



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **131340** (13) **C2**
(51) МПК

C12N 1/02 (2006.01)

C12N 1/20 (2026.01)

C12R 1/04 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2023 06211**

(22) Дата подання заявки: **20.12.2023**

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **22.10.2026**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **24.07.2024, Бюл.№ 30**

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **21.10.2026, Бюл.№ 42**

(72) Винахідник(и):

**Перетятко Тарас Богданович (UA),
Войтович Марія Богданівна (UA),
Комплікевич Соломія Ярославівна (UA),
Масловська Ольга Дмитрівна (UA),
Мороз Оксана Михайлівна (UA)**

(73) Володілець (володільці):

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА,
вул. Університетська, 1, м. Львів, 79000
(UA),
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА НАЦІОНАЛЬНИЙ
АНТАРКТИЧНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР,
бульв. Тараса Шевченка, 16, м. Київ, 01601
(UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

Exopolysaccharides production by cultivating a bacterial isolate from the hypersaline environment of salar de uyuni (bolivia) in pretreatment liquids of steam-exploded quinoa stalks and enzymatic hydrolysates of curupaú sawdust / DIEGO CHAMBI, LUIS ROMERO-SOTO, ROXANA VILLCA, FELIPE et. al. // Fermentation. 2021. Vol. 7. No. 33. P. 1-16, DOI:10.3390/fermentation7010033
Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads / FRANK JAKOB, STEFAN STEGER, RUDI F. VOGEL // Eur Food Res Technol. 2012. Vol. 234. No. 3. P. 493–499, DOI:10.1007/s00217-011-1658-7
Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by Paenibacillus polymyxa SQR-21 / WASEEM RAZA, KOUSAR MAKEENET al. // Bioresource Technology. 2011. Vol. 102. No. 10. P. 6095–6103, DOI:10.1016/j.biortech.2011.02.03
New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic Pseudomonas sp. ID1 / CARRIÓN, O., DELGADO, L. & MERCADE, E. // Carbohydr. Polym. 2015. Vol. 117. P. 1028–1034, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.060>
CN 109486712 B, 29.05.2020
US 10870710 B2, 22.12.2020

UA 131340 C2

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ PSEUDARTHROBACTER SP. IMB B-7981 - ПРОДУЦЕНТ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі біології, а саме до промислової мікробіології і може бути використаний у біотехнології для одержування екзополісахаридів з використанням штаму бактерій *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981. Штам бактерій *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 зберігається у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України від 6 грудня 2021 року. Використання штаму дає змогу розширити асортимент продуцентів екзополісахаридів при збільшеному виході цільового продукту.

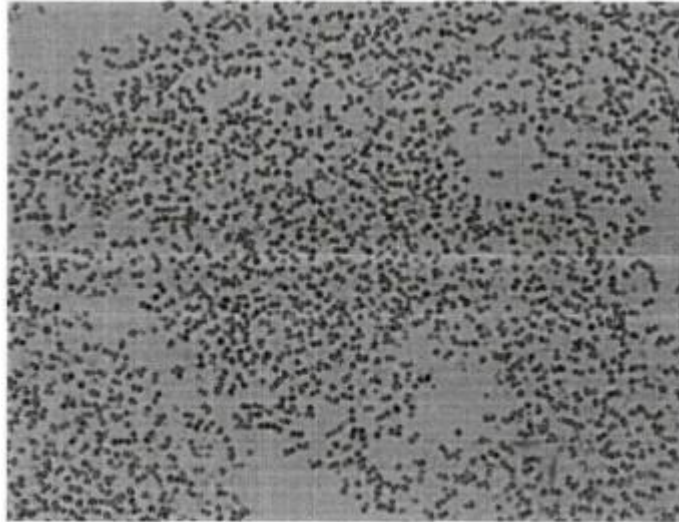


Fig. 1

Винахід належить до галузі біології, а саме до промислової мікробіології і може бути використаний у біотехнології для одержування екзополісахаридів бактеріями *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981.

