



(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/20 (2006.01); *C12N 9/0042* (2006.01); *C12R 1/01* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017144570, 19.12.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 19.12.2017

Дата регистрации:
 03.12.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.12.2017

(45) Опубликовано: 03.12.2018 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

117545, Москва, 1-ый Дорожный пр-д, 1, НИЦ
 "Курчатовский институт" - ГосНИИГенетика

(72) Автор(ы):

Калинина Анна Николаевна (RU),
 Борщевская Лариса Николаевна (RU),
 Гордеева Татьяна Леонидовна (RU),
 Синеокий Сергей Павлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" (НИЦ "Курчатовский институт" - ГосНИИГенетика) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: KURRATAA YUN. et.al., Characterization of xylanase activity produced by *Paenibacillus* sp. XJ18 from TNBD Jambi, Indonesia, HAYATI Journal of Biosciences, 2015, v.22. No. 1, p.20-26. RU 2272838 C1, 27.03.2006. RU 2361918 C1, 20.07.2009. RU 2538149 C2, 10.01.2015. RU 2412246 C2, 20.02.2011.

(54) Штамм бактерий *Paenibacillus species* - продуцент ксиланазы

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологической промышленности. Штамм бактерий *Paenibacillus species* X1, обладающий способностью синтезировать ксиланазу, депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов под регистрационным

номером ВКПМ В-13092. Штамм бактерий *Paenibacillus species* ВКПМ В-13092 может быть использован при производстве ферментов. Изобретение позволяет повысить выход ксиланазы. 1 ил., 2 пр.

RU 2 673 971 C1

RU 2 673 971 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/20 (2006.01); *C12N 9/0042* (2006.01); *C12R 1/01* (2006.01)

(21)(22) Application: **2017144570, 19.12.2017**

(24) Effective date for property rights:
19.12.2017

Registration date:
03.12.2018

Priority:

(22) Date of filing: **19.12.2017**

(45) Date of publication: **03.12.2018** Bull. № 34

Mail address:

**117545, Moskva, 1-yj Dorozhnyj pr-d, 1, NITS
"Kurchatovskij institut" - GosNIIgenetika**

(72) Inventor(s):

**Kalinina Anna Nikolaevna (RU),
Borshchevskaya Larisa Nikolaevna (RU),
Gordeeva Tatyana Leonidovna (RU),
Sineokij Sergej Pavlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie "Gosudarstvennyj
nauchno-issledovatel'skij institut genetiki i
selekcii promyshlennykh mikroorganizmov
Natsionalnogo issledovatel'skogo tsentra
"Kurchatovskij institut" (NITS "Kurchatovskij
institut" - GosNIIgenetika) (RU)**

(54) **STRAIN OF BACTERIA PAENIBACILLUS SPECIES - A PRODUCER OF XYLANASE**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology.

SUBSTANCE: invention relates to the microbiological industry. Bacterial strain Paenibacillus species X1, which has the ability to synthesize xylanase, is deposited in the Russian National Collection of Industrial Microorganisms under the registration number

VKPM B-13092. Bacterial strain Paenibacillus species VKPM B-13092 can be used in the production of enzymes.

EFFECT: invention allows to increase the yield of xylanase.

1 cl, 1 dwg, 2 ex

RU 2 673 971 C1

RU 2 673 971 C1

Изобретение относится к отрасли микробиологической промышленности, в частности к производству ферментов, и касается нового штамма бактерий, используемого для получения фермента ксиланазы.

5 Ксиланазы расщепляют ксилан - второй по распространенности природный полимер после целлюлозы, он встречается практически во всех растительных тканях. Ксиланазы представляют большой интерес как в промышленном, так и прикладном биотехнологическом аспекте, их широко применяют в пищевой и кормовой промышленности, в бумажной индустрии и процессах отбеливания и других сферах.

