



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/20 (2023.01); C12R 2001/01 (2023.01); C08L 5/02 (2023.01)

(21)(22) Заявка: 2022132991, 15.12.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.12.2022

Дата регистрации:
28.02.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.12.2022

(45) Опубликовано: 28.02.2023 Бюл. № 7

Адрес для переписки:

129090, Москва, пр-кт Мира, 13 стр. 1, оф. 13,
ООО "ПРОМОМЕД РУС", Порохня Мария
Викторовна

(72) Автор(ы):

Белый Петр Александрович (RU),
Лопатухин Эдуард Юрьевич (RU),
Заславская Кира Яковлевна (RU),
Федоров Сергей Валентинович (RU),
Земсков Дмитрий Николаевич (RU),
Нигматова Диана Насыровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ПРОМОМЕД
РУС" (RU)

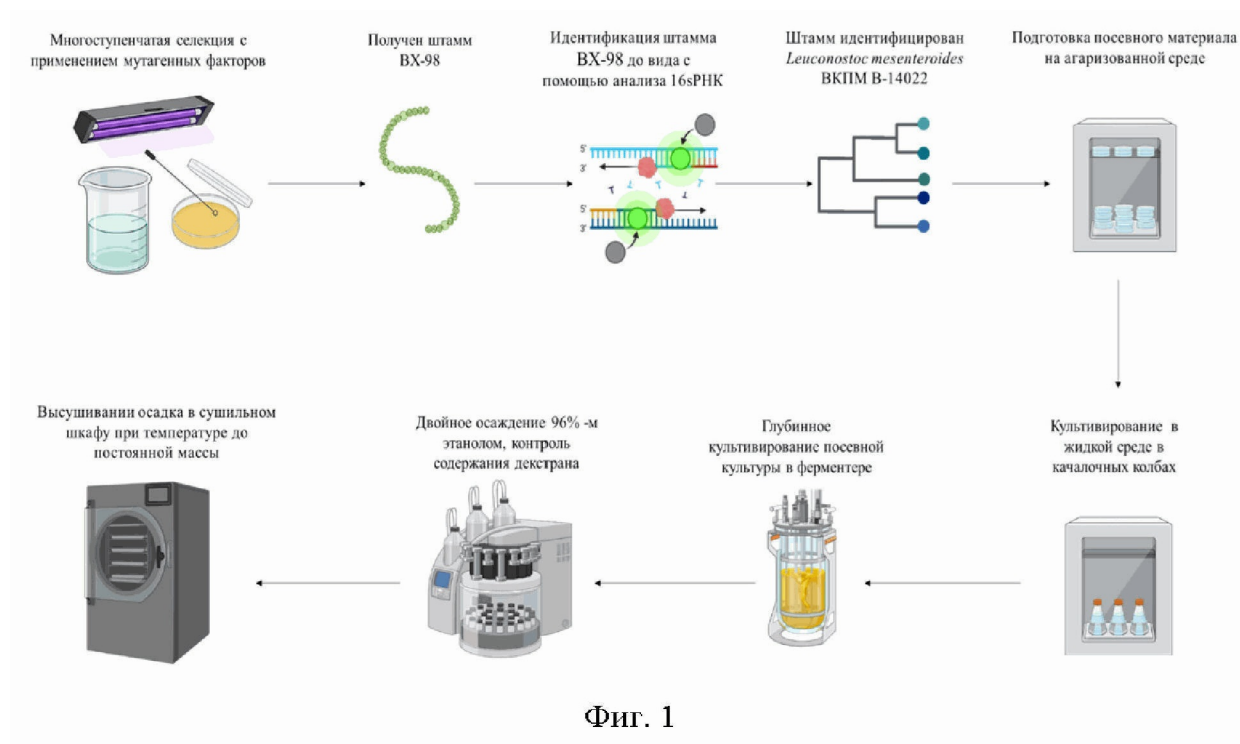
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: JIN HAN et al, Dextran synthesized
by Leuconostoc mesenteroides BD1710 in tomato
juice supplemented with sucrose, Carbohydrate
Polymers, 2014, Nov 4, 112, p.556-562. BY 5793
C1, 30.12.2003. RU 2147316 C1, 10.04.2000.
ХУСАИНОВ И.А. и др. Культивирование
Leuconostoc mesenteroides на гидролизате
биомассы кукурузы, Вестник Воронежского
(см. прод.)

