

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** (11) **2207370** (13) **C1**
 (51) МПК⁷ **C12N1/20, C12N9/40, C12N9/36**
C12N9/40, 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 24.01.2014 по 23.01.2015

(21), (22) Заявка: **2002102089/13, 23.01.2002**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.01.2002

(45) Опубликовано: **27.06.2003**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **SAKAI T., KIMURA H., KOJIMA K., et. al. Oligosaccharides manufacture by hydrolysis of fucoidan. - Chem. Abstr, 1997, V. 126, №4. P.113. GONZALEZ J.M., WEINER R.M. Phylogenetic characterization of marine bacterium strain 2-40, a degrader of complex polysaccharides. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 2000, V. 50, №2, P.831-834. FURUKAWA S., FUJIKAWA T., et. al. Purification and some properties of exo-type fucoidanases from *Vibrio* sp. №5. Biosci. Biotech. Biochem. 1992, V. 56, №11, P.1829-1834. RU 2061754 C1, 10.06.1996.**

Адрес для переписки:
**690022, г.Владивосток, Проспект 100-лет
 Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН**

(71) Заявитель(и):
**Тихоокеанский институт биоорганической
 химии Дальневосточного отделения РАН**

(72) Автор(ы):
**Алексеева Ю.В.,
 Бакунина И.Ю.,
 Иванова Е.П.,
 Звягинцева Т.Н.,
 Михайлов В.В.**

(73) Патентообладатель(и):
**Тихоокеанский институт биоорганической
 химии Дальневосточного отделения РАН**

**(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ PSEUDOALTEROMONAS ISSACHENKONII КММ 3549^T - ПРОДУЦЕНТ
 ФУКОИДАН-ГИДРОЛАЗЫ И ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и предназначено для использования в производстве гидролитических ферментов. Штамм *Pseudoalteromonas issachenkonii* КММ 3549^T выделен из таллома бурой водоросли *Fucus evanescens* в результате поиска продуцентов гликозид-гидролаз. Питательная среда для его культивирования содержит источники азота, источники углерода и энергии и источники ростовых веществ. В качестве источника азота среда содержит пептон, в качестве источника углерода и энергии - ксилозу, в качестве источника ростовых веществ - морскую воду. Питательная среда имеет следующее соотношение компонентов, г/л: пептон 2,5-5,0; ксилоза 1,0-5,0; морская вода - до 1 л. Изобретение обеспечивает увеличение биосинтеза фукоидан-гидролазы и снижение активностей сопутствующих гликозидаз-гидролаз, повышение выхода фукоидан-гидролазы на среде простого состава, снижение себестоимости продукта. 2 с.п. ф-лы, 7 табл.

Изобретение относится к биотехнологии и предназначено для использования в производстве гидролитических ферментов, применяемых при получении биологически активных водорастворимых фукоолигосахаридов.

Сульфатированные водорастворимые полисахариды бурых водорослей - фукоиданы, а также их низкомолекулярные фрагменты (фукоолигосахариды) обладают широким спектром биологического действия и могут быть использованы в терапии некоторых заболеваний человека [1-3]. Структура фукоиданов и соответствующая ей биологическая активность варьируют от источника к источнику их получения. В общих чертах фукоиданы бурых водорослей представляют собой семейство гомо- и гетерополисахаридов, состоящих преимущественно из остатков фукозы сульфатированной иногда по третьему [4], чаще по второму и/или четвертому положениям, которые связаны в основной цепи α -1,3-, или α -1,2-, или, возможно, α -1,4-О-гликозидными связями [5, 6]. Помимо фукозы фукоиданы могут содержать минорные моносахара: маннозу, галактозу, глюкозу, ксилозу, рамнозу, уроновые кислоты [1].

Известно, что фукоидан-гидролазы, специфически катализирующие гидролитическое расщепление фукоиданов, синтезируются как макро-, так и микроорганизмами - обитателями морской среды. У наземных организмов фукоидан-гидролазы не обнаружены.

Микроорганизмы как источники получения ферментов с уникальной специфичностью привлекают все большее внимание, так как они обладают огромной скоростью размножения и позволяют осуществлять синтез в контролируемых условиях.

Известна морская бактерия (штамм 2-40), которая деградирует сложные полисахариды, в том числе и фукоидан [7]. Однако фукоидан-деградирующие свойства этой бактерии не изучены.

