

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01N 63/20 (2025.01); A01P 15/00 (2025.01); C12N 1/20 (2025.01)

(21)(22) Заявка: 2024125559, 30.08.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.08.2024Дата регистрации:
24.06.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.08.2024

(45) Опубликовано: 24.06.2025 Бюл. № 18

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Шевцова Ирина Владимировна

(72) Автор(ы):

Ляховченко Никита Сергеевич (RU),
Селезнев Александр Олегович (RU),
Соляникова Инна Петровна (RU),
Чепурина Анна Андреевна (RU),
Ефимова Виктория Алексеевна (RU),
Ахапкина Софья Сергеевна (RU),
Выросткова Алина Сергеевна (RU),
Никишин Илья Андреевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2812461 C1, 30.01.2024. BARICZ
A., TEBAN A., CHIRIAC C.M., et al.
"Investigating the potential use of an Antarctic
variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling
antimicrobial resistance in a One Health
approach". Sci Rep 8, article number: 15272 (2018),
15 October 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6>. RU 2580105 C2, 10.04.2016. (см. прод.)(54) Композиция с бактериостатической активностью на основе пигмента микробного происхождения виолацеина (violacein) из биомассы *Janthinobacterium lividum*

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, микробиологии и может быть использовано в сельском хозяйстве и растениеводстве. Композицию на основе пигмента микробного происхождения виолацеина, полученного из биомассы *Janthinobacterium lividum*, содержащей 28,4 г/л пигмента виолацеина в 99%-ном диметилсульфоксиде, применяют вкачестве бактериостатического средства в отношении актинобактерии *Clavibacter michiganensis*. Предлагаемое изобретение расширяет арсенал средств контроля развития *Clavibacter michiganensis*, обладает высокой бактериостатической активностью и безопасно для сельскохозяйственных растений. 3 ил., 1 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

CN 104293703 A, 21.01.2015. JP 2015105264 A, 08.06.2015.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A01N 63/20 (2020.01)
A01P 15/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A01N 63/20 (2025.01); A01P 15/00 (2025.01); C12N 1/20 (2025.01)

(21)(22) Application: **2024125559, 30.08.2024**

(24) Effective date for property rights:
30.08.2024

Registration date:
24.06.2025

Priority:
(22) Date of filing: **30.08.2024**

(45) Date of publication: **24.06.2025** Bull. № 18

Mail address:
**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Shevtsova Irina Vladimirovna**

(72) Inventor(s):
**Liakhovchenko Nikita Sergeevich (RU),
Seleznev Aleksandr Olegovich (RU),
Solianikova Inna Petrovna (RU),
Chepurina Anna Andreevna (RU),
Efimova Viktoriia Alekseevna (RU),
Akhapkina Sofia Sergeevna (RU),
Vyrostkova Alina Sergeevna (RU),
Nikishin Iliia Andreevich (RU)**

(73) Proprietor(s):
**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

**(54) COMPOSITION WITH BACTERIOSTATIC ACTIVITY BASED ON PIGMENT OF MICROBIAL ORIGIN
VIOLACEIN FROM BIOMASS OF JANTHINOBACTERIUM LIVIDUM**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, microbiology and can be used in agriculture and plant growing. Composition based on a pigment of microbial origin violacein, obtained from the biomass of *Janthinobacterium lividum*, containing 28.4 g/l of the pigment violacein in 99 % dimethyl sulphoxide, is used

as a bacteriostatic agent with respect to actinobacteria *Clavibacter michiganensis*.

EFFECT: present invention widens the range of agents for controlling development of *Clavibacter michiganensis*, has high bacteriostatic activity and is safe for agricultural plants.

1 cl, 3 dwg, 1 tbl, 2 ex

RU 2 842 278 C1

RU 2 842 278 C1

Изобретение относится к области биотехнологии, микробиологии и может быть использовано в сельском хозяйстве и растениеводстве, а именно для снижения развития возбудителей заболеваний растений.

5 Пигмент сине-фиолетового цвета виолацеин (violacein), или 2-индолинон, 3-(2-(5-гидроксииндол-3-ил)-5-оксо-2-пирролин-4-илиден)-(е)-3-(5-(5-Гидрокси-1Н-индол-3-ил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-пиррол-3-илиден) индолин-2-он, с молекулярной массой 343,3 г/моль, является производным триптофана, относится к классу гидроксиндолов, и не растворим в воде, но хорошо растворяется в органических жидкостях [PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 11053, Violacein; [cited 2024 Aug. 10 30]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Violacein>].