(54) НОВЫЙ ШТАММ LEUCONOSTOC MESENTEROIDES ПРОДУЦЕНТ ДЕКСТРАНА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области
микробиологии и биотехнологии и касается
штамма-продуцента полисахарида декстрана
Leuconostoc mesenteroides ВКПМ В-14022, его
применения для получения декстрана и способа

получения декстрана. Изобретение позволяет
повысить продуктивность нового штамма-
продуцента декстрана. 3 н.п. ф-лы, 1 ил., 1 табл.,
5 пр.



(56) (продолжение):

государственного университета инженерных технологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Т.80, N 3 (77), 2018, с.205-211.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 1/20 (2023.01); C12R 2001/01 (2023.01); C08L 5/02 (2023.01)(21)(22) Application: **2022132991, 15.12.2022**(24) Effective date for property rights:
15.12.2022Registration date:
28.02.2023

Priority:

(22) Date of filing: **15.12.2022**(45) Date of publication: **28.02.2023** Bull. № 7

Mail address:

**129090, Moskva, pr-kt Mira, 13 str. 1, of. 13, OOO
"PROMOMED RUS", Porokhnya Mariya
Viktorovna**

(72) Inventor(s):

**Belyi Petr Aleksandrovich (RU),
Lopatukhin Eduard Iurevich (RU),
Zaslavskaja Kira Iakovlevna (RU),
Fedorov Sergei Valentinovich (RU),
Zemskov Dmitrii Nikolaevich (RU),
Nigmatova Diana Nasyrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**OBSHchESTVO S OGRANICHENNOI
OTVETSTVENNOSTIu "PROMOMED RUS"
(RU)**(54) **NEW LEUCONOSTOC MESENTEROIDES DEXTRAN PRODUCER STRAIN**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology; biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to microbiology and biotechnology and concerns *Leuconostoc mesenteroides* VKPM V-14022 dextran polysaccharide producing strain, its use for dextran

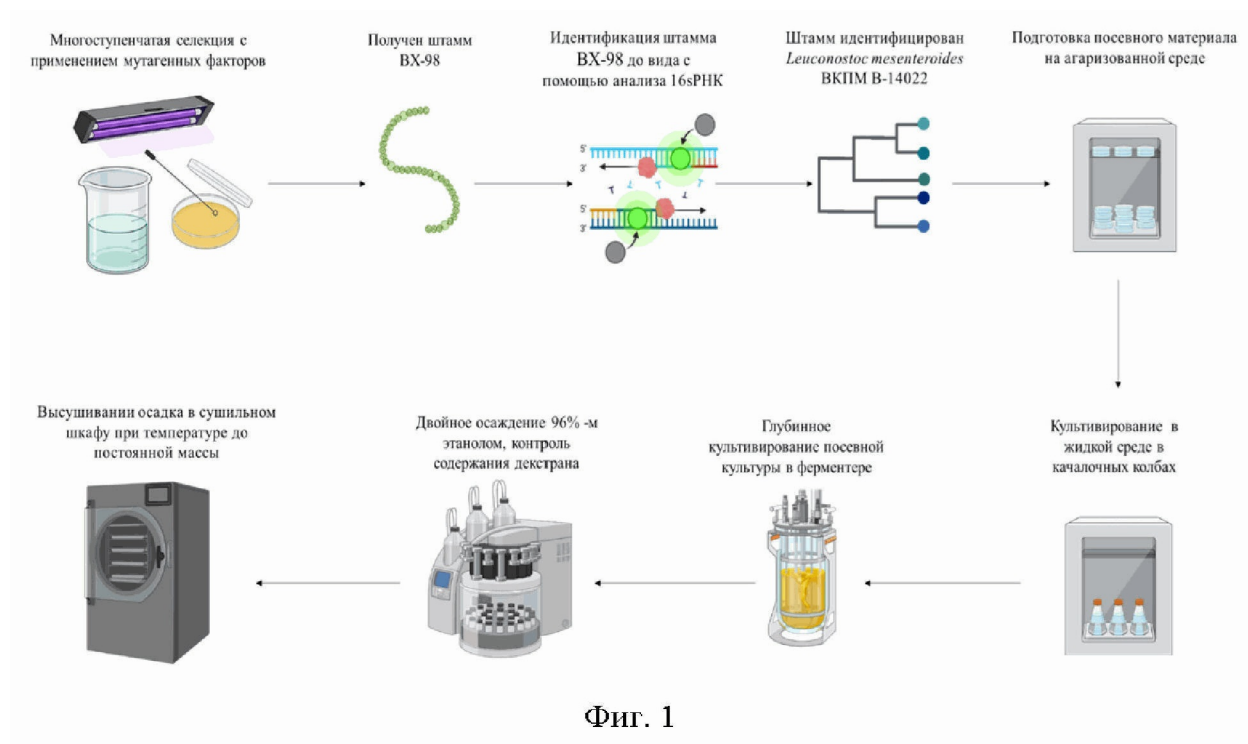
production and method of dextran production.