10 Наиболее известны штаммы - продуценты ксиланаз грибного происхождения. Так, известны штаммы грибов *Penicillium verruculosum* ВКМ F-3972D (RU 2361918) и штамм *Aspergillus foetidus* 379-K-5-1 (RU 2549706). Однако, эти микроорганизмы, помимо ксиланаз, продуцируют целый комплекс других ферментов: штамм *Penicillium verruculosum* ВКМ F-3972D - пектиназы, β -глюканазу и ксилоглюканазы, а штамм *Aspergillus foetidus* 379-K-5-1 - пектиназы, целлюлазы, хитиназы, маннаназы и протеазы, 15 что не позволяет использовать эти микроорганизмы при производстве моноферментных препаратов. Недостатками данных штаммов является также большая продолжительность процесса культивирования.

Известны также бактериальные штаммы - продуценты ксиланаз. Так, описан штамм *Bacillus macerans* bs-04, однако он также, помимо ксиланазы, продуцирует пектиназы, 20 протеазы и амилазы (RU 2272838).

Наиболее близким к изобретению по технической сущности и достигаемому результату является штамм *Raenibacillus* sp. XJ18 (НАУАТІ Journal of Biosciences January 2015 Vol. 22 No. 1, p 20-26). Однако уровень продукции ксиланазы этим штаммом очень низок (0.0016 U/mL).

25 Технической задачей изобретения является расширение арсенала штаммов микроорганизмов, продуцирующих ксиланазу.

Поставленная задача решена путем получения бактериального штамма *Raenibacillus* sp X1 - продуцента фермента ксиланазы, способного продуцировать фермент ксиланазу с активностью 20 ед/мл культуральной жидкости за 30 часов культивирования, а также 30 использовать ксилан как единственный источник углерода.

Заявленный штамм выделен в результате скрининга из почв лесной зоны подмосковья.

Штамм депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика (ВКПМ), под регистрационным номером ВКПМ В - 13092.

35 Штамм *Raenibacillus* sp. X1 характеризуется следующими признаками:

Культурально-морфологические признаки

40 При росте на агаризованной LB среде следующего состава (в мас. %): дрожжевой экстракт - 0,5, триптон - 1, NaCl - 1, агар - 2, вода - остальное) штамм в течение 20 часов при 30°C образует выпуклые прозрачные колонии диаметром 0,3-3 мм с неровными краями.

После культивирования в течение 48 часов при 30°C в жидкой среде LB следующего состава (в мас. %): дрожжевой экстракт - 0,5, триптон - 1, NaCl - 1, вода - остальное), штамм образует палочковидные клетки размером 4-5 мкм с эллипсоидной проспорой в раздутом спорангии. Клетки как одиночные, так и собранные в цепочки по 2-4 клетки.

45 Физиолого-биологические признаки

Штамм способен к росту как в аэробных, так и в анаэробных условиях

Штамм *Raenibacillus* sp. X1 способен использовать ксилан как единственный источник углерода и продуцировать фермент ксиланазу с активностью 20 ед/мл культуральной

жидкости за 30 часов культивирования.

Оптимальная температура роста - 28-30°C, оптимальный pH - 7.

Штамм хранят в 10% глицерине при - 70°C в кельвинаторе или парах жидкого азота без потери жизнеспособности в течение 10 лет.

5 В качестве молекулярно-генетической характеристики штамма *Paenibacillus* sp. X1 могут быть использованы результаты ПЦР-фингерпринта (Applied and Environmental Microbiology, Oct, 1999, 4351-4356), представленные на фиг. 1.

Фингерпринт проводили методом полимеразной цепной реакции (PCR) с использованием неспецифических праймеров M13 (линия 1) и 1254 (линия 2).

10 Праймер M13 gaggtggcggttct

режим реакции:

1 цикл

95°C - 3 мин.

39 циклов

15 95°C - 30 сек.

45°C - 30 сек.

72°C - 2 мин.