Известен штамм морской галофильной бактерии *Flavobacterium* sp., из которого выделены фукоидан-деградирующие ферменты [8]. С помощью этих ферментов установлены структуры фрагментов фукоидана одной из бурых водорослей, определен тип О-гликозидной связи между остатками маннозы, галактозы и глюкуроновой кислот. Однако этот штамм нам недоступен.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является штамм морской бактерии *Vibrio* sp. N 5 - обитательницы морского песка. Из биомассы этой бактерии выделены три эндо-фукоидан-гидролазы, которые гидролизуют фукоидан из бурой водоросли *Kjelmaniella crassifolia* до сульфатированных фукоолигосахаридов [9]. Уровень удельной фукоидан-гидролазной активности в экстракте согласно опубликованным данным не превышает 0,14 ед/мг белка. При этом для индукции фермента используется питательная среда, содержащая наряду с азотно-кислым аммонием, серно-кислым магнием, хлористым кальцием, фосфорно-кислым двузамещенным натрием, хлористым натрием и дрожжевым экстрактом дорогостоящий индуктор - фукоидан (5 г - 120 \$).

Задача изобретения - выявление нового штамма морской бактерии, продуцирующего фукоидан-гидролазу, способного расти на простых питательных средах, и оптимизация питательной среды для его культивирования, позволяющей повысить выход фукоидан-гидролазы и снизить уровень активности сопутствующих гликозид-гидролаз, а также и себестоимость продукта.

Поставленная задача решена тем, что в лабораторных условиях была вызвана деградация таллома бурой водоросли *Fucus evanesceus* микробным сообществом (водоросль собрана в б. Кратерная). Из этого микробного сообщества, деградировавшего таллом бурой водоросли *Fucus evanesceus*, выделен штамм бактерий рода *Pseudoalteromonas*. Он отобран по способности синтезировать фукоидан-гидролазу.

Штамму присвоен коллекционный номер КММ 3549^T в Коллекции Морских Микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (официальный акроним КММ и номер 644 во Всемирной федерации коллекций культур - WFCC). Штамм депонирован в Бельгийской коллекции микроорганизмов под номером LMG 19697.

Штамм выделен методом прямого посева из накопительной культуры на агаризованной среде следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт - 2,0; глюкоза - 1,0; K_2HPO_4 - 0,2; гидролизат казеина - 2,0; $MgSO_4$ - 0,05; агар-агар - 20,0; дистиллированная вода - 500 мл, морская вода - 500 мл, pH среды 7,8, после пяти дней инкубации при 28°C.

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 имеет следующие характеристики:

Культурально-морфологические признаки

Штамм КММ 3549^T образует на агаризованных средах круглые (5-8 мм) выпуклые слизистые прозрачные колонии с ровными краями. Клетки представляют собой подвижные небольшие (0,5-0,9, 1,0-1,5 мкм) грамотрицательные палочки, имеющие аэробный тип метаболизма, способные расти при температуре от 4 до 37°C.

Физиолого-биохимические признаки

Штамм КММ 3549^T оксидазо- и каталазоположителен, нуждается в ионах натрия для роста, характеризуется способностью гидролизовать ДНК, желатин, хитин, альгинат, казеин, твин-85 и

отсутствием способности гидролизовать крахмал, агар, каррагинан. Не продуцирует сероводород, индол, ацетон. Ассимилирует D-галактозу, D-фруктозу, ацетат, пируват, фумарат, цитрат, мальтозу, сахарозу, мелибиозу, лактозу, сукцинат, маннит. Не усваивает маннозу, глюконат, глицерин, ксилозу, трегалозу и фукозу.

Хемотаксономические признаки

Основные жирные кислоты представлены 15: 1(n-8) (5,0%), 16: 1(n-7) (45,6%), 16:0(15,1%), 18:l(n-7)(6,6%), 17:l(n-8)(8,2%).

На основании физиолого-биохимических и хемотаксономических признаков штамм KMM 3549^T отнесен к бактериям рода *Pseudoalteromonas*.

Молекулярно-генетические признаки

Состав Г+Ц оснований в ДНК составляет 43,3 mol%.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 16S рPHK гена выявил 98,6-99,8% гомологии с 16S рPHK генами *Pseudoalteromonas tetraodonis*, *Pseudoalteromonas espejiana*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas carrageenovora*.

Эксперименты по ДНК-ДНК гибридизации штамма KMM 3549^T с филогенетически близкими типовыми штаммами показали 50,0% гомологии со штаммом *P. tetraodonis* IAM 14160^T, 38% с *P. espejiana* IAM 13640^T, 54% с *P. atlantica* IAM 12927^T и 48% с *P. carrageenova* IAM 12662^T, что позволило идентифицировать штамм KMM 3549 как новый вид [10] - *Pseudoalteromonas issachenkonii*.