EFFECT: invention enables increasing the performance of a new dextran-producing strain.

3 cl, 1 dwg, 1 tbl, 5 ex

RU 2 790 669 C1

RU 2 790 669 C1



Изобретение относится к области микробиологии и биотехнологии и касается штамма-продуцента декстрана.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Декстран представляет собой внеклеточный бактериальный полисахарид, для которого было найдено промышленное применение в различных областях.

Декстран - это разветвлённый полимер глюкозы, главная цепь которого состоит из молекул, связанных связью α -1,6, а боковые ветви присоединены связями α -1,3.

Декстран синтезируется из сахарозы уксуснокислыми бактериями, в частности *Leuconostoc mesenteroides* и *Streptococcus mutans*.

Декстран представляет собой бактериальный полисахарид, который используется в качестве лекарственного средства, особенно в качестве расширителя объема плазмы крови. Декстран нашел промышленное применение в пищевой, фармацевтической и химической промышленности в качестве вспомогательного вещества, эмульгатора, химического носителя и стабилизатора (AK Goulas, et al., Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranas \ Enzyme and Microbial Technology, V. 35, Issue 4. - 2004. - P. 327-338).

Декстран является биосовместимым, нетоксичным и неиммуногенным биологическим веществом, поэтому представляет собой интерес для использования в наноразмерных системах доставки лекарственных средств (Huang G, Huang H. Application of dextran as nanoscale drug carriers. Nanomedicine (Lond). - 2018 Dec. - 13(24):3149-3158).

Было обнаружено, что декстран оказывает иммуностимулирующее действие за счет введения фосфатных групп. Выяснилось, что экспрессия CD86 на клетках CD8 α -CD11c- и CD8 α -CD11c+ усиливалась фосфорилированным декстраном. Уровни экспрессии мРНК гамма-интерферона и интерлейкина-10 на мышинных спленоцитах также повышались при стимуляции (Sato T, et al., Dextran from *Leuconostoc mesenteroides* augments immunostimulatory effects by the introduction of phosphate groups. J Food Prot.- 2004 Aug.- 67 (8):1719-24).

Известен штамм *Vickersia anguisorpha* продуцент декстрана, депонированный под номером NCIMB 42196 также описан способ получения декстрана путем культивирования *Vickersia anguisorpha* и очистки декстрана из культуральной жидкости (CN106460021, 22.02.2017).

Наиболее близким аналогом изобретения является штамм *Leuconostoc mesenteroides* BD1710, который способен синтезировать примерно 32 г/л декстрана. (Han J, et al., Dextran synthesized by *Leuconostocmesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. Carbohydr Polym.- 2014 Nov 4.- 112:556-62).

