientalis*.

Культивирование штамма 3447 проводят на среде TSA следующего состава (г/л): триптиказный соевый пептон - 10,0; дрожжевой экстракт - 2,0; NaCl - 5,0; вода дистиллированная - 1000 мл, pH - 7,0. Посевной материал *Pseudomonas extremiorientalis* KMM 3447 выращивают в колбах емкостью 100 мл, содержащих 50 мл ферментационной среды, в течение 20-24 часов при температуре 23-25°C на качалке со скоростью вращения 150 об/мин, до получения плотности 10⁹ клеток/мл. Полученным посевным материалом засевают колбы емкостью 1000 мл, содержащие 500 мл ферментационной среды того же состава. Ферментацию проводят в течение 24 часов при температуре 25°C на качалке со скоростью вращения 120 об/мин.

Пример использования штамма бактерии *Pseudomonas extremiorientalis* KMM 3447 для получения вискозиноподобного биосурфактанта.

Из культуральной жидкости (3 л) клетки удаляют центрифугированием (5000 g, 20 мин, 15°C). Полученный супернатант экстрагируют бутанолом (1 лx3). Бутанольный экстракт упаривают при пониженном давлении досуха, и остаток перераспределяют между водой и гексаном, водой и хлороформом.

Концентрированную хлороформенную фракцию хроматографируют на колонке с силикагелем в градиентной системе этилацетат-этанол (9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 4:1, 3:1, 1:1). Объединенную поверхностно-активную фракцию (4:1, 3:1) упаривают и перераспределяют между водой и хлороформ-этанолом 3:1 с последующей кристаллизацией из этанола. Из 1 л культуральной жидкости получают 75 мг пептида.

Характеристики пептида: $[M+H]^+ = 1126$; аминокислотный состав: Thr, 2Ser, Glu, Val, Ile, 3Leu. Данные 1H - и ^{13}C ЯМР-спектров наряду с ИК-спектроскопией выделенного соединения совпадают с описанным в литературе вискозином (Tetrahedron. 1991, v. 47, p.3645-3654).

Вискозиноподобный пептид, продуцируемый штаммом бактерий *Pseudomonas extremiorientalis*, обладает поверхностно-активными свойствами.

В качестве образца сравнения взят сурфактин с молекулярным весом 1035, имеющий C_{15} -iso-жирнокислотный фрагмент (Изв. Акад. Наук. Сер. хим. 1995, 5, с.979-983). Вискозиноподобное соединение снижает поверхностное натяжение воды от 72 до 32 мН/м (образец сравнения снижает его до 31 мН/м). Определение активности по методу разрыва нефтяной пленки на поверхности дистиллированной воды (J. Bacteriol., 1993, v. 175, 20, p.6459-6466) показало, что выделенный из штамма *Pseudomonas extremiorientalis* пептид на одну треть активнее, чем образец сравнения.

Формула изобретения

Штамм бактерий *Pseudomonas extremiorientalis* (в КММ ТИБОХ 3447 и в ВССМ/LMG Bacteria Collection LMG 19695) - продуцент вискозиноподобного поверхностно-активного пептида.