Известно, что виолацеин - это пигмент, обладающий антибактериальными, противогрибковыми, антипротозойными и противоопухолевыми свойствами. Он играет роль бактериального метаболита, противоопухолевого агента, индуктора апоптоза, антибактериального и противогрибкового средства. В научной литературе описаны антибактериальные и антимикотические свойства: виолацеин проявлял антимикробную активность в отношении 21 штамма бактерий, среди которых менее восприимчивыми оказались пять грамотрицательных штаммов и один штамм *Bacillus subtilis*; пигмент проявлял эффективность в отношении такого фитопатогенного гриба, как *Rosellina* 15 *pesatrig*, который является возбудителем белой корневой гнили шелковицы; антимикобактериальные свойства виолацеина в отношении *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (возбудителя туберкулеза) были сопоставимы с эффективностью химиотерапевтического противотуберкулезного средства [Durán Nelson; Giselle Z. Justo; Carmen V. Ferreira; Patrícia S. Melo; Livia Cordi; Dorival Martins, Violacein: properties and biological activities // Biotechnology and applied biochemistry. - 2007. - V. 48. - №. 3. - P. 127-133. 10 г. <https://doi.org/10.1042/BA20070115>].

В патенте RU 2580105 (опубл. 10.04.2016) описаны биоактивные композиции и метаболиты *Chromobacterium*. Виолацеин в данном патенте позиционируется как инсектицид в отношении личинок совки, которому соответствует параметр LC50, равный 30 $7 \cdot 10^{-6}$ микрограммов на лунку в лабораторных условиях.

Существенным ограничением применения виолацеина в качестве компонентов композиций препаратов является его нерастворимость в воде. Ранее, в патенте RU 2787118 (опубл. 28.12.2022) предложен способ получения нанокапсул пигмента виолацеина. Недостатком данного способа является ограничение концентрации компонентов, так как при высоком содержании оболочки повышается вязкость и применение такой композиции затруднено.

В патентной литературе не выявлено примеров использования пигмента виолацеина (violacein) синтезируемого штаммом *Janthinobacterium lividum* для получения композиций с бактериостатической активностью в отношении тест-культуры микроорганизма - возбудителя заболевания растений - *Clavibacter michiganensis* - с диметилсульфоксидом.

Среди композиций с бактериостатической активностью, в патентной литературе существуют примеры. Так, в работе Никифоровой Т.И., SU 1635510 А1, приводятся сведения о химическом соединении N-(3-Триэтилсилилпропил)-N'-(2-винилоксиэтил) тиомочевина формулы $(C_2H_5)_3Si(CH_2)_3NHC(S)NHCH_2CH_2OCH=CH_2$, обладающая 45 бактериостатической активностью, предварительно разведенного в диметилсульфоксиде. Авторы утверждают, что смесь активна в отношении золотистого стафилококка. Недостатком предложенной композиции является отсутствие сведений о возможности применения в отношении возбудителей заболеваний растений, а также, наличия свойства

накапливаться в окружающей среде.

Известна композиция, обладающая бактериостатической и бактерицидной активностью против спор бактерий и вегетативных клеток, и способ обработки ею продуктов питания, которая создана на основе метаболитов пропионово-кислых бактерий в сочетании с лантибиотиком, литическим ферментом и органической кислотой или ее солью, описанная в патенте RU 2306774 (опубл. 27.09.2007). Авторами приводятся сведения о том, что композиция обладает антибактериальной активностью в отношении ряда тест-культур и может быть использована в пищевой промышленности. Недостатком этой композиции является высокая стоимость, относительно средств защиты растений. Кроме того, высокая активность может способствовать снижению нормальной почвенной микрофлоры, что потенциально опасно из-за риска развития дисбактериоза.

Технической задачей предлагаемого изобретения является расширение арсенала средств контроля развития нежелательной микрофлоры путем разработки композиции с бактериостатической активностью на основе пигмента микробного происхождения виолацеина (violacein) из биомассы *Janthinobacterium lividum*, активной в отношении тест-культуры микроорганизма - возбудителя заболевания растений *Clavibacter michiganensis*.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является техническое решение, выраженное в создании композиции с бактериостатической активностью на основе пигмента микробного происхождения виолацеина (violacein) из биомассы *Janthinobacterium lividum* в отношении актинобактерии *Clavibacter michiganensis*. Композиция с бактериостатической активностью на основе пигмента микробного происхождения виолацеина (violacein) из биомассы *Janthinobacterium lividum* может применяться в сельском хозяйстве и растениеводстве для снижения темпов развития возбудителей заболеваний растений.