Описан высокопродуктивный штамм *Leuconostoc mesenteroides* DRP105, выделенный из сока китайской квашеной капусты. Исследователи выявили, что штамм *Leuconostoc mesenteroides* DRP105 содержит ген декстрансукразы (dsr), участвующий в производстве декстрана (Du R, et al., Functional Identification of the Dextransucrase Gene of *Leuconostoc mesenteroides* DRP105. Int J Mol Sci.- 2020 Sep 9.- 21(18):6596).

Также известен штамм *L. mesenteroides* CMG713, выделенный из винограда *Vitis vinifera* L. - продуцент высокомолекулярного декстрана, который можно гидролизовать до различных фракций с различной молекулярной массой, что позволяет его широко использовать в соответствии с потребностями различных отраслей промышленности (Sarwat F et al., Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostocmesenteroides* CMG713. Int J Biol Sci.- 2008.- 4(6):379-86).

Цель настоящего изобретения - получение нового штамма микроорганизма, превосходящего по уровню накопления декстрана известные ранее штаммы.

Техническим результатом заявленного изобретения является увеличение продуктивности нового штамма-продуцента декстрана, сокращение времени культивирования, снижение количества примеси в субстанции, высокая биохимическая активность и повышенная устойчивость нового штамма к неблагоприятным факторам, в том числе, при хранении и культивировании.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для повышения секреции декстрана родительский штамм, который был выбран из коллекционных образцов АО «Биохимик», подвергался процессу индуцированного мутагенеза путем воздействия на него ультрафиолета при низких температурах.

Полученный новый высокопродуктивный штамм, который получил внутреннее наименование ВХ-98, был идентифицирован по макро- и микроморфологическим признакам, а родовая принадлежность была подтверждена секвенированием гена 16S рДНК.

По результатам анализа секвенсов вариабельных участков генов, кодирующих 16S рРНК, тестируемый штамм ВХ-98 оказался наиболее близок к виду *Leuconostoc mesenteroides*.

Продуктивность нового штамма определялась гравиметрическим методом путем двойного осаждения нативного декстрана из ферментационной массы 96 % раствором этилового спирта.

Полученный новый штамм *Leuconostoc mesenteroides* депонирован в Национальный Биоресурсный Центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» под номером ВКПМ В-14022.

Таким образом, одним из вариантов настоящего изобретения является штамм продуцент декстрана *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-14022. Другим вариантом настоящего изобретения является применение штамма *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-14022 для получения декстрана. Еще одним из вариантов настоящего изобретения является способ получения полисахарида декстрана, который заключается в том, что осуществляют культивирование штамма *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-14022 и выделение декстрана из ферментационной среды (Фиг.1).

ТЕРМИНЫ и ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Ниже приведены термины, которые могут использоваться при описании настоящего изобретения. Если не указано иное, все технические и специальные термины, использованные в описании, имеют общепринятое в данной области техники значение.

Термин «биомасса» в контексте настоящего изобретения относится к совокупной массе клеток *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-14022, отделенных в процессе центрифугирования от супернатанта культуральной жидкости, полученной в результате культивирования, в том числе, в качалочных колбах или биореакторах (например, при культивировании батарейным способом).

Термин «культуральная жидкость» в контексте настоящего изобретения означает газожидкостную питательную (или ферментационную) среду, в которую в процессе глубинного культивирования микроорганизмы выделяют продукты метаболизма (в т.ч. вторичные метаболиты).

Термин «биореактор» в контексте настоящего изобретения относится к сосуду или устройству, в котором осуществляются процесс глубинного культивирования микроорганизмов для наработки целевого продукта.

Термин «продуктивность штамма» в контексте настоящего изобретения относится к количеству полученного декстрана, рассчитанному на единицу объема культуральной жидкости, при глубинном культивировании штамма *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ

В-14022 в условиях биореактора, выраженному в граммах декстрана на литр культуральной жидкости.

При использовании в описании термина «примерно», «приблизительно», «около» следует считать, что он характеризует плюс минус десять процентов от указанной

величины.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано посредством Фиг. 1.

На Фиг. 1 изображены основные этапы получения декстрана из культуры штамма *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-14022

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложен новый штамм продуцент декстрана - штамм *Leuconostoc mesenteroides* депонирован в Национальный Биоресурсный Центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» под номером ВКПМ В-14022.

