



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **67862**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 09230**

(22) Дата подання заявки: **22.07.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **12.03.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **12.03.2012, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):

**Мацелюх Олена Вікторівна (UA),
Іваниця Володимир Олексійович (UA),
Варбанець Людмила Дмитрівна (UA),
Нідялкова Наталія Афанасіївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ
ІМ. Д.К.ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Заболотного, 154, м. Київ, МСП, 03680,
Україна (UA)**

(54) ШТАМ БАКТЕРІЇ *BACILLUS CEREUS* - ПРОДУЦЕНТ ПОЗАКЛІТИННОЇ ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ ЕНДОПЕПТИДАЗИ

(57) Реферат:

Штам *Bacillus cereus* - продуцент позаклітинної фібринолітичної ендопептидази, що зареєстрований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України під номером IMB B-7342.

U
67862
UA

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості, а саме до одержання нового штаму, продуцента ендопептидази з фібринолітичною активністю.

Мікробні фібринолітичні ферменти мають величезний потенціал для використання як харчових добавок, а також для лікування тромбозів і супутніх захворювань. Такі ферменти успішно виділено з різних мікроорганізмів, в основному це бактерії роду *Bacillus*, ізольовані з традиційної східної ферментованої їжі. Охарактеризовано фізико-хімічні властивості цих ферментів, а також показано їх ефективність в тромболізісі *in vivo*. Запропонований штам *Bacillus cereus* IMB B-7342 депонований в колекції живих культур Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Штам ізольований у 1998 р. з води Чорного моря і зберігається в колекції живих культур кафедри мікробіології і вірусології ОНУ ім. І. І. Мечникова.

В 1938 році було показано, що β -гемолітичний стрептокок групи А виділяє металовмісну ендопептидазу - стрептокіназу, що належить до групи фібринолітичних ферментів. В 1940 році був описаний механізм її дії - зв'язування з плазміненом крові і перетворення останнього в активну форму - плазмін. 1976 рік вважається роком народження тромболітичної терапії - вперше опубліковано статтю Чазова Є. І. про внутрішньо коронарний лізіс тромба за допомогою стрептази [1]. Не дивлячись на високу ефективність, в цього фермента є певні недоліки: неспецифічність активації плазміногену, що призводить до більшої кількості геморагічних ускладнень і виснаженню системи, яка перешкоджає зсіданню крові, чужерідність організму людини, і, відповідно, більша кількість алергічних реакцій; малий період напіввиведення. Всі ці фактори є приводом для розробки нових засобів тромболітичної терапії. Деякі мікробні фібринолітичні ферменти, які включають пептидази виділені з різних родів мікроорганізмів (стрептоміцети, актиноміцети, бактерії), очищені і охарактеризовані. Більшість мікробних фібринолітичних ферментів належить до класу серинових протеаз, які в основному активні в нейтральній і лужній зонах рН, з оптимумом між рН 8,0 і 10,0. Їх молекулярна маса знаходиться в межах 27,7-44,0 кДа, а ізоелектрична точка складає близько 8,0 [2].

Найбільш близьким до корисної моделі по технічній сутності та результату, що досягається, є штам *Bacillus subtilis* A26 [3], при глибинному культивуванні якого в певних умовах можна одержати показники ферментативної активності до 63,45 од/мл культуральної рідини.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості продуцента

Грампозитивна спороутворююча паличка, яка продукує каталазу. Факультативний анаероб. У препаратах має тенденцію до утворення ланцюжків. Розміри клітин складають 1,0-4,0 мкм. Утворює центрально розташовані еліпсоїдні ендоспори. Не утворює параспорові включення. Умови росту: кислотність середовища - рН 5,7-6,8, температура – 30 °С.

Ферментація джерел вуглецю: ферментує глюкозу з утворенням кислоти без газу, дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера.

Асиміляція джерел вуглецю: асимілює: моносахариди (арабінозу, галактозу, глюкозу, ксилізу, манозу, рамнозу, сорбозу); дисахариди (мальтозу, лактозу, сахарозу); трисахариди (рафінозу), багатоатомні спирти (маніт, сорбіт, дульцит), а також соєве та кукурудзяне борошно.

Штам росте при концентрації хлориду натрію 7 %, редукує нітрати до нітритів, гідролізує крохмаль, желатин та казеїн.