Получение композиции на основе пигмента микробного происхождения виолацеина (violacein) и 99% диметилсульфоксиде

Композицию на основе пигмента виолацеина получают экстракцией изопропиловым спиртом из биомассы *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D, полученной центрифугированием. Общая последовательность процедур представлена на фигуре 1:

1. активируют культуру методом посева штрихом микробиологической петлей, с использованием твердой питательной среды составом 10,0 г/л пептона, 20,0 г/л агара микробиологического, а остальное вода;
2. получают 200 мл инокулята *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D в результате культивирования в течение 48 часов, в жидкой питательной среде составом 10,0 г/л пептона и вода, при температуре 25°C, pH = 7,0, и с перемешиванием 150 об/мин;
3. весь объем полученного инокулята *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D по пункту 3, вносят в заранее подготовленную ёмкость биореакторной системы, содержащей 7,0 л стерильной жидкой питательной среды составом 10,0 г/л пептона и воды, pH = 7,0;
4. *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D культивируют в течение 72 часов при 25°C, с перемешиванием 300 об/мин, pH = 7,0, и с аэрацией 3,0 л/мин;
5. выросшую культуру по пунктам 3 и 4, сливают из ёмкости биореактора в заранее подготовленную стерильную ёмкость-приёмник, и получают биомассу *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 минут;
6. после центрифугирования в соответствии с пунктом 5, надосадочную жидкость сливают, а осадок биомассы *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D суспендируют в 1000 мл изопропилового спирта;

7. полученную суспензию перемешивают при 150 об/мин в течение 12 часов для лучшей экстракции пигмента виолацеина из биомассы *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D;

8. смесь, полученную по пункту 7, фильтруют и концентрируют в вакууме с использованием роторного испарителя, при температуре 80°C, до 100-150 мл конечного объема;

9. полученный концентрат смешивают со стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:10. Пигмент из полученной смеси осаждают центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 минут;

10. после п. 9, надосадочную жидкость сливают и осажденный пигмент суспендируют в дистиллированной воде, рН = 7,0, и повторно центрифугируют при условиях, приведенных в п.9., для смыва остатков компонентов питательной среды;

11. взвешивают полученную массу для оценки концентрации пигмента;

12. получают композицию массы пигмента в 200-300 мл 99% диметилсульфоксиде, растворяя осадок, полученный в результате п. 10 и 11;

13. оценивают содержание пигмента в 1 мл спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 525$ нм;

14. Идентификацию пигмента в композиции проводят с помощью регистрации ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с помощью спектрометра ядерного магнитного резонанса, в условиях подавления воды и с использованием последовательности WET.

Оценка бактериостатической активности полученной композиции на основе пигмента микробного происхождения виолацеина (violacein в отношении тест-культуры микроорганизма - возбудителя заболевания растений:

1. оценивают бактериостатическую активность полученной фракции в отношении тест-культуры микроорганизма качественным методом. Для этого, раствор пигмента виолацеина в диметилсульфоксиде наносят на стерильный бумажный диск (диаметром 10 мм) и размещают в чашке Петри на плотную питательную среду в составе пептон - 10,0 г/л и агар-агар - 20,0 г/л, а остальное - вода. Повторность - не менее 3-х. В качестве контроля действия растворителя используют водный раствор диметилсульфоксиде без пигмента виолацеина в соответствующих концентрациях.

2. оценивают бактериостатическую активность полученной фракции в отношении тест-культуры микроорганизма количественно, с использованием параметра степени подавления удельного прироста культуры. Для этого, суточную тест-культуру микроорганизма суспендируют в стерильном растворе 0,9% NaCl, и пассируют в 200 мл питательной среды по 100 мкл суспензии. Фракцию пигмента виолацеина в диметилсульфоксиде вносят в количестве 0,15% от объема среды (об./об.). В качестве контрольного варианта используют посеы тест-культуры микроорганизма без исследуемых растворов, а для контроля действия растворителя - диметилсульфоксид, разбавленный в тех же соотношениях, что и оцениваемая фракция.

После посева измеряют исходную оптическую плотность при длине волны $\lambda = 600$ нм.