Культурально-морфологические признаки: При поверхностном культивировании на агаризованной среде колонии на 3 сутки культивирования - слизистые, гладкие округлые, выпуклые, прозрачные, диаметром 4-6 мм.

Для хранения и приготовления посевного материала используется среда следующего состава, г/л: сахара - 100,0-160,0; агар-агар - 10,0-30,0; соль Мора ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) - 0,005-0,020; пептон - 0,1-0,5; ПАБК (пара-аминобензойная кислота) - 0,01-0,07; NH_4Cl - 0,1-1,0; NaCl - 0,01-0,20; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1-0,7; KH_2PO_4 - 1,0-8,0; Na_2HPO_4 - 1,0-5,0; CaCl_2 - 0,01-0,05; дрожжевой экстракт - 0,01-0,10; pH среды - 5,5 - 7,2; Т - 23-30°C, аэробные условия.

ПРИМЕРЫ

Изобретение поясняется следующими иллюстративными примерами, которые не ограничивают заявленный объем охраны.

Пример 1. Получение нового высокопродуктивного штамма-продуцента декстрана.

Путем многоступенчатой селекции с применением мутагенных факторов и направленных методов отбора модификантов родительского штамма-продуцента декстрана был получен новый высокопродуктивный штамм ВХ-98 - продуцент декстрана.

Для этого проводили воздействие УФ с длиной волны 250,0 нм (лампа Mineralight) водной суспензии клеток родительского штамма, размещенного на расстоянии 55 см от лампы, в течение 20 минут при температуре 0°C. Полученному штамму был присвоен внутренний номер ВХ-98.

Пример 2. Идентификация штамма ВХ-98 до вида с помощью анализа 16s РНК.

Выделение ДНК штамма ВХ-98 для ПЦР проводили по стандартной методике (PCR Protocols. A Guide to methods and applications. Innis M, Gelfand D., Sninsky J.p.14-15).

Для секвенирования использовались консервативные праймеры для наработки 16S rDNA:

8f - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG

926r - CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT

Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе AE3000 с режимами реакции:

1. 95°C - 3 мин.

2. 35 циклов

95°C - 30 сек.

57°C - 30 сек.

72°C - 1 мин. 30 сек.

3. 72°C - 5 мин

Для анализа секвенированных последовательностей использовали специализированные филогенетические компьютерные программы. Для стабильности воспроизведения результатов проводили не менее трех повторов ПЦР-реакций.

Далее проводили электрофорез ПЦР исследуемых образцов в 1,0% агарозном геле, при напряженности электрического поля 5 В/см.

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм принадлежит к следующим систематическим группам: *Bacteria*; *Firmicutes*; *Bacilli*; *Lactobacillaceae*; *Leuconostoc*.

Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий, доступными из базы данных GenBank.

Обработку секвенированных последовательностей проводили при помощи биоинформатического программного обеспечения, находящегося в открытом доступе - программы Blast (Basic Local Alignment Search Tool), предназначенной в т.ч. для определения степени филогенетической близости живых организмов.

По результатам анализа секвенсов вариабельных участков генов, кодирующих 16S рРНК, тестируемый штамм ВХ-98 оказался наиболее близок к виду *Leuconostoc mesenteroides*.

Пример 3. Методика культивирования.

Проводили подготовку посевного материала путем посева культуры *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-14022 на чашках Петри. Для этого агаризованную среду засеивали исходной посевной культурой, и выдерживали в термостате от 3 до 7 суток, при температуре 23-30°C.

Далее проводили наработку культуры в колбах в жидкой среде при 20-30°C в течение 24-60 часов в термостатируемом орбитальном шейкере при 200-300 об/мин.

Далее проводили наработку посевной культуры в ферментере объемом 15/100 л, для этого проводили засев ферментера путем внесения посевной культуры в количестве 5-15% от объема среды в ферментере, при непрерывной подаче стерильного воздуха во время процесса культивирования при перемешивании в течении 60-150 часов.