Первоначально культивирование штамма KMM 3549^T проводят на стандартной среде следующего состава (г/л): пептон - 5,0; дрожжевой экстракт - 2,0; гидролизат казеина - 2,0; MgSO₄ - 0,05; агар-агар - 20,0; фукоидан - 1,0; морская вода - 1000 мл, рН 7,8.

Посевной материал *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549^T выращивают в колбах емкостью 100 мл, содержащих 50 мл ферментационной среды, в течение 20-24 часов при температуре 20-25°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 20 часов при температуре 20-25°C на качалке со скоростью вращения 120 об/мин.

Приготовление экстрактов бактерий для тестирования гликозид-гидролазных активностей.

После культивирования в 500 мл жидкой среды с фукоиданом в течение 24 часов при 25°C клетки (1 г сырого веса) собирают центрифугированием в течение 30 минут при 5000 оборотов в минуту при 4°C, суспендируют в 10 мл 0,01М фосфатного буфера, рН 7,2 и разрушают ультразвуком (20 кГц). Полученный гомогенат центрифугируют при 15000 об/мин в течение 20 минут. Супернатант используют как сырой клеточный экстракт фермента.

Активности гликаназ сырого экстракта тестируют, используя фукоидан бурой морской водоросли *Fucus evanescens* [11], ламинаран из бурой водоросли *Laminaria sichorioides* [12], пустилан из лишайника *Umbellicaria russica* [13]. Альгиновую кислоту и агар (Serva, США) используют как субстраты для определения активности альгиназы и агаразы. Действие фермента регистрируют калориметрическим методом Нельсона [14] по появлению восстанавливающих сахаров - продуктов гидролиза перечисленных выше полисахаридов. Количество белка измеряют по методу Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [15]. Удельную активность гликаназ выражают как количество фермента, освобождающее 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 час на 1 мг белка.

Активности гликозидаз тестируют с помощью р-нитрофенильных производных соответствующих моносахаридов (Sigma, США) в 0,01М фосфатном буфере, рН 7,2 при 20°C. Реакционная смесь состоит из 0,05 мл сырого экстракта и 0,2 мл р-нитрофенил гликозида (1 мг/мл в 0,01М фосфатном буфере, рН 7,2). Реакцию останавливают добавлением 1,25 мл 1М Na₂CO₃. Удельную активность гликозидаз определяют как количество фермента, под действием которого образуется 1 мкмоль р-нитрофенола в мин на 1 мг белка.

Активность гликаназ и гликозидаз из клеточного экстракта *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549^T показана в табл. 1. Экстракт биомассы этих бактерий содержит высокоактивные ламинариназу, альгиназу, менее активные пустиланазу и фукоидан-гидролазу. Каррагинаназа и агараза не обнаружены. Кроме того, в клеточном экстракте *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549 найдены гликозидазы, которые катализируют гидролиз, главным образом, β-О-гликозидных связей (β-галактозидаза, β-глюкозидаза, β-ксилозидаза и N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза). Гликозидазы, которые катализируют гидролиз α-О-гликозидных связей (α-галактозидаза, N-ацетил-α-D-галактозаминидаза, α-маннозидаза, α-фукозидаза), не обнаружены.

Для выявления условий оптимального роста культуры и накопления гликозид-гидролазных активностей в среде выращивание штамма *P. issachenkonii* KMM 3549^T проводят на питательных средах различного состава. Опыты проводят в колбах на термостатируемой качалке (170 об/мин) при температуре 28°C в

течение 20 часов. Каждая колба содержит 100 мл питательной среды и равное количество (5%) посевного материала. Все опыты проводят в одинаковых условиях в двух повторностях.

Питательные среды содержат в качестве источника азота пептон, дрожжевой экстракт как компонент, содержащий необходимые факторы роста, поли- или моносахариды как источники углерода и энергии и морскую воду.

Первоначально проводят оптимизацию состава питательной среды для штамма *P. issachenkonii* KMM 3549^T по основным компонентам. Как видно из табл. 2, из шести вариантов только две модификации среды, включающие пептон и глюкозу или только пептон, оказывают положительное влияние на синтез фукоидан-гидролазы. Присутствие в питательной среде одного дрожжевого экстракта приводит к относительно слабому росту бактерий и отсутствию фукоидан-гидролазной активности. На среде, содержащей пептон и дрожжевой экстракт, и на среде, содержащей пептон, дрожжевой экстракт и глюкозу, наблюдается интенсивный рост бактерий, превышающий таковой на среде с пептоном в 3 раза, но фукоидан-гидролазная активность при этом отсутствует. Анализ результатов первой серии экспериментов позволяет предположить, что для синтеза фукоидан-гидролазы значимым является только пептон, присутствие дрожжевого экстракта и глюкозы несущественно.