Посевы инкубируют при перемешивании 150 об/мин в течение 24 часов и каждые 4 часа измеряют оптическую плотность. Бактериостатическую активность оценивают по степени ингибирования удельного прироста оптической плотности культуры на 24 час инкубации по измененной формуле:

$$IR = \left(\frac{R_K - R_0}{R_K} \right) \cdot 100\%$$

где R_k - удельный прирост ОП при $\lambda = 600$ нм в контрольном варианте, а R_o - в опытном, и рассчитывают, как:

$$R = \frac{ОП_1 - ОП_0}{ОП_0},$$

где $ОП_0$ - усредненная оптическая плотность в начальный момент культивирования, а $ОП_1$ - на 24 час инкубации.

Пример 1. Получение композиции с бактериостатической активностью на основе пигмента микробного происхождения виолацеина (violacein) из биомассы *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D:

1. получают активную культуру *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D методом посева штрихом микробиологической петлей, на твердой питательной среде, составом 10,0 г/л пептона, 20,0 г/л агара микробиологического, а остальное вода. Посевы инкубируют при 25°C в течение 48 часов;

2. получают 200 мл инокулята *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D в результате культивирования активной культуры в течение 48 суток, в жидкой питательной среде составом 10,0 г/л пептона и вода, рН = 7,0, при температуре 25°C, и с перемешиванием 150 об/мин;

3. весь объем полученного инокулята *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D по пункту 2, в стерильных условиях вносят в заранее подготовленную ёмкость биореакторной системы, содержащей 7,0 л стерильной жидкой питательной среды составом 10,0 г/л пептона и воды, рН = 7,0;

4. культивируют в течение 3 суток при 25°C, рН = 7,0, подаче воздуха 4 л/мин и перемешивании 400 об/мин;

5. полученную по п. 4 культуру, осаждают центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут, сливают надосадочную жидкость, суспендируют в стерильном растворе 0,9% NaCl, и повторно центрифугируют в тех же условиях, для смыва компонентов питательной среды;

6. осадок заливают изопропиловым спиртом в расчете 100 мл на 10 г биомассы. Смесь перемешивают в течении 12 часов, фильтруют в вакууме с использованием фильтра с диаметром пор 0,22 мкм. Фильтрат повторно заливают изопропиловым спиртом и повторяют процедуру до осветления осадка;

7. смесь, полученную по пункту 7, фильтруют и концентрируют в вакууме с использованием роторного испарителя, при температуре 80°C, до 100 мл конечного объема;

8. полученный концентрат по п. 7 смешивают со стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:10. Пигмент из полученной смеси осаждают центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 минут;

9. надосадочную жидкость сливают и осажденный пигмент суспендируют в дистиллированной воде, рН = 7,0, и повторно центрифугируют при условиях, приведенных в п.8., для смыва остатков компонентов питательной среды;

10. взвешивают полученную массу для оценки выхода пигмента;

12. получают фракцию массы пигмента в 200 мл 99% диметилсульфоксиде, растворяя осадок, полученный в результате п. 8, 9 и 10;

13. оценивают содержание пигмента в 1 мл спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 525$ нм. В результате получают около 28,4 г/л пигмента виолацеина в 99% диметилсульфоксиде;

14. спектр ^1H ЯМР образца, зарегистрированный в условиях подавления воды с использованием последовательности WET, показывает резонансные сигналы в области 6,7-9,0 ppm, что приведено на фигуре 2: ^1H WET 1D ЯМР спектр водного экстракта пигмента *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D.

5 Основные сигналы позволяющие идентифицировать вещество как виолацеин (violacein) приведены в таблице 1.

Таблица 1. Ключевые сигналы, позволяющие идентифицировать вещество как виолацеин (violacein).

Положение	Сигнал
2	8.03 синглет
5	7.20 ppm, мультиплет
7	6.77 ppm дуплет, J 8.7 Hz
8	7.33 ppm дуплет J 8.9 Hz
13	7.53 синглет
15	8.89 ppm дуплет J 8.1 Hz
20	6.94 ppm триплет J 9.0 Hz
21	7.19 ppm мультиплет
22	6.82 ppm дуплет J 8.6 Hz

10 Пример 2. Оценка бактериостатической активности полученной композиции на основе пигмента микробного происхождения виолацеина (violacein) в отношении тест-культуры микроорганизма - возбудителя заболевания растений, на примере *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402:

15 *Clavibacter michiganensis* - это грамположительная актинобактерия, которая вызывает заболевания множества сельскохозяйственных культурных растений, среди которых наиболее значимое - увядание томатов. При этом, растения, пораженные клавибактером проявляют различные симптомы в зависимости от возраста растения, сорта, условий окружающей среды, и активности самого возбудителя [Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B. and Yuan, Z.-C. (2018), *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Molecular Plant Pathology*, 19: 2036-2050. <https://doi.org/10.1111/mpp.12678>].