Відома здатність бактерій *Bacillus* sp. BU-4, виділених з гіперсолонного середовища в Салар-де-Уюні (Болівія), продукувати екзополісахариди упродовж 48 год. при 30 °C за різних умов культивування. Найкращими субстратами для ефективного продукування екзополісахаридів є рідина, одержана внаслідок оброблення стебел лободи та ферментативні гідролізати тирси курупау (*Anadenanthera colubrina*). Вихід екзополісахаридів зі субстратів на основі стебел лободи та тирси *A. colubrina* становить 2,73 та 0,89 г/л, відповідно. У синтетичному глюкозовмісному середовищі *Bacillus* sp. BU-4 продукують 2,34 г/л екзополісахаридів (Chambi D., Romero-Soto L., Villca R., Orozco-Gutierrez F., Vega-Baudrit J. et al. Exopolysaccharides production by cultivating a bacterial isolate from the hypersaline environment of Salar de Uyuni (Bolivia) in pretreatment liquids of steam-exploded quinoa stalks and enzymatic hydrolysates of Curupau sawdust. Fermentation. 2021. 7. 33. doi: 10.3390/fermentation7010033).

Недоліками у використанні бактерій *Bacillus* sp. BU-4 для одержування екзополісахаридів є їхня здатність продукувати екзополісахариди лише при температурі 30 °C і відносно невисокий вихід цільових продуктів.

Відомі бактерії *Gluconobacter frateurii* TMW 2.767, *Gluconobacter cerinus* DSM 9533, *Neoasaia chiangmaiensis* NBRC 101099 та *Kozakia baliensis* DSM 14400, які здатні продукувати екзополісахариди у концентрації від 6 до 12 г/л. Найбільшу кількість екзополісахаридів вони продукують при 30 °C упродовж 48 год. у сахарозовмісному середовищі такого складу (г/л): глюконат натрію - 20; дріжджовий екстракт - 3; пептон - 2; гліцерин - 3; маніт - 10; сахароза - 80; агар - 20 на роторному шейкері зі швидкістю обертання 180 об/хв (Jakob F., Steger S., Vogel R.F. Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads. Eur Food Res Technol. 2012. 234. 493-499. doi: 10.1007/s00217-011-1658-7).

Недоліками у використанні бактерій *G. frateurii* TMW 2.767, *G. cerinus* DSM 9533, *N. chiangmaiensis* NBRC 101099 та *K. baliensis* DSM 14400 для одержування екзополісахаридів є висока вартість компонентів середовища для їхнього культивування, витрати на електроенергію для обертання роторного шейкера і здатність бактерій продукувати екзополісахариди лише при температурі 30 °C.

Відомі бактерії *Paenibacillus polymyxa* SQR-21, які здатні продукувати екзополісахариди за різних умов культивування. Найбільшу кількість екзополісахаридів (3,44 г/л) бактерії продукують у середовищі з галактозою (48,5 г/л), Fe³⁺ (242 мкмоль) і Ca²⁺ (441 мкмоль) при температурі 30 °C упродовж 96 год. (Raza W., Makeen K., Wang Y., Xu Y., Qirong S. Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *P. polymyxa* SQR-21. Bioresource Technology. 2011. 102. 6095-6103. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.033).

Недоліками у використанні бактерій *P. polymyxa* SQR-21 є їхня здатність продукувати екзополісахариди лише при температурі 30 °C і відносно невисокий вихід цільових продуктів.

Найближчим за сукупністю суттєвих ознак - прототипом є бактерії *Bacillus zhangzhouensis* BZ 16, які продукують екзополісахариди за різних умов культивування. *B. zhangzhouensis* BZ 16 у середовищі, яке містить 25 г/л дріжджового екстракту при температурі 37 °C продукують 12,37 г/л екзополісахаридів, що у 6 разів перевищує вихід цільових продуктів, досягнутий без оптимізації умов (Miri M., Bergayou H., Belmouden A., Moukrim A., Baazizi H. et al. Medium optimization for exopolysaccharides production by *Bacillus zhangzhouensis* BZ 16 strain isolated from Khnifiss Lagoon. E3S Web of Conferences. 2021. 234. doi: 10.1051/e3sconf/202123400099).

Недоліками у використанні бактерій *B. zhangzhouensis* BZ 16 для продукування екзополісахаридів є висока вартість компонентів середовища для їхнього культивування, а також здатність бактерій продукувати екзополісахариди лише при температурі 37 °C.

