

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900384** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.01.29

(51) Int. Cl. *C12P 19/04* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.07.09

(54) ПОЛИСАХАРИД STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS

(96) 2019000066 (RU) 2019.07.09

(72) Изобретатель:

(71) Заявитель:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "САРАТОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И.
ВАВИЛОВА" (ФГБОУ ВО
САРАТОВСКИЙ ГАУ) (RU)**

**Урядова Галина Тимофеевна, Фокина
Надежда Александровна, Карпунина
Лидия Ивановна (RU)**

(57) Изобретение относится к прикладной микробиологии и биотехнологии и касается молочнокислой бактерии *Streptococcus thermophilus* ТНВП, продуцирующей экзополисахарид (ЭПС), который может быть использован в ветеринарии, пищевой промышленности. Поставленная в изобретении задача решается тем, что полисахарид *Streptococcus thermophilus* получен путем культивирования молочнокислой бактерии *Streptococcus thermophilus* на среде A. Welman. Отличием от классической рецептуры среды является то, что в составе среды в качестве источника углерода используется сахароза, а способ выделения и очистки заключается в том, что культуральную жидкость центрифугируют при 3000g в течение 30 мин, с последующим удалением биомассы и упариванием надосадочной жидкости, добавлением к ней двойного объема 96% этилового спирта (переосаждение и центрифугирование повторяли 3 раза), с дальнейшей очисткой методом гелевой фильтрации на колонке с носителем SephadexG-50.

A1

201900384

201900384

A1

Полисахарид *Streptococcus thermophilus*

Изобретение относится к прикладной микробиологии и биотехнологии и касается молочнокислой бактерии – *Streptococcus thermophilus* ТНВП (Т – термофильный, НВ – невязкий, П – для простокваши), продуцирующей экзополисахарид (ЭПС), который может быть использован в ветеринарии, пищевой промышленности, сельском хозяйстве.

Бактериальные полисахариды применяются в медицине, химической, нефтяной, пищевой промышленности. Преимущества таких ЭПС в их климатической независимости, простоте и экономичности производства, регулировании свойств и условий их получения. Среди бактериальных ЭПС особое внимание заслуживают ЭПС молочнокислых бактерий. Среди них широко применяются следующие ЭПС: в медицине – декстран (*Leuconostoc mesenteroides*, *Streptobacterium dextranicum*) [Cerning J., Roissart I.H., Luquet F.M. Polysaccharides exocellulaires produit sparlesbactéries lactiques. / BactériesLactiques. –1994. – P. 309 – 329. Ricciardi A., Clementi F. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production nandtechnolog calapplications /Ital. J. FoodSci. – 2000. – V. 12. – P. 22 – 45], ЭПС *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* OLL 1073R-1 [Makino S., Ikegami S., Kano H. Immynomodulatory effect sof polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii*spp. *Bulgaricus* OLL 1073R-1 // J. DairySci. – 2006. – V. 89, Issue 8. – P. 2873-2881. Nishimura-Uemura J., Kleerebezem E., Sralowska B. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii*s pp.*bulgaricus* OLL1073R-1 // Food Microbiology. – 2003. – N20. – P. 267-273.]; на химическом производстве, атомных станциях – полисахариды, продуцируемые *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* [Thapa D., Zhang H. *Lactobacillus rhamnosus* exopolysaccharide reduces mutagenic potential of geno toxins / International Journal of Probiotic sand

Prebiotics. – 2009. – V. 4. – № 3.– P. 79 – 82], *Bifidobacterium longum* [Sreekumar O., Hosono A. The antimutagenic properties of a exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines / Can. J. Microbiol. – 1998. – № 44. – P. 1029 – 1036]; в пищевой промышленности для улучшения качества молочной продукции – ЭПС *Lactococcus lactis subspecies lactis* ВКПМВ-8558 [Патент 2295563, МПКС12N1/20, А23С9/123, С12Р19/04, С12R1/46, опубл. 20.03.2007 г., бюл. №8].

Поиск новых продуцентов и исследование этих биополимеров является важной задачей современной микробиологии и биотехнологии, особенно в России, поскольку производство ЭПС бактериального происхождения в нашей стране не отвечает постоянно возрастающей в них потребности.

В связи с этим, задачей предлагаемого изобретения является расширение ассортимента экзополисахаридов с целью их практического применения.

Для достижения поставленной задачи предложена культура *Streptococcus thermophilus* ТНВП, полученная нами из ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (г. Москва) и используемая ими в качестве заквасочной культуры.