Контроль содержания декстрана проводили гравиметрическим методом после двойного осаждения 96% раствором этанола.

При максимальном накоплении декстрана на 3-6 сутки процесс культивирования прекращали.

Пример 4. Определение содержания декстрана в культуральной жидкости.

Содержание декстрана определяли гравиметрическим методом путем осаждения нативного декстрана из ферментационной массы 96 % раствором этилового спирта и высушивании осадка в сушильном шкафу при температуре (100-130°C) до постоянной массы.

Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Выход целевого продукта при глубинном культивировании		
Штамм	Продуктивность штаммов (г/л культуральной жидкости $\pm 0,5$ г/л)	
	в ферментере объемом 15 литров	в ферментере объемом 100 литров
<i>Leuconostocmesenteroides</i> ВКПМ В-14022	67,7	77,8
	70,3	79,9
	69,2	80,6

Согласно литературным данным продуктивность известного штамма *Leuconostoc*

mesenteroides BD1710 составляла не более 32,15 г/л (Han J, et al., Dextran synthesized by *Leuconostocmesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. Carbohydr Polym.- 2014 Nov 4.- 112:556-62). А продуктивность штамма *Leuconostoc mesenteroides* DRP105 не превышала 25 г/л (Du R, et al., Functional Identification of the Dextran sucrose Gene of *Leuconostoc mesenteroides* DRP105. Int J Mol Sci.- 2020 Sep 9.- 21(18):6596).

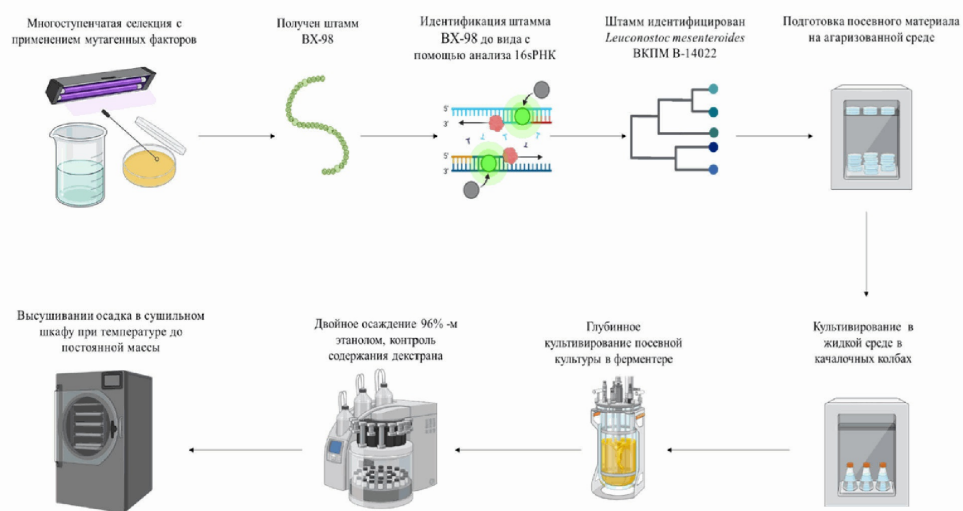
Результаты исследований позволяют сделать вывод о том, что штамм микроорганизма по настоящему изобретению обладает высоким биотехнологическим потенциалом, значительно увеличенной продуктивностью, и может применяться для промышленного производства полисахарида декстрана.

Пример 5. Методика выделения декстрана.

После завершения культивирования микроорганизма *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-14022 биомассу отделяли путем центрифугирования. Очищенную от биомассы культуральную жидкость переносили на стадию дальнейшей очистки. Далее проводили осаждение нативного декстрана из ферментационной массы 96 % раствором этилового спирта и высушивали осадок в сушильном шкафу при температуре (100-130) °С до постоянной массы.

(57) Формула изобретения

1. Штамм *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-14022 продуцент декстрана.
2. Применение штамма по п.1 для получения полисахарида декстрана.
3. Способ получения декстрана, включающий культивирование штамма по п.1 и выделение декстрана из ферментационной среды.



Фиг. 1