20 Клавибактер находится в списках микроорганизмов, подлежащих экспортному контролю. В работе Wang, Y. с соавторами описано, что при поражении семян патоген непосредственно внедряется в сосудистую ткань проростков томатов и вызывает увядание растения. В случае заражения через устьица, включая гидатоды, возбудитель вызывает некроз краев листьев и их частичное увядание. Согласно тому же источнику, на ранней стадии заражения растение характеризуется односторонним увяданием, или проявляет эффект обожженного края листа сначала с нижней стороны, а затем с обеих сторон. По мере прогрессии заболевания, увядает весь саженец. На поздней стадии, пораженный стебель расщепляется и образуются язвы с коричневыми и полыми сосудистыми пучками.

25 Следует отметить, что одностороннее увядание листьев и растений в фазе заражения от ранней до средней - уникальное явление для бактериального рака томатов - клавибактериоза [Wang, Y.; Deng, S.; Li, Z.; Yang, W. *Advances in the Characterization of the Mechanism Underlying Bacterial Canker Development and Tomato Plant Resistance. Horticulturae* 2022, 8, 209. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030209>]. Заражение и колонизация плода томата клавибактером может осуществляться на всех стадиях роста, включая цветение и завязывание плода. Однако, согласно Wang Y. с соавторами, случаев заражения цветков томатов не было зафиксировано. В том же источнике приводятся сведения о том, что контаминация плодов играет более важную роль чем поражение

стебля:

1. оценивают бактериостатическую активность композиции, полученной по примеру 1, качественным методом. Для этого, раствор пигмента виолацеина в диметилсульфоксиде наносят на стерильный бумажный диск (диаметром 10 мм) и размещают в чашке Петри на плотную питательную среду в составе пептон - 10,0 г/л и агар-агар - 20,0 г/л, а остальное - вода. Повторность - не менее 3-х. В качестве контроля действия растворителя используют водный раствор диметилсульфоксида без пигмента виолацеина в соответствующих концентрациях;

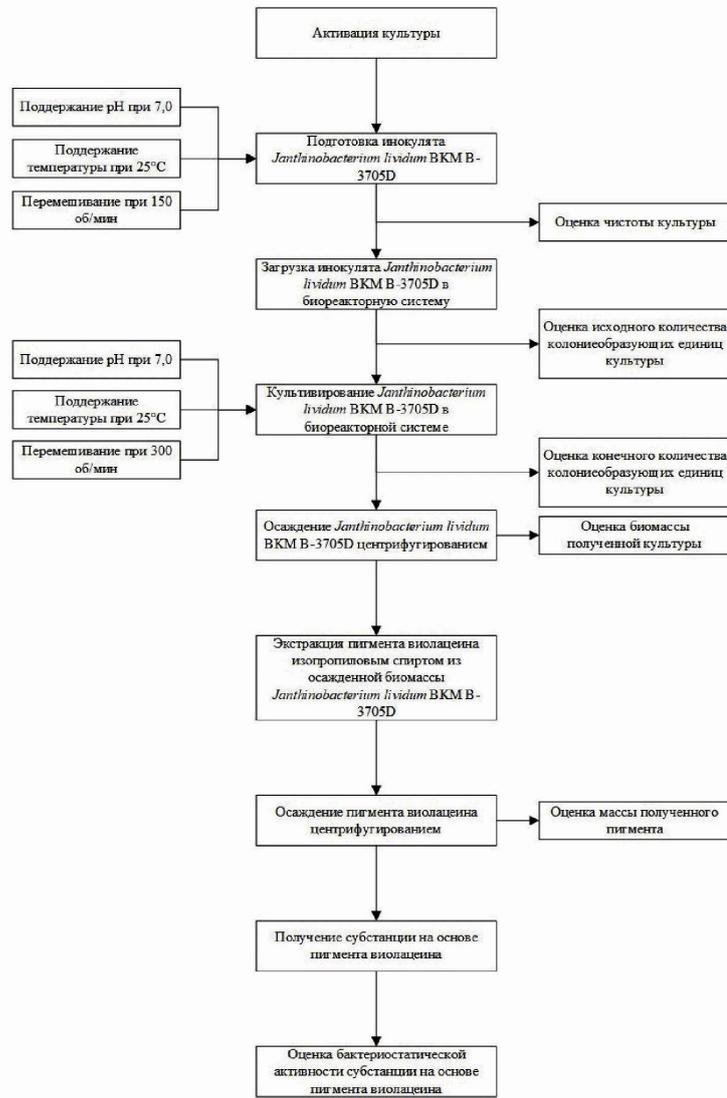
2. отмечают, что в ходе качественной оценки бактериостатической активности композиции виолацеина в диметилсульфоксиде, в отношении тест-культуры *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402, смесь снижает рост, тогда как чистый диметилсульфоксид, разведенный в той же концентрации, не оказал эффекта в отношении штамма;