Клетки *Streptococcus thermophilus* ТНВП сферические или овальные, диаметром 0,5-2,0 мкм, при росте в жидкой среде – в парах или цепочках, иногда удлинённые вдоль оси цепочки (ланцетовидной формы). Неподвижные; неспорообразующие; грамположительные; клетка окружена капсулой, содержащей ЭПС. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы; нуждаются для роста в богатых питательных средах, а также в присутствии 5% CO₂. Метаболизм бродильного типа; образуют в основном лактат, но не газ. Каталазоотрицательные. Обычно лизируют эритроциты, вызывая обесцвечивание и позеленение кровяной среды (α-гемолиз) либо ее полное

просветление (β -гемолиз). Диапазон температуры для роста 25-45°C (оптимум 37°C). На плотных средах формируют мелкие плоские сероватые колонии, на жидких средах дают крошковатый пристеночный и придонный рост.

Культивирование *S. thermophilus* ТНВП проводили при 38°C в течение 48 ч на термостатируемом шейкере-инкубаторе ES-20 (Литва) при 180 об/мин на среде А. Welman с соавт. [Welman A.D., Maddox I. S., Archer R. H. Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*/J. Appl. Microbiol.– 2003. – V. 95. – P. 1200 – 1206]. В состав среды А. Welman входили: лактоза – 20 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, гидролизат казеина – 20 г/л, K_2HPO_4 – 2 г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1 г/л, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 0,05 г/л, цитрат аммония – 2 г/л, ацетат натрия – 5 г/л, твин-80 – 1 мл/л. Исходя из проведенных нами исследований для получения максимальной продукции ЭПС на среде А. Welman, нами было предложено использовать в качестве источника углерода сахарозу.

Выделение полисахарида *S. thermophilus* ТНВП проводили следующим образом. После культивирования бактерий на среде А. Welman, культуральную жидкость центрифугировали при 3000g в течение 30 мин. Осадок биомассы удаляли, а надосадочную жидкость упаривали и к ней добавляли двойной объём 96% этилового спирта. Переосаждение и центрифугирование повторяли 3 раза. Дальнейшую очистку проводили методом гель-фильтрации, используя колонку с носителем Sephadex G-50. Молекулярную массу экзополисахарида определяли методом аналитической гель-хроматографии на колонке молекулярной массы полученного ЭПС использовали аналитическую колонку с носителем Toyopearl – HW-50F. Моносахаридный состав ЭПС определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинке с целлюлозным носителем DC-Alufolien Cellulose толщиной слоя 0,1мм. Относительная вязкость была определена с помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-2. После выделения и очистки полисахарид представлял собой порошок светло-коричневого цвета, без

запаха, не имеющий в своем составе белка, нуклеиновых кислот, клеток продуцента. По физико-химическим свойствам полученный ЭПС сформирован одной нейтральной фракцией с молекулярной массой 20 кДа, имеющей в составе глюкозу и рамнозу, обладающей низкой относительной вязкостью (1,2 мм²/с).