Фізіолого-біохімічні властивості

Відношення до вуглецевого живлення: культура синтезує фермент на середовищах, що містять як моно-, так і полісахариди. Відношення до азотного живлення: добре засвоює нітратний та амонійний азот. Із органічних джерел азоту асимілює пептон, желатину, сечовину, дріжджовий автолізат, деякі амінокислоти (аланін, валін, треонін, гліцин, серин). Найбільшу біосинтетичну активність забезпечують складні органічні субстрати (желатин, пептон, казеїн) в концентрації 1-5 г/л. Синтез ферменту пригнічується при вирощуванні на дріжджовому автолізаті, аспарагіновій і глутаміновій кислотах, як єдиному джерелі азоту в середовищі. Відношення до кисню: факультативний анаероб. Відношення до температури: мезофіл, оптимальна температура для росту та біосинтезу ферменту 25-42 °С. Відношення до кислотності поживного середовища: культура росте в діапазоні рН від 4,0 до 9,0. Оптимальне вихідне значення рН середовища для синтезу ферменту становить 6,0-6,5, в процесі росту та ферментації спостерігається зростання рН до 7,5-8,5.

Штам зберігається в ліофілізованому стані та на середовищі МПА під шаром стерильного вазелінового масла. Пересів 1 раз на рік.

Ідентифікація проведена за визначником: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2 ed.), Volume 3. 2008.

Штам згідно отриманих у гострих дослідах результатів та відповідних нормативних матеріалів належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи теплокровних тварин - безпородних білих мишей. Досліджена культура по ступеню

небезпеки мікроорганізмів належить до 4-го класу: "мало небезпечні, практично без загальнотоксичної чи алергенної дії".

Оптимальні параметри культивування штаму: температура 38-42 °С, pH 6,5, 44-46 год. на напівсинтетичному середовищі такого складу (в г/л): KH_2PO_4 1,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,75; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5; мальтоза - 1,0; желатин - 10,0. Біомасу відділяють центрифугуванням, ферментативну активність визначають у надосадовій рідині.

Визначення активності ферменту

Для визначення фібринолітичної активності як субстрат використовують фібрин, отриманий з плазми людини на станції переливання крові. В дослідну пробу додають 1 мг фібрину, 1,8 мл Tris-HCl буферу (pH 7,5) і 0,2 мл надосадової рідини. Інкують протягом 30-45 хвилин при 37 °С. Реакцію зупиняють додаванням 2 мл 20 % трихлороцтової кислоти (ТХО). В контрольну пробу ТХО додають одразу. Зразки витримують при кімнатній температурі 20 хвилин і потім центрифугують при 10 000g, 15 хвилин для видалення преципітату. Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 275-280 нм. За одиницю активності приймають таку кількість ферменту, яка гідролізує фібрин із вивільненням 1 мкг тирозину за хвилину за умов експерименту. Калібрувальну криву будують, використовуючи розчини, що містять від 0 до 200 мкг тирозину.

Активність фібринолітичної ендopeптидази у культуральній рідині штама-продуцента за оптимальних умов досягає показників 70-80 од/мл.

Перевагою запропонованого продуцента є його здатність синтезувати високоактивну та термостабільну ендopeптидазу, відсутність сезонності та токсичності, що є технологічно ефективним.

Запропонований фермент може знайти використання у медико-технологічних процесах.

Таким чином, отримано новий штам, який, у порівнянні з відомими, має інші культуральні ознаки і є новою культурою зі стійкими біохімічними властивостями.

Джерела інформації:

1. Чазов Е. И., Матвеева Л. С., Мазаев А. В. и др. Внутрикoronарное назначение фибринолизина при остром инфаркте миокарда// Тер. Арх.-1976.-48, № 4. - С. 8.
2. Варбанець Л. Д., Мацелюх О. В. Протеолітичні ферменти мікроорганізмів та методи їх дослідження. - К.: 2008. - С. 60-71.
3. Agrebi R., Haddar A., Hajji M., Frikha F., Manni L., Jellouli K., Nasri M. Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: characterization and statistical media optimization // Can. J. Microbiol.-2009.-55. - P. 1049-1061.

35 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам *Bacillus cereus* - продуцент позаклітинної фібринолітичної ендopeптидази, що зареєстрований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України під номером IMB B-7342.

40