1 цикл

72°C - 5 мин

20 Праймер 1254 ccgcagcсаа

режим реакции:

1 цикл

95°C - 3 мин.

39 циклов

25 95°C - 30 сек.

48°C - 30 сек.

72°C - 1 мин.

1 цикл

72°C - 5 мин

30 Для контроля величины фрагментов ДНК при электрофорезе использован молекулярный маркер 1kb DNA GeneRuler (Fermentas) (линия 3, размер фрагментов снизу вверх 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 п.н.).

Изобретение проиллюстрировано следующими фигурами графического изображения.

35 Фиг. 1. Фингерпринт штамма *Paenibacillus* sp. X1

Изобретение проиллюстрировано следующими примерами.

Пример 1. Продукция ксиланазы заявляемым штаммом

40 Для получения посевного материала (инокулята) культуру клеток заявляемого штамма выращивают в жидкой среде LB, следующего состава (в мас. %): дрожжевой экстракт - 0,5, триптон - 1, NaCl - 1, вода - остальное, в течение 20 ч при 30°C и 250 об/мин.

Количество посевного материала - 5% от объема среды.

45 Культивирование штамма осуществляют в аэробных условиях в качалочных колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 50 мл жидкой среды следующего состава (в мас. %): дрожжевой экстракт - 0,5, триптон - 1, NaCl - 1, ксилан - 0,5, вода - остальное,

Колбы инкубируют на качалке при 30°C и 200 об/мин, в течение 30 ч. Затем клетки отделяют методом центрифугирования.

Активность ксиланазы в культуральной жидкости определяют по способности

расщеплять ксилан. За единицу активности принимают такое количество фермента, которое в течение 1 мин при температуре 42°C и рН 6,0 освобождает 1 мкмоль редуцирующих Сахаров, эквивалентных 1 мкмоль глюкозы и определяемых методом Сомоджи-Нельсона (А.П. Синицын, А.В. Гусаков, И.М. Черноглазов. Биоконверсия

5 лигноцеллюлозных материалов. Учеб. пособие. М.: Изд-во МГУ, 1995, с. 144-156).

Активность ксиланазы составляет 20 ед/мл культуральной жидкости.

Пример 2 Способность штамма *Baenibacillus* sp.XI к использованию ксилана в качестве единственного источника углерода

10 Клетки штамма *Baenibacillus* sp. X1 инкубируют при 30°C на среде следующего состава (в мас. %): NaNO_3 - 0,1, K_2HPO_4 - 0.1, MgSO_4 - 0.05, KCl - 0.1, дрожжевой экстракт - 0,05, ксилан - 1, агар - 1.5, вода - остальное. Образование колоний наблюдают через 48 часов.

В используемой среде единственным источником углерода является ксилан. Дрожжевой экстракт в количестве 0,05% необходим как источник витаминов и аминокислот.

15 Таким образом, показано, что штамм *Baenibacillus* sp. X1 ВКПМ В-13092 на полной питательной среде способен продуцировать фермент ксиланазу с активностью 20 ед/мл культуральной жидкости за 30 часов культивирования и может быть использован при производстве моноферментного препарата.

20 Важным является также то, что заявляемый штамм может использовать ксилан как единственный источник углерода на минимальной среде.

(57) Формула изобретения

Штамм бактерий *Baenibacillus* species X1 ВКПМ В - 13092 - продуцент ксиланазы.

25

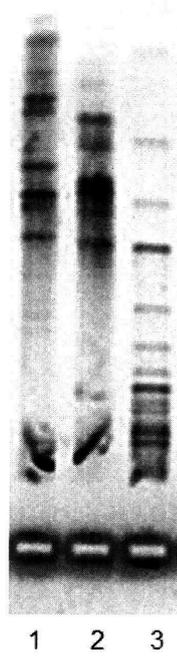
30

35

40

45

Штамм бактерий *Paenibacillus species* — продуцент ксиланазы.



1 2 3

Фиг.1