В основу винаходу поставлено задачу одержати штам бактерій *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 - продуцента екзополісахаридів шляхом виділення його з природних біотопів, що дасть змогу розширити коло продуцентів екзополісахаридів з одночасним здешевленням і збільшенням виходу цільового продукту.

Поставлена задача вирішується шляхом виділення штаму бактерій *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 зі зразка ґрунту, відібраного з місця гніздування *Larus dominicanus* (Мартина домініканського), о. Галіндез, Морська Антарктика (координати S 65.247453, W 064.249915), що здатний продукувати екзополісахариди.

Фіг. 1. Мікросвітлина поверхні клітини штаму бактерій *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 при збільшенні 1000.

Фіг. 2. Мікросвітлина поверхні клітини штаму бактерій *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 при збільшенні 4000.

Технічний результат винаходу досягається шляхом виділення штаму *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 зі зразка ґрунту, відібраного з місця гніздування *Larus dominicanus* (Мартина домініканського), о. Галіндез, Морська Антарктика, способом прямого висіву водних суспензій зразку ґрунту на крохмально-аміачний агар і культивування за аеробних умов, багаторазового

пересіву відібраних окремих колоній на крохмально-аміачний агар.

Штам *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 зберігається у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. Заболотного НАН України від 6 грудня 2021 року (Гнатуш С.О., Перетятко Т.Б., Мороз О.М., Масловська О.Д., Комплікевич С.Я. Свідоцтво про депонування штаму бактерій *Pseudarthrobacter* sp. 2В-К-54 у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України з наданням реєстраційного номеру IMB B-7981 від 06.12.2021).

Для виділення бактерій водну витяжку зразка ґрунту, відібраного у березні 2021 року учасниками Української антарктичної експедиції, висівають на крохмально-аміачний агар, культивують за аеробних умов, здійснюють багаторазовий пересів відібраних окремих колоній на крохмально-аміачний агар. Для одержання ґрунтової витяжки 1 г ґрунту вносять у пробірки з 9 мл стерильного фізіологічного розчину і витримують упродовж 1 год. 100 мкл ґрунтової витяжки, розведеної у 10^4 разів, стерильно вносять на чашку Петрі з крохмально-аміачним агаром і культивують упродовж 10 діб при температурі 22 ± 1 °C. Для отримання чистої культури бактерії окремі колонії тричі пересівають на чашки Петрі з крохмально-аміачним агаром. Чистоту культури контролюють мікроскопіюванням.

Депонований штам відбирають за здатністю до гетеротрофного росту з використанням низки органічних субстратів як джерел карбону та стійкістю до впливу солей хрому, купруму, феруму, мангану, кадмію.

Запропонованому штаму бактерій *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 властиві такі морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки:

Таблиця 1

Морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки штаму бактерій *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981

Морфологічні ознаки	Клітини плеоморфні. Спор не утворюють. Нерухомі. Грампозитивні. На крохмально-аміачному агарі утворюють поверхневі круглі, блискучі колонії білого кольору з рівним краєм, 1-3 мм у діаметрі.
Фізіолого-біохімічні ознаки	Каталазопозитивні. Оксидазонегативні. Ростуть за температури 4-28 °C. Оптимальна температура для росту 20-22 °C. Оптимальне pH 6,8-7,3. Аероби. На триптон-соевому бульйоні характер росту рівномірний, який супроводжується утворенням гідроген сульфідів. Аміаку під час росту на триптон-соевому бульйоні не продукують. Індолу з триптофану не утворюють. Помірні галофіли, витримують до 15 % NaCl. За використання арабінози, глюкози, дульциту, ініозитолу, ксилози, манітолу, маннози, рамнози, сахарози, сорбітолу кислоти і газу не утворюють. Асимілюють L-рамнозу, N-ацетилглюкозамін, D-рибозу, ініозитол, D-сахарозу, D-мальтозу, ітаконову кислоту, молочну кислоту, L-аланін, калій 5-кетоглюконат, калій 2-кетоглюконат, глікоген, 3-гідроксибензойну кислоту, 4-гідроксибензойну кислоту, L-серин, D-манітол, D-глюкозу, саліцин, D-мелібіозу, L-фукозу, D-сорбітол, L-арабінозу, 3-гідроксибутират, L-пролін. Ростуть на середовищі Менкіної з лецитином. Здатні до азотфіксації та нітрифікації. Ростуть на голодному агарі (триптон-соевий агар, розведення 1:10). Характеризується протеолітичною, аміполітичною та ліполітичною активностями за росту на триптон-соевому бульйоні з 12,5 % желатину, крохмально-аміачному та середовищі з твіном-20, відповідно
Генетичні ознаки	Послідовність нуклеотидів гена 16S рРНК штаму <i>Pseudarthrobacter</i> sp. IMB B-7981 задепоновано у базі даних GenBank (OL342384). Послідовність нуклеотидів гена 16S рРНК <i>Pseudarthrobacter</i> sp. IMB B-7981 на 99,24 % ідентична до послідовності гена 16S рРНК штамів <i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i> ALL і <i>Pseudarthrobacter psychrotolerans</i> YJ56.

