



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63723 (13) U  
(51) МПК  
C12N 1/20 (2006.01)  
C08B 37/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) КОНСОРЦІЯ БАКТЕРІЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002 І *PSEUDOMONAS SP.* - ПРОДУЦЕНТ ГЛІКОГЕНУ

1

2

(21) u201014885

(22) 13.12.2010

(24) 25.10.2011

(46) 25.10.2011, Бюл.№ 20, 2011 р.

(72) ГОРІШНИЙ МИРОСЛАВ БОГДАНОВИЧ, ГНА-  
ТУШ СВІТЛАНА ОЛЕКСІВНА, МОРОЗ ОКСАНА  
МИХАЙЛІВНА, ЛЕВИЦЬКА ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІ-  
ВНА, ГУДЗЬ СТЕПАН ПЕТРОВИЧ

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИ-  
ТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

(57) Консорція бактерій *Chlorobium limicola* Ya-  
2002 і *Pseudomonas sp.* - продуцент глікогену, що  
задепонована в Депозитарії Інституту мікробіології  
і вірусології НАН України за номером ІМВ К-8.

Корисна модель належить до галузі біології, а саме мікробіології, і може бути використана у біо-технології, медицині харчовій промисловості та сільському господарстві.

Відомий штам *Chlorobium limicola forma thiosulfatophilum* ATCC 17092 - продуцент глікогену (Cork D. J., Garunas R., Sajjad A. *Chlorobium limicola forma thiosulfatophilum*: Biocatalyst in the Production of Sulfur and Organic Carbon from a Gas Stream Containing H<sub>2</sub>S and CO<sub>2</sub>// Appl. Environ. Microbiol.-1983. - V. 45., No. 3. - P. 913-918). Штам пропонують використовувати для промислового отримання органічного вуглецю.

Недоліком штаму є порівняно низький вміст глікогену, не встановлено оптимальні умови для максимального синтезу цього полісахариду.

Найближчим за технічною суттю до запропонованого штаму (прототипом) є штам *Chlorobium thiosulfatophilum* 8327 (Sirevag R., Ormerod J. *Synthesis, storage and degradation of polyglucose in Chlorobium thiosulfatophilum* II Arch. Microbiol.-1977. - V. 111. - P. 239-244). Встановлено, що зелені сіркобактерії за наявності додаткового вуглецевого субстрату і світлової енергії та азотному і фосфору голодуванні синтезують глікоген, який нагромаджується внутрішньоклітинно у вигляді розеткоподібних гранул. Рівень глікогену у клітинах *Chlorobium thiosulfatophilum* 8327, який визначали за вмістом глюкози глікозооксидазним способом, становив 57 мг/г клітин.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити одержання продуцента глікогену шляхом використання зелених сіркобактерій, що

дасть змогу розширити групу організмів для отримання цього продукту та підвищити рівень його синтезу.

Поставлена задача вирішується тим, що консорція бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 і *Pseudomonas sp.* є продуцентом глікогену.

Консорція задепонована за номером ІМВ К-8 і зберігається в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. Заболотного НАН України і характеризується такими ознаками.

Культурально-морфологічні ознаки.

Консорція бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 і *Pseudomonas sp.* виділена з води озера "Яворівське". *Chlorobium limicola* Ya-2002 - анаеробна грамнегативна бактерія, спор не утворює, при мікроскопуванні клітини овальної форми, поодинокі та з'єднані у ланцюжки, розміром 0,3-1,1×0,4-3,0мкм, є домінуючим компонентом консорції. *Pseudomonas sp.* - аеробні грамнегативні бактерії, при мікроскопуванні клітини мають вигляд паличок розмірами 0,5-0,7×1,5-2,5мкм. Утворення консорції з *Pseudomonas sp.* відрізняє досліджувані зелені сіркобактерії *Chlorobium limicola* від інших споріднених штамів.

Спосіб та умови культивування консорції.

Консорцію бактерій вирощують на середовищі GSB (Overmann J. *The family Chlorobiaceae* [Electronic resource] / J. Overmann, M. Dworkin // *The Prokaryotes : An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd ed. New York : Springer-Verlag, 2000. - Available from : <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>) такого складу, г/л::

(19) UA (11) 63723 (13) U

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,3;  
 $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,34;  
 $\text{KCl}$  - 0,34;  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,15;  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5;

дистильована вода – до 1 л.

До стерильного середовища додають наступні стерильні розчини:

10 %  $\text{NaHCO}_3$  - 15 мл;

1M  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  - 2,5 мл;

2 мг вітаміну  $\text{B}_{12}$  розчиненого у 100 мл води - 1мл;

мікроелементи – 1 мл (25 %  $\text{HCl}$  - 10 мл,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 2 г (сірчанокисле залізо розчиняють в соляній кислоті),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 190 мг,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 100 мг,  $\text{ZnCl}_2$  - 70 мг,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 36 мг,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 24 мг,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 6 мг,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 2мг);  
 10 % розчин натрію піровинограднокислого - 10 мл;

10 % розчин натрію оцтовокислого - 10 мл;

pH 6,7-6,8.

Синтез біомаси консорцією бактерій IMB K-8 на цьому середовищі складає 5-6 г/л. Температурний оптимум культивування 28-30 °C, pH 6,8-7,0, інтенсивність освітлення 40 лк, довжина хвилі 700-800 нм. Консорція бактерій зберігається у темряві при температурі  $6 \pm 2$  °C на вищезгаданому середовищі.

Фізіологічні ознаки.

При вирощуванні культури на різних поживних середовищах як донори водню і джерело вуглецю

використовує гідроген сульфід та вуглекислоту. Клітини містять бактеріохлорофіли c, d та каротиноїди (хлоробактерин та ізореніератин). У процесі детоксикації сірководню за сприятливих умов культивування та оптимального складу середовища глюкоза у клітинах перетворюється у глікоген, який нагромаджується як запасна речовина. Для високого виходу продукту забезпечують азотне та фосфорне голодування, а також високий вміст ацетату і пірувату в середовищі.

Екстракцію глікогену здійснюють із висушених ацетоном бактерійних клітин, які обезжирюють киплячою сумішшю хлороформу та метанолу (2:1) та киплячим етиловим ефіром. Клітини висушують та екстрагують глікоген 30 % розчином калію гідроксиду. Додають 95 % етанол і осад глікогену відділяють центрифугуванням. Для очищення глікоген розчиняють у воді та осаджують при 0 °C льодяною оцтовою кислотою, осад промивають етанолом та ацетоном. Для кількісного визначення вмісту глікогену у клітинах бактерій його гідролізують до глюкози 1 н сірчаною кислотою. Вміст глюкози встановлюють глюкозооксидазним способом при довжині хвилі 450 нм.

Вміст глікогену становить до 120 мг/г клітин, що вдвічі перевищує рівень біосинтезу глікогену штамом 8327 *Chlorobium limicola* forma thiosulfatophilum. Вищезгадані характеристики консорції бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 і *Pseudomonas* sp. 1MB K-8 підтверджують досягнення передбачуваного технічного результату.