В дальнейшем исследуют влияние различных концентраций пептона на синтез фукоидан-гидролазы, ламинариказы, альгиназы и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (табл. 3). Согласно полученным результатам значимой для синтеза фукоидан-гидролазы является концентрация пептона, равная 2,5 г/л. Максимальная удельная активность альгиназы наблюдается при концентрации пептона 1 г/л. Влияние различных концентраций пептона на синтез N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы практически отсутствует. Увеличение концентрации пептона до 10 г/л приводит к интенсивному росту бактерий, но не к увеличению уровня гликозид-гидролазных активностей.

Результаты следующей серии экспериментов содержат данные по влиянию фукозы, ксилозы, рамнозы и галактозы как моносахаридных фрагментов фукоиданов на синтез гликозид-гидролаз (табл. 4). Более высокая активность фукоидан-гидролазы достигается при использовании ксилозы и галактозы. Однако в присутствии галактозы заметно повышается активность и сопутствующих гликозид-гидролаз.

Варьирование концентрации ксилозы в четвертой серии экспериментов (табл. 5) показывает, что удельная активность фукоидан-гидролазы становится максимальной при концентрации ксилозы 5 г/л. Высокая концентрация ксилозы (10 г/л) в питательной среде ингибирует рост бактерий.

Эксперименты по оптимизации питательной среды с использованием полисахаридов - фукоидана, ламинарана, альгината, агарозы и каррагинана - показывают, что агароза и каррагинан ингибируют синтез фукоидан-гидролазы (табл. 6). Фукоидан слабо индуцирует синтез фукоидан-гидролазы, но является положительным фактором для синтеза N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы. Положительным фактором для продукции фукоидан-гидролазы является присутствие как ламинарана, так и альгината, но добавление в среду как ламинарана, так и альгината увеличивает удельную активность ламинариказы, большое содержание которой не желательно при проведении процедуры очистки фукоидан-гидролазы. Единственным ферментом, на синтез которого не влияет присутствие полисахаридов-индукторов, оказалась альгиназа.

Важно отметить, что эксперименты по оптимизации питательной среды с использованием полисахаридов показывают, что нецелесообразно включать полисахариды в качестве источника углерода в состав питательных сред, так как активность фукоидан-гидролазы в этом случае, так же как и других гликозид-гидролаз, весьма низка.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Культивирование штамма *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549^T проводят на среде следующего состава (г/л): пептон - 2,5; ксилоза - 1,0; морская вода - до 1 л, pH 7,8. Выращивание бактерий, получение клеточных экстрактов и определение гликозидазных активностей в этом и последующих примерах выполняют так же, как описано выше (табл. 7).

Пример 2. Культивирование штамма *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549^T проводят на среде следующего состава (г/л): пептон - 2,5; ксилоза - 5,0; морская вода - до 1 л, pH 7,8.

Пример 3. Культивирование штамма *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549^T проводят на среде следующего состава (г/л): пептон - 5,0; ксилоза - 1,0; морская вода - до 1 л, pH 7,8.

Пример 4. Культивирование штамма *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549^T проводят на среде следующего состава (г/л): пептон - 5,0; ксилоза - 5,0; морская вода - до 1 л, pH 7,8.

Таким образом, варьируя состав питательной среды, можно регулировать синтез фукоидан-гидролазы, ламинариказы и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы. Использование предлагаемого штамма

Pseudoalteromonas issachenkonii KMM 3549^T и среды для его культивирования позволяет существенно упростить процесс получения фукоидан-гидролазы и снизить себестоимость получаемых продуктов, а также позволяет увеличить удельную активность фукоидан-гидролазы в 3 раза.

Формула изобретения

1. Штамм *Pseudoalteromonas issachenkonii* КММ 3549^Т - продуцент фукоидан-гидролазы.
2. Питательная среда для культивирования продуцента фукоидан-гидролазы, содержащая источники азота, углерода и энергии, источник ростовых веществ, отличающаяся тем, что она содержит в качестве источника азота пептон, в качестве источника углерода и энергии - ксилозу, в качестве источника ростовых веществ - морскую воду при следующем соотношении компонентов, г/л:

Пептон - 2,5-5,0

Ксилоза - 1,0-5,0

Морская вода - До 1 лс

РИСУНКИ

[Рисунок 1](#), [Рисунок 2](#), [Рисунок 3](#), [Рисунок 4](#), [Рисунок 5](#), [Рисунок 6](#)