



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95357 (13) C2
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/66 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ ТА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЗАКВАСКИ

1

2

(21) а200912447

(22) 02.12.2009

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) ДЯЧЕНКО ГАННА МИХАЙЛІВНА, БОКУН АЛЕВТИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ДЕРЕВ'ЯНКО СТАНІСЛАВ ВАСИЛЬОВИЧ, БОЖОК ЛАРИСА ВАЛЕНТИНІВНА, ПРОКОПЕНКО ОЛЕНА ІВАНІВНА, ДМИТРУК ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА, АГЕЄВ ВОЛОДИМИР ОЛЕКСАНДРОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

(56) UA A1 61176, 17.11.2003.

RU C2 2264454, 10.03.2005.

RU C1 2034923, 10.05.1995.

RU C1 2046141, 05.04.1993.

UA C2 85337, 12.01.2009.

RU C1 2120992, 27.10.1998.

RU C1 2182172, 10.05.2002.

RU C2 2298032, 27.10.2006.

SU A 1089118, 30.04.1984.

(57) Штам *Bacillus subtilis* для виробництва пробіотичного препарату та бактеріальної закваски, депонований у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів за реєстраційним номером 480.

Винахід належить до галузі біотехнології та мікробіології і може бути використаний для виробництва пробіотичного препарату та бактеріальної закваски.

Відомо, що для виготовлення пробіотичних препаратів та бактеріальних заквасок використовують метаболічно-активні штами мікроорганізмів різних таксономічних груп.

Відомі штами бактерій виду *Bacillus subtilis* для створення на їх основі пробіотичних препаратів. Найбільш близьким до винаходу, який заявляється, аналогом, що прийнятий за прототип, є штам *Bacillus subtilis* 44-р [Пат. 61176 Україна, МПК⁵ A61K 35/74, C12N 1/00, C12N 1/04. Спосіб одержання препарату для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань сільськогосподарських тварин / Сіверс В.С., Гребенькова Н.І., Васильєва Л.В.; власник і заявник: Інститут сільськогосподарської мікробіології Української академії аграрних наук. - №4429738, заявл. 23.05.1988, опубл. 17.11.2003, бюл. №11]. Недоліком цього штаму є відносно невисокі амілазна та казеїназна активності.

В основу винаходу поставлена задача одержати штам мікроорганізмів для виробництва про-

біотичного препарату та бактеріальної закваски з високою ферментативною активністю.

Запропонований метаболічно-активний штам *Bacillus subtilis* B3, відібраний серед штамів, виділених із вмісту рубця великої рогатої худоби. Штам *Bacillus subtilis* B3 депонований у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (вул. Донецька, 30, м. Київ, Україна) 23 червня 2009 року під реєстраційним номером 480, а також зберігається в лабораторії мікробіології тварин Інституту сільськогосподарської мікробіології Української академії аграрних наук.

Культурально-морфологічні особливості штаму

Грампозитивні аеробні спороутворюючі палички із заокругленими кінцями, рухливі. На агаризованому картопляно-мінеральному середовищі при температурі 37 °С через 18-20 годин виростають слизисті, блискучі колонії, округлої форми, підвищені, діаметром 1,0-3,0 мм; через 24-48 годин росту - складчасті, матові, з підвищеним центром і зазубреними краями, безбарвні чи білуватого кольору.

(19) UA (11) 95357 (13) C2

На поверхні рідких середовищ утворює тонку плівку, під плівкою стовпчик середовища прозорий. Має здатність до глибинного росту.

Фізіолого-біохімічні властивості штаму

Ферментує арабінозу, ксилозу, мальтозу, цукрозу і маніт. Глюкозу ферментує без утворення газу.

Не ферментує рамнозу, манозу, лактозу, мальтозу, галактит, рафінозу, інουλін, целобіозу, сорбіт, інозит, гліцерин.

Активно продукує каталазу, ацетилметилкарбінол.

Гідролізує крохмаль та казеїн. Редукує нітрати. Має уреазну та желатиназну активності, лецитиназної - не має. Індол і сірководень не утворює.

При рості у молоці з лакмусом відбувається відновлення лакмусу (середовище знебарвлюється).

Толерантний до 4 та 7 % NaCl.

Ауксотрофність не має.

Антагоністична активність

Штам *Bacillus subtilis* B3 проявляє антагоністичну активність до *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*.

Патогенність

Не токсичний і не патогенний для лабораторних і сільськогосподарських тварин при застосуванні всередину.

Чутливість до антибіотиків

Чутливий до колексину, енрофлоксацину, колістину, окситетрацикліну, норфлоксацину, докси-ну, доксицикліну, амоксициліну, інтертриму.

Спосіб та умови культивування та довгострокового зберігання штаму.

Штам росте у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром [Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта и др.; [пер. с англ. Е. Н. Кондратьевой и Л. В. Калакуцкого]: в 3 т. - М.: Мир, 1983-1984. - Т. 3.-1984. - 264с.] при температурі 37 °C упродовж 24-48 годин.

Штам зберігається у ліофільно висушеному вигляді чи на агаризованому середовищі при температурі 3-5 °C в сухому темному місці. На агаризованому середовищі - упродовж 1-2 років, у ліофільно висушеному вигляді - 5 років і більше.

Штам *Bacillus subtilis* B3 має стабільні культурально-морфологічні і ферментативні властивості та може бути використаний для виготовлення пробіотичного препарату та бактеріальної закваски.

Переваги винаходу демонструються наступними прикладами.

Приклад 1. Антагоністична активність пробіотичних штамів бактерій.

Методом перпендикулярних штрихів [Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров: учеб. для студ. биол. спец. ун-тов.-4-е изд., перераб. и доп. - М.: Высш. шк., 1986. - 448с.] на м'ясо-пептонному агарі визначено антагоністичну активність штамів мікроорганізмів *Bacillus subtilis* B3 (винаходу) та *Bacillus subtilis* 44-р (прототипу) до чотирьох тест-культур.

Таблица 1

Антагоністична активність штамів мікроорганізмів виду *Bacillus subtilis*

Штами бактерій	Зони затримки росту тест-культур, мм			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	2	3	4	5
<i>Bacillus subtilis</i> B3 (винахід)	17,0±3,0	19,0±2,0	12,0±2,0	23,0±4,0
<i>Bacillus subtilis</i> 44-р (прототип)	13,0±3,0	16,0±3,0	8,0±1,0	14,0±2,0

Приклад 2. Амілазна активність пробіотичних штамів бактерій.

За допомогою йодної проби на крохмальному агарі визначено амілазну активність [Методические рекомендации по выделению и идентифика-

ции бактерий группы *Bacillus subtilis*-mesentericus из организма человека и животных / под ред. В. В. Смирнова. - К.: Наукова думка, 1980.-28 с] штамів мікроорганізмів *Bacillus subtilis* B3 (винаходу) та *Bacillus subtilis* 44-р (прототипу).

Таблица 2

Амілазна активність штамів мікроорганізмів виду *Bacillus subtilis*

Штами бактерій	Зона гідролізу крохмалю, мм
<i>Bacillus subtilis</i> B3 (винахід)	14,0±2,0
<i>Bacillus subtilis</i> 44-р (прототип)	10,0±3,0

Отже, запропонований штам *Bacillus subtilis* B3 виявляє вищу антагоністичну та амілазну активності порівняно зі штамом *Bacillus subtilis* 44-р, що

доводить можливість його використання для виробництва пробіотичного препарату та силосної закваски.