Здатність штаму бактерій *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 продукувати екзополісахариди доведено наступним прикладом.

Бактерії *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 попередньо вирощують на крохмально-аміачному агарі при температурі 26 ± 2 °C упродовж 48-72 год. за аеробних умов до одержання суцільного

газону на чашці Петрі. Мікробіологічною петлею бактерії переносять на чашки Петрі з цукровмісними середовищами, а саме: крохмально-аміачним середовищем такого складу (г/л): розчинний крохмаль - 10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -2,0; K_2HPO_4 -1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -1,0; NaCl -1,0; CaCO_3 -3,0; агар - 20,0; вода водопровідна - до 1 л), або середовищем Ешбі такого складу (г/л): сахароза або маніт - 20,0; K_2HPO_4 -0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; NaCl -0,2; K_2SO_4 -0,1; CaCO_3 -5,0; розчин мікроелементів - 1 мл; агар - 20,0; вода дистильована - до 1 л, або Менкіної такого складу (г/л): глюкоза - 10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,3; KCl -0,3; MnSO_4 -0,001; FeSO_4 -0,001; CaCO_3 -5,0; соєвий лецитин - 3,5; агар - 20,0; вода дистильована - до 1 л і культивують при температурі 6 ± 1 та 22 ± 1 °C упродовж 14 ± 1 діб за аеробних умов. Після цього у пробірку об'ємом 15 мл з 2 мл води вносять бактерії, вирощені на чашці Петрі з одним із перелічених середовищ, ретельно перемішують, додають 2 мл 2 % розчину етилендіамінтетраоцтової кислоти і витримують при температурі 4 °C упродовж 3 год. Після цього суміш центрифугують при 15000 g упродовж 20 хв при температурі 4 °C (Pan X., Liu J., Zhang D., Chen X., Li L. et al. A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using threedimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy//Water SA. 2010. 36 (1). 111-116. doi: 10.4314/wsa.v36i1.50914). В одержаній надосадовій рідині спектрофотометрично визначають вміст екзополісахаридів з використанням антрону ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}$) (Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin//Water Research. 1996. 30 (8). 1749-1758. doi: 10.1016/0043-1354(95)00323-1). Для цього до 0,8 мл надосадової рідини додають 1,6 мл розчину антрону у сульфатній кислоті (0,125 % антрону у 94,5 % H_2SO_4). Реакційну суміш перемішують, витримують на водяній бані при 100 °C упродовж 14 хв і охолоджують при 4 °C упродовж 5 хв. Визначають оптичну густину спектрофотометрично з використанням спектрофотометра DeNovix DS-11+ при довжині хвилі 625 нм. Для розрахунків концентрації екзополісахаридів використовують калібрувальну криву.

Бактерії *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 продукують екзополісахариди за різних умов культивування (табл. 2). Температури росту бактерій, за яких вони продукують екзополісахариди, визначають експериментально. На середовищі Менкіної при 6 ± 1 °C бактерії продукують $12,59 \pm 0,84$ г/л екзополісахаридів, що у 3,56 разів більше порівняно з їх культивуванням при 22 ± 1 °C; на крохмально-аміачному середовищі при 6 ± 1 °C вони продукують $6,01 \pm 0,43$ г/л екзополісахаридів і $3,22 \pm 0,25$ г/л - при 22 ± 1 °C.