15. отмечают бактериостатическую активность композиции виолацеина в 99% диметилсульфоксиде оценивают количество по степени подавления удельного прироста тест-культуры *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402 которая составила 39,7%, относительно контрольного варианта, а для самого растворителя - 25,5%. Значения представлены на фигуре 3: удельный прирост *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402 в чистой культуре без исследуемых вариантов (1), в присутствии диметилсульфоксида (2) и композиции виолацеина и диметилсульфоксида.

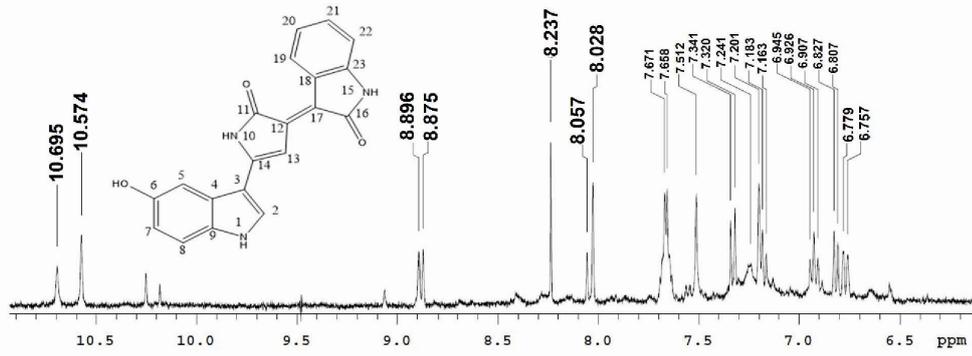
20 Таким образом получают композицию с бактериостатической активностью на основе пигмента микробного происхождения виолацеина (*violacein*) из биомассы *Janthinobacterium lividum* активную в отношении тест-культуры микроорганизма - возбудителя заболевания растений, в итоге задача изобретения решена.

(57) Формула изобретения

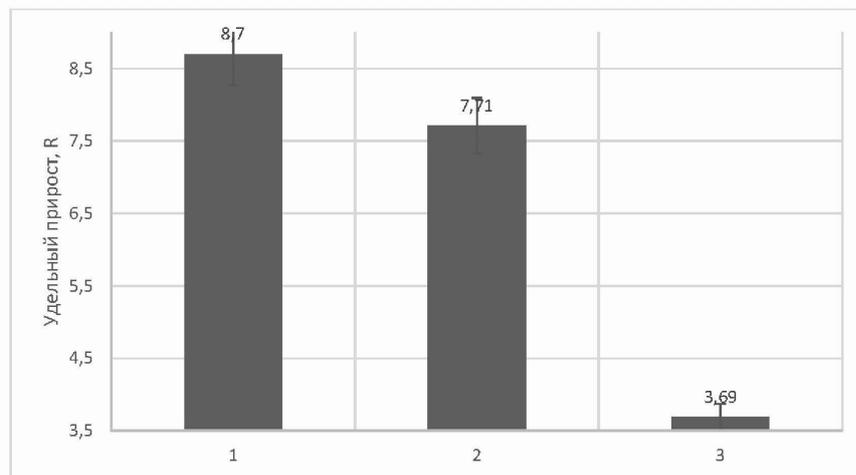
25 Применение композиции на основе пигмента микробного происхождения виолацеина, полученного из биомассы *Janthinobacterium lividum*, содержащей 28,4 г/л пигмента виолацеина в 99%-ном диметилсульфоксиде, в качестве бактериостатического средства в отношении актинобактерии *Clavibacter michiganensis*.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3