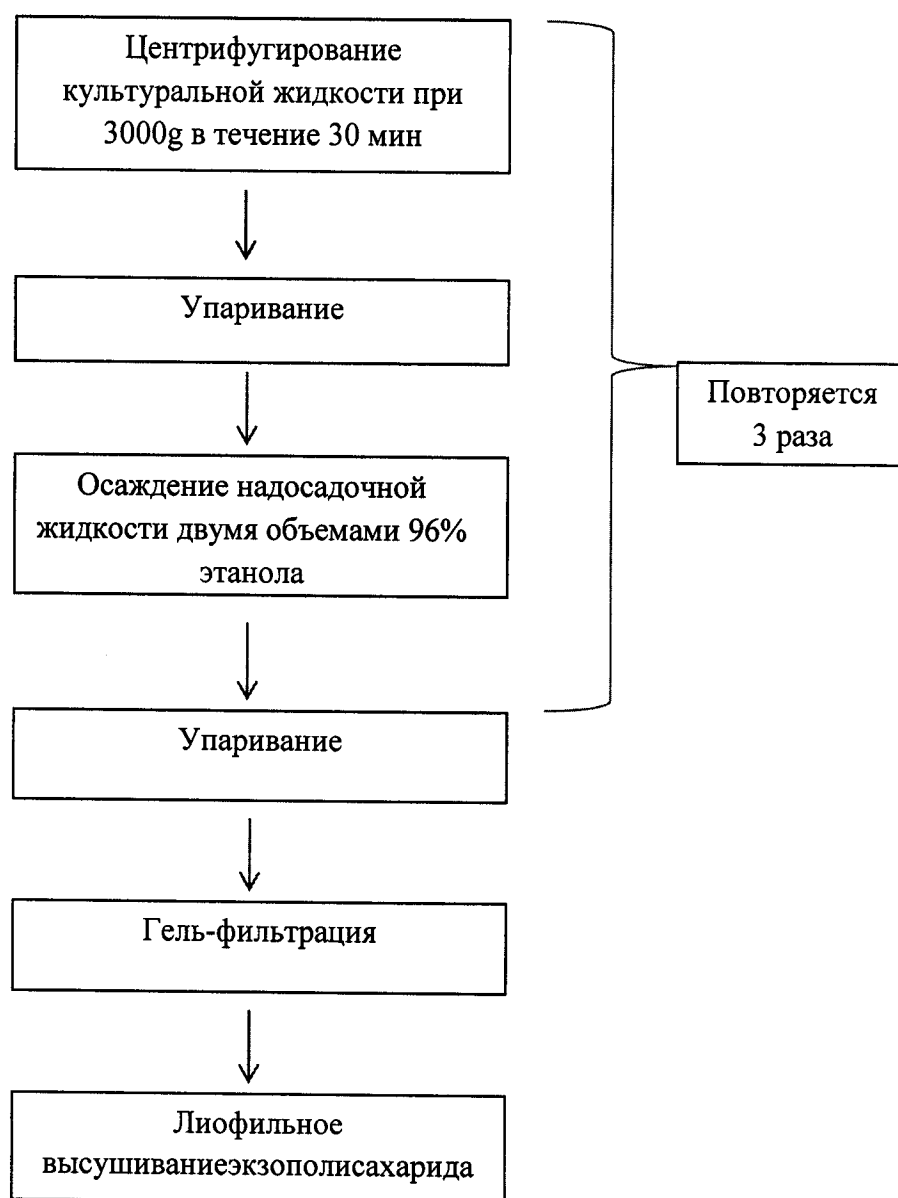
Схема выделения и очистки ЭПС молочнокислой бактерии *S. thermophilus* ТНВП представлена на фигуре.

Техническим результатом изобретения является выделение ЭПС из *Streptococcus thermophilus* ТНВП. Способ выделения и очистки достаточно прост и требует использования распространенного и доступного органического растворителя – 96% этанола. Имеющиеся физико-химические характеристики делают возможным дальнейшее изучение биологических свойств для применения не только в ветеринарии, но и в пищевой промышленности и сельском хозяйстве.

Формула изобретения

Полисахарид *Streptococcus thermophilus*, который получен путем культивирования заквасочной культуры молочнокислой бактерии *Streptococcus thermophilus* ТНВП с неподвижными, неспорообразующими, грамположительными сферическими или овальными клетками, окруженными капсулой, на среде А. Welman, отличающийся тем, что в составе среды в качестве источника углерода используется сахароза, а способ выделения и очистки заключается в том, что культуральную жидкость центрифугируют при 3000g в течение 30 мин, с последующим удалением биомассы и упариванием надосадочной жидкости, добавлением к ней двойного объема 96% этилового спирта (переосаждение и центрифугирование повторяли 3 раза), с дальнейшей очисткой методом гель-фильтрации на колонке с носителем Sephadex G-50, который после выделения и очистки представлял собой порошок светло-коричневого цвета, без запаха и примесей, с молекулярной массой 20 кДа, низковязкий, имеющий только одну нейтральную фракцию, состоящую из глюкозы и рамнозы.

Полисахарид *Streptococcus thermophilus*



Фиг.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201900384

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12P 19/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12P 19/04, C12N 1/20, C08B 37/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	ФОКИНА Н.А. и др. Влияние условий культивирования на продукцию экзополисахарида <i>Streptococcus thermophilus</i> . Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2018, 18(2), с. 179-181, <doi: 10.18500/1816-9775-2018-18-2-179-181>	1
Y	УРЯДОВА Г.Т. и др. Экзополисахариды молочнокислых бактерий и их свойства. I-й Российский Микробиологический конгресс. Материалы конгресса. Пушино, 17-18 октября 2017, с. 131	1
Y	ФОКИНА Н.А. и др. Экзополисахарид <i>Streptococcus thermophilus</i> : условия выделения и свойства. Актуальная биотехнология. 2015, № 3(14), с. 41-42	1
Y	RU 2441910 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "ГОРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ") 10.02.2012, с. 3, строки 34-53	1
A	RU 2664198 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА") 15.08.2018	1

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

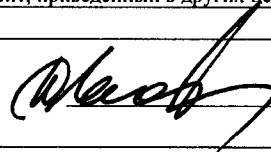
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **18/02/2020**

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин