



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121324** (13) **U**
(51) МПК

C12N 1/14 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)

A61K 36/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 07333**

(22) Дата подання заявки: **11.07.2017**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **27.11.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **27.11.2017, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):

**Барштейн Віктор Юрійович (UA),
Круподьорова Тетяна Анатоліївна (UA),
Забейда Олена Федорівна (UA),
Зайченко Тетяна Олександрівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ",
вул. Осиповського, 2-а, м. Київ, 04123 (UA)**

(74) Представник:

Барштейн Віктор Юрійович

**(54) ШТАМ БАЗИДІАЛЬНОГО ГРИБА PHELLINUS IGNIARIUS (FR.) QUEL. 29, ЯКИЙ ПРОЯВЛЯЄ
АНТИБАКТЕРІАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ЩОДО БАКТЕРІЙ ESCHERICHIA COLI**

(57) Реферат:

Штам базидіального гриба *Phellinus igniarius* (Fr.) Quel. 29 у формі нативного міцелію та культуральної рідини, що виявляє високу антибактеріальну активність відносно бактерій *Escherichia coli*.

UA 121324 U

Корисна модель належить до біотехнології.

Описано штам базидіального гриба *Phellinus igniarius* (Fr.) Quel. 29, у формі нативного міцелію та культуральної рідини, який проявляє антибактеріальну активність відносно бактерій *Escherichia coli*. Корисна модель може бути використана як основа для отримання біопрепаратів і лікарських засобів, що мають антибіотичну активність по відношенню до патогенних для людини і тварин бактерій *E. coli*.

Найближчими серед відомих видів грибів та грибних продуктів, які проявляють антибактеріальну активність відносно бактерій є наступні.

Відома антибактеріальна активність метанольних та етилацететних екстрактів плодових тіл *Phellinus merrillii* та *P. swieteniae* проти 16 штамів *Acinetobacter baumannii*. (Belsare M.H. In-vitro susceptibility testing of some *Phellinus* species against *Acinetobacter baumannii* from Maharashtra India / M.H. Belsare, G.S. Bapat, K.R. Ranadive, J.G. Vaidya, S.S. Deokule // J. Med. Pl. Res.-2010.-4(13).-P. 1335-1338).

Антибактеріальну активність міцелію та культуральної рідини *Phellinus merrillii* (культивували на 5 поживних середовищах для виявлення оптимального) визначали проти: *Staphylococcus aureus* ATCC25923 та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. Зони інгібування *S. aureus* культуральною рідиною *P. merrillii* досягали 30,4 мм, зони інгібування *Ps. aeruginosa* 10,2 мм. (Siriwattanametanon W. Culture filtrates from laboratory grown *Phellinus* mushrooms for use as antibacterial agents / W. Siriwattanametanon, W. Kanchanarach, R. Thiwthong, J.L.A. Dodgson // Chiang Mai. J. Sci. -2014. -41(1). - P. 243-247).

Недоліки порівняння антибактеріальної активності різних видів грибів та різних грибних препаратів у вищеподаних прикладах та в корисній моделі, що пропонується, однакові та очевидні.

Порівняння антибактеріальної активності грибів різних видів недоречне, тому що навіть різні штами одного й того ж виду демонструють різні властивості, в тому числі і антибактеріальну активність. Також впливають на властивості грибів умови культивування, перш за все - живильне середовище.

Процес культивування плодових тіл (які в більшості випадків є об'єктами патентів та досліджень) грибів потребує особливих мікрокліматичних умов, пов'язаних з матеріальними витратами (вода, електрична енергія), тривалого процесу вирощування (від 3 місяців), додаткового оброблення ґрунту та приміщення. В той же час, наявність біологічно активних речовин плодових тіл грибів суттєво не відрізняється від міцелію грибів (при значно менших витратах ресурсів) за умов поверхневого культивування. Культуральна рідина, отримана в результаті вирощування міцелію, часто виявляє більшу антибактеріальну активність, ніж міцелій.

Антибактеріальна активність залежить від форми застосування грибного продукту (гомогенізований нативний подрібнений міцелій, суспензія міцелію, культуральна рідина, різні екстракти з міцелію та плодових тіл).

За прототип корисної моделі прийняті результати дослідження антибактеріальної активності водного екстракту плодових тіл *Phellinus igniarius*, яке показало помірну активність екстракту проти різних штамів *Staphylococcus aureus* (зона інгібування $8 \pm 0,49$ $17,5 \pm 0,74$) та повну відсутність антибактеріальної активності проти: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus plantarum* тощо [Sittiwet C Anti-staphylococcus aureus activity of *Phellinus igniarius* aqueous extract / C. Sittiwet, D. Puangpronpitag // Int. J. Pharmac. - 2008. - 4. - P. 503-505].

Антибактеріальна активність культурального міцелію та культуральної рідини *Phellinus igniarius* (Fr.) Quel. 29 проти *Escherichia coli* раніше не досліджувалася і однозначно припустити, що *Phellinus igniarius* буде мати таку активність щодо *Escherichia coli* було неможливо.

В основу корисної моделі поставлена задача виявлення антибактеріальної активності міцелію та культуральної рідини штаму базидіального гриба *Phellinus igniarius* (Fr.) Quel. 29 проти *Escherichia coli*, що дозволить використати їх як основу для отримання біопрепаратів і лікарських засобів, що мають антибіотичну активність відносно цих патогенних для людини і тварин бактерій.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

Штам *Phellinus igniarius* (Fr.) Quel. 29 було отримано з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України [Бухало А.С. Каталог колекції культур шапинкових грибів ІБК / А.С. Бухало, Н.Ю. Митропольская, О.Б. Михайлова. - К.: Алтерпрес, 2011. 100 с.]. Міцелій культивували поверхнево на рідкому глюкозо-пептон-дріжджовому живильному середовищі (ГПД), г/л: глюкоза - 25,0; пептон - 3,0; дріжджовий екстракт - 2,0; KH_2PO_4 -1,0; K_2HPO_4 -1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -0,25; вода - 1 л.) та на натуральному середовищі із

борошном із шроту амаранту після CO₂-екстракції (60 г на 1 літр дистильованої води) 14 днів за температури 26±2 °С. Нативний гомогенізований міцелій та відокремлену упарену (в 5 разів) культуральну рідину наносили на стерильні диски з фільтрувального паперу діаметром 8 мм, які розміщували в чашки Петрі на поверхню агаризованого м'ясопептонного середовища, попередньо інокульоване бактеріями. Як тест-культури використовували: *Staphylococcus aureus* 209, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 та *Escherichia coli* 06, які були люб'язно надані Кафедрою біотехнології НТУУ "КПІ ім. І. Сікорського" з колекції культур мікроорганізмів. Споріві добові суспензії мікроорганізмів (1,5×10⁶ КУО/мл) культивували за температури 37 °С. Після інкубування в термостаті (37 °С) протягом доби антимікробну активність грибів визначали вимірюванням діаметра зон затримки росту тест-організму методом дифузії в агар за допомогою паперових дисків [Билай В.І. Методы экспериментальной микологии / В.И. Билай. - К.: Наукова думка, 1982. - 552 с.].

Повторність дослідів трикратна, результати експериментів оброблено методами математичної статистики з використанням статистичних функцій Excel з використанням програмного забезпечення Microsoft Office XP, Програма 11.5 Version (SPSS, Inc., 2002). Значення представлені у вигляді середніх значень ± стандартна помилка середнього (SEM). Відмінності при P < 0,05 вважалися значущими.

Міцелій *Phellinus igniarius* (Fr.) Quel. 29, культивований на ГПД живильному середовищі та культуральна рідина, виявили повне інгібування росту бактерій *Escherichia coli* та повну відсутність антибактеріальної активності проти: *Bacillus subtilis* та *Salmonella aureus* (табл. 1).

Таблица 1

Антибактеріальна активність *Phellinus igniarius*

Види тест-культур	Живильне середовище	Форма застосування грибного препарату	
		Гомогенізований міцелій	Культуральна рідина
B. subtilis	ГПД середовище	-	-
	Середовище на основі амарантового борошна		
E. coli	ГПД середовище	ПІ	ПІ
	Середовище на основі амарантового борошна		
S. aureus	ГПД середовище	-	-
	Середовище на основі амарантового борошна		

Примітка: ПІ - повне інгібування росту бактерій;

«-» - відсутність антибактеріальної активності.

Антибактеріальну активність продуктів культивування *P. igniarius* представлено на кресленні. Ліворуч - диски просочені культуральною рідиною, праворуч - нативним гомогенізованим міцелієм.

Рис. Інгібування росту бактерій *E. coli* міцелієм і культуральною рідиною *P. igniarius*

Чутливість бактерій до деяких комерційних антибіотиків і натуральних ефірних масел (*Salvia* та *Eucalyptus*) була досліджена для порівняння і оцінки перспектив продуктів культивування *P. igniarius*, що описані в заявці. Антибактеріальна дія міцелію та культуральної рідини *P. igniarius* була не тільки на рівні деяких антибіотиків, але навіть перевершувала результат інших антибіотиків і була значно вища, ніж у ефірних масел (таблиця 2).

Таблица 2

Чутливість бактерій до комерційних антибіотиків та натуральних ефірних олій

Препарати	E. coli
Сульфадиметоксин	-
Левоміцетин	ПП
Еритроміцин	16,0±1,0
Гросептол	-
Тетрациклін	18,0±1,4

Продовження таблиці 2

Лінкоміцин	ПП
Грамокс А	25,0±0,2
Зітроцин	-
Цефтріаксон	ПП
Бензиленимін	ПП
Рентаміцин	ПП
Ефірна олія шавлії	9,5±0,5
Ефірна олія евкалипта	11,5±0,9

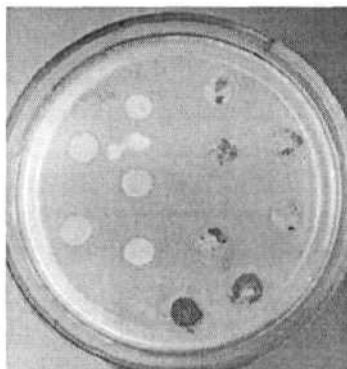
Примітка: «-» - відсутність активності;

"ПП" - повне пригнічення росту культур (> 25 мм в діаметрі).

- 5 Таким чином, перевагою заявленого штаму *Phellinus igniarius* (Fr.) Quel. 29 у формі міцелію, культивованого на ГПД живильному середовищі, та культуральної рідини є високі антибактеріальні властивості (повне інгібування росту бактерій *Escherichia coli*) в порівнянні з відомими антимікробними препаратами і вибірковість дії, виражена в активному пригніченні зростання *Escherichia coli*, не впливаючи при цьому на інші мікроорганізми.
- 10 Штам може використовуватися для промислового отримання засобу, що має антибактеріальну активність щодо *Escherichia coli*.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 15 Штам базидіального гриба *Phellinus igniarius* (Fr.) Quel. 29 у формі нативного міцелію та культуральної рідини, що виявляє високу антибактеріальну активність відносно бактерій *Escherichia coli*.



Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601