Таблиця 2

Концентрація екзополісахаридів, продукуваних бактеріями
Pseudarthrobacter sp. IMB B-7981, за різних умов культивування

Температура	Прототип	<i>Pseudarthrobacter</i> sp. IMB B-7981		
культивування, °C	Середовище з дріжджовим екстрактом	Крохмально-аміачне середовище	Середовище Ешбі	Середовище Менкіної
	Концентрація екзополісахаридів, г/л			
37	12,37	-	-	-
22±1	-	3,22±0,25	3,49±0,26	3,54±0,18
6±1	-	6,01±0,43	5,27±0,32	12,59±0,84

Pseudarthrobacter sp. IMB B-7981 на середовищі Ешбі продукують $5,27 \pm 0,32$ г/л екзополісахаридів при 6 ± 1 °C і $3,49 \pm 0,26$ г/л - при 22 ± 1 °C. Суттєве зростання концентрації екзополісахаридів, продукуваних бактеріями *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981, при температурі 6 ± 1 °C може мати для них важливу кріопротекторну роль.

Отримані результати вказують на те, що бактерії *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 є продуцентами екзополісахаридів.

Pseudarthrobacter sp. IMB B-7981 є перспективними об'єктами для промислової мікробіології і можуть бути використані у біотехнології для одержування екзополісахаридів.

Використання заявленого штаму дає змогу розширити асортимент продуцентів екзополісахаридів при збільшеному виході цільового продукту.

Вище згадані технологічні процеси підтверджують досягнення передбачуваного технічного результату.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Штам бактерій *Pseudarthrobacter* sp. IMB B-7981 - продуцент екзополісахаридів.

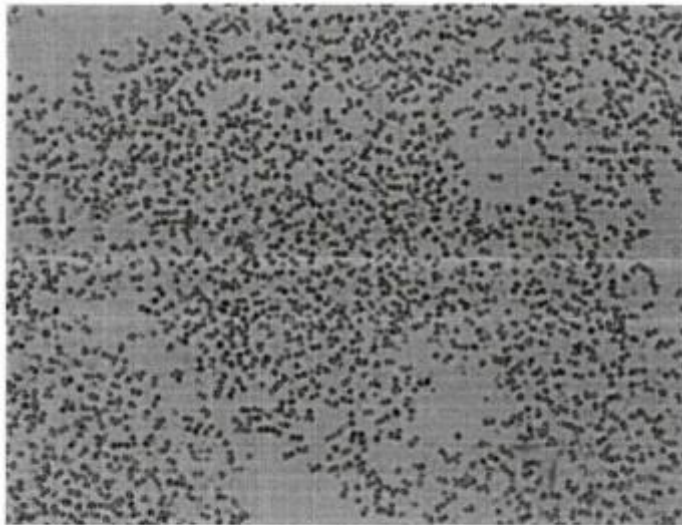


Fig. 1

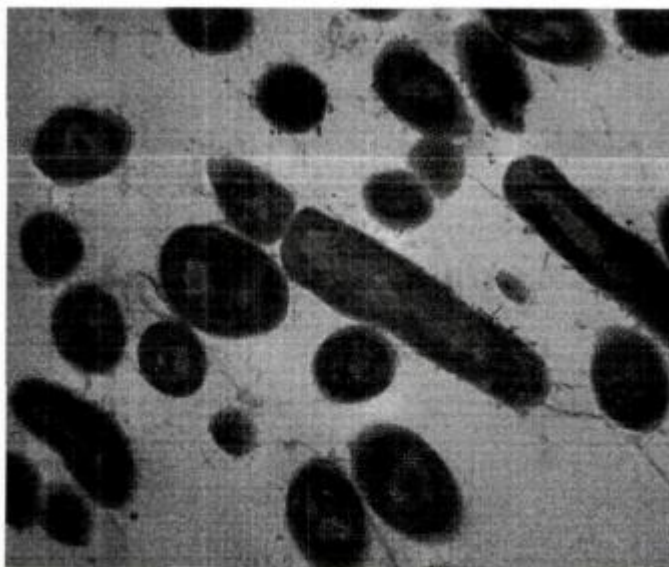


Fig. 2