



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42865 (13) C2

(51) 7 C12R1:125, C12P1/04, C07K14/32

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ *Bacillus subtilis* - ПРОДУЦЕНТ ПОЗАКЛІТИННОГО ЛЕКТИНУ ЗІ СПЕЦИФІЧНІСТЮ ДО N-АЦЕТИЛНЕЙРАМІНОВОЇ ТА D-ГЛЮКУРОНОВОЇ КИСЛОТ

(21) 98116100

(22) 18.11.1998

(24) 15.11.2001

(46) 15.11.2001, Бюл. № 10, 2001 р.

(72) Підгорський Валентин Степанович, Коваленко
Емма Олександрівна, Гетьман Катерина Іллівна

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ.
Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАН УКРАЇНИ, UA

(56) Патент України № 1791, 20.10.1993

(57) Штам *Bacillus subtilis* 668 IMB, депонований в
Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології
НАН України за № В-7014, - продуцент позаклітин-
ного лектину зі специфічністю до N-ацетил-
нейрамінової та D-глюкуронової кислот.

Винахід відноситься до мікробіологічної про-
мисловості, а саме: одержання сапрофітного шта-
му бацил - продуцента позаклітинного лектину,
специфічного до N-ацетилнейрамінової та D-глю-
куронової кислот, який використовується, як висо-
кочутливий аналітичний реагент при виділенні та
вивченні, сіаловмісних біополімерів, а також меди-
каментозний засіб для діагностики, профілактики
та лікування імунodefіцитів різної етіології [2].

В останній час вуглеводзв'язуючі білки-
лектини викликають підвищений інтерес у зв'язку з
тим, що вони грають провідну роль в процесі біо-
логічного впізнання, мають широкий спектр біо-
логічної активності та застосовуються в різних га-
лузях хімії, біології та медицини [1]. Сфери вико-
ристання лектинів постійно розширюються, але
часто обмежуються доступністю та вартістю дже-
рел виділення [1]. На цей час є також великим де-
фіцит лектинів з вуглеводною специфічністю, яка
рідко зустрічається, а саме: до фруктози, сіалових
та уронових кислот, оліго-цукрів [1]. Промисловий
випуск сіалоспецифічних лектинів не налагоджено
в жодній країні.

Нами вперше встановлена здатність сапрофі-
тних культур спороутворюючих аеробних бактерій
роду *Bacillus* синтезувати та виділяти в середови-
щі росту лектини .зі специфічністю до сіалових та
уронових кислот [2].

Прототипом даного винаходу є бактерійний
штам *B. subtilis* 316М. (Патент України № 1791,
20.10.1993). Недоліком цього штаму є те, що він
продукує позаклітинний лектин з низькою спорід-
неністю до N-ацетилнейрамінової кислоти і відсут-
ністю здатності розпізнавати D-глюкуронову кис-
лоту.

Суть винаходу є розширення арсеналу джерел
виділення лектинів з унікальною специфічністю.

В основу винаходу поставлена задача одер-
жання сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* 668 IMB
- продуцента позаклітинного лектину з великою
спорідненістю до N-ацетилнейрамінової та D-глю-
куронової кислот шляхом культивування його на
поживних середовищах з різними вуглеводами в
якості основних джерел вуглецю.

Штам ізольований із шлунково-кишкового
тракту здорового теляти, депонований в Депози-
тарії Інституту мікробіології і вірусології НАН Укра-
їни за № В-7014.

Штам має наступну характеристику.

Штам зберігають на косяках з середовищем
Громико при кімнатній температурі; строк пересіву
2-3 місяці [3].

Культурально-морфологічні ознаки.

Через 21 годину росту на середовищі Громико
при температурі 37°C виявляються прямі паличко-
подібні клітини 3,1×0,9 мкм, розміщені одиноко,
попарно, чи в коротких ланцюжках. Спори еліпсої-
дні, в клітині розташовані центрально. На м'ясо-
пептонному агарі утворює складчасті колонії не-
правильної форми дрібнозернистої консистенції,
матові, білого кольору, краї колоній суцільні.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

Відношення до джерел вуглецю.

Культура ферментує глюкозу, галактозу, кси-
лозу, арабінозу і маннітол з утворенням кислоти,
гідролізує крохмаль.

Відношення до джерел азоту.

Редукує - нітрати в нітріти, гідролізує желатин,
казеїн, не гідролізує сечовину, тирозин, феніл-
аланін.

Штам нетоксичний, непатогенний для тепло-
кровних тварин.

Оптимальна температура вирощування - 37°C,
рН 6,8-7,0.

(19) UA (11) 42865 (13) C2

Приклад 1

Штам культивують при температурі 37°C, pH 6,8-7,0 в колбах Ерленмейера з робочим об'ємом 100 мл періодичним способом на середовищі Гаузе такого складу, г/л: бульон Хотінгера - 30 мл; пептон - 5,0; NaCl - 5,0; глюкоза - 10,0 /контроль/. Середовище інокують суспензією 24-годинної культури штаму із розрахунку 1 об.%. Протягом всього процесу вирощування швидкість перемішування підтримують 160 об/хв.

По закінченню процесу від культуральної рідини центрифугуванням відділяють клітини, а культуральну рідину використовують для одержання лектину.

При вирощуванні штаму на контрольному середовищі одержано позаклітинний лектин зі специфічністю до похідних глюкози, галактози, а також до фруктозо-1,6-дифосфату (таблиця). Найбільш виражена спорідненість відмічена для N-ацетилнейрамінової і D-глюкуронової кислот /мінімальні інгібуючі дози 1,9 мМ/.

Приклад 2

Умови вирощування штаму, як в прикл. 1, за винятком того, що джерелом вуглецю є галактоза 10 г/л.

При заміні основного вуглеводу в контрольному середовищі на еквівалентну кількість галактози

спорідненість лектину до N-ацетилнейрамінової і D-глюкуронової кислот збільшується у два-чотири рази і їх мінімальні інгібуючі дози складають 0,5 мм і 0,9 мМ, відповідно (табл.).

Приклад 3

Умови вирощування штаму, як в прикл. 1, за винятком того, що в середовище вводять лактозу як джерело вуглецю.

При введенні дисахариду лактози (галактоза-глюкоза) в середовище росту відмічається аналогічна, як на середовищі з галактозою, чутливість лектину до D-глюкуронової кислоти (мінімальна інгібуюча доза дорівнює 0,9 мМ), але інгібуюча доза N-ацетилнейрамінової кислоти значно підвищується (3,7 мМ).

Джерела інформації

1. Лу닌 М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины / Львов: Вища школа, 1981. - 150 с.

2. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А. Лектины бактерий / Киев: Наукова думка, 1992, - 203 с.

3. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных. Киев, АН УССР, Минздрав УССР, 1983. - 49 с.

Таблиця

Вуглеводна специфічність штаму *Bacillus subtilis* 668 IMB на середовищі з різними вуглеводами

Вуглеводи в середовищі	Мінімальні інгібуючі концентрації вуглеводів /мМ/						
	D-галактозамін	D-глюкозамін	D-глюкуронова кислота	Фосфоглюконова кислота	Глюкозо-6-фосфорна кислота	N-ацетилнейрамінова кислота	Фруктозо-1,6-дифосфат
Глюкоза	9,4	18,7	1,9	3,7	18,7	1,9	18,7
Галактоза	9,4	9,4	0,9	3,7	18,7	0,5	2,3
Лактоза	18,7	9,4	0,9	1,9	9,4	3,7	9,4

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22