



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **96195** (13) **U**
(51) МПК

C12N 5/07 (2010.01)

C12R 1/07 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 06817	(72) Винахідник(и): Нідялкова Наталя Афанасіївна (UA), Іваниця Володимир Олексійович (UA), Варбанець Людмила Дмитрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.06.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.01.2015	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 154, м. Київ, Д 03680 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.01.2015, Бюл.№ 2	

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ BACILLUS THURINGIENSIS VAR. ISRAESENSIS - ПРОДУЦЕНТ ПОЗАКЛІТИННОЇ КОЛАГЕНАЗИ

(57) Реферат:

Штам *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* - продуцент позаклітинної колагенази, що зареєстрований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером IMB B-7465.

UA 96195 U

Винахід (корисна модель) належить до біотехнології, а саме до одержання нового штам-продуцента ферменту колагенази.

Колагеназа - фермент, який використовується в промисловості та медицині для гідролізу колагену - природного нерозчинного фібрилярного білка, що є складовою тканин більшості хребетних тварин. Впливаючи переважно на колагенові волокна, вона сприяє видаленню некротичних тканин. Тому найбільш перспективним напрямком застосування колагенази є включення її в склад медичних препаратів для прискорення відторгнення некротизованих тканин після опіків і відморожень, а також при трофічних виразках для очищення гнійно-некротизованих ран.

Запропонований штам *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465 знаходиться в колекції живих культур Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Штам виділений з акваторії о. Зміїний та знаходиться в колекції живих культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова.

На сьогодні відомо [1, 2], що колагенази синтезуються різними мікроорганізмами, такими як: *Clostridium histolyticum*, *C. perfringens*, *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *Vibrio* sp., *V. vulnificus*, *Peptostreptococcus magnus*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. repens*, *Candida albicans*, *Penicillium purpurogenum* і *P. frequentan*. За даними літератури [3] значна кількість колагенолітичних мікроорганізмів є патогенами для людини, а колагеназа, як один із факторів їх вірулентності, бере участь в інвазії та агресії патогену. Все це значно обмежує область їх практичного застосування.

Колагенолітичні протеази включають дві великі групи: серинові та металопротеази. Серед бактеріальних колагеназ металопротеази найбільш широко розповсюджені, в той час як серинові та інші колагенази рідко зустрічаються [4]. Найбільш вивченими серед мікробних продуцентів є колагенази бактерій роду *Clostridium*, які належать до металопротеаз, активний центр яких містить іон Zn^{2+} .

Найбільш близьким до корисної моделі по технічній суті та результату, який досягається, є штам *Streptomyces* sp. 1349 [5], при глибинному культивуванні якого в певних умовах можна одержати комплексний ферментний препарат *Streptomyces* sp. 1349, колагеназна активність якого складає 2,67 од/мг білка (субстрат - колаген).

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості продуцента.

Грампозитивна паличка, яка утворює спори еліпсоподібної форми, що розташовуються по центру, спорангій не роздутий. Факультативний анаероб, каталазо- та оксидазопозитивний. На МПА росте щільно, утворюючи колонії (6-10 мм) сірувато-білого кольору, округлої форми, матові, профіль колоній вигнутий, мають шорстку поверхню. Для культури характерний окиснювально-бродильний тип метаболізму. Гідролізує желатину і крохмаль, не гідролізує казеїн, не має лецитинази та фенілаланіндезамінази.

Ферментація джерел вуглецю: При окисненні глюкози утворює кислоту та ацетоїн, не утворює газ, з L-арабінози, D-ксилози і D-маніту не утворює кислоту.

Асиміляція джерел вуглецю: як джерела вуглецю та енергії бактерії використовують пептон, глюкозу, дріжджовий автолізат, ростуть на м'ясо-пептонному агарі, у м'ясо-пептонному бульйоні.

Штам відновлює нітрати до нітритів, не продукує газ з нітритів.

Фізіолого-біохімічні властивості

Відношення до вуглецевого живлення: культура синтезує колагеназу на середовищах, що містять сахарозу, глюкозу, ксилозу, дріжджовий екстракт.

Відношення до азотного живлення: із органічних джерел азоту асимілює пептон, желатин, сечовину, дріжджовий екстракт, а з неорганічних - $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$. Найбільшу колагеназну активність забезпечує желатина як єдине джерело азоту в середовищі.

Штам зберігається на середовищах МПА під шаром стерильного вазелінового масла. Пересів 2 рази на рік.

Жирно-кислотний аналіз та ідентифікацію штамів проведено за допомогою методу газової хроматографії та автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA). Штам визначили як *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* з індексом схожості 0,442.

Штам авірулентний, належить до 4-го класу за ступенем небезпеки мікроорганізмів: "малонебезпечні, практично без алергенної та загальнотоксичної дії".

Відношення до кисню: факультативний анаероб.

Відношення до температури: мезофіл, оптимальна температура для росту та біосинтезу ферменту 28-30 °C.

Відношення до кислотності поживного середовища: культура росте при pH 7,2-7,8. Оптимальне вихідне значення pH середовища для синтезу ферменту становить 6,5, в процесі росту та ферментації спостерігається зростання pH до 8,2.

Оптимальні параметри культивування штаму: температура 28 °C, pH 7,5, 24 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; дріжджовий автолізат - 0,15. Біомасу відділяють центрифугуванням, колагеназну активність визначають у надосадовій рідині.

Для визначення активності ферменту як субстрат використовують нативний високомолекулярний білок колаген, отриманий за спеціальною технологією з очищеної колагенової тканини тварин ("Геліос-12"). При вивченні колагеназної активності інкубаційну суміш, яка містить 10 мг колагену, 2,5 мл 0,01 М трис-НСІ буфера (pH 9,0-10,0) і 1 мл досліджуваного препарату, витримують на водяній бані 5 год. при 37 °C. Після цього 0,1 мл реакційної суміші переносять в пробірки, які містять 0,5 мл 4 % розчину нінгідрину в суміші з 0,2 М цитратним буфером. Інкубування проводять 20 хв на киплячій водяній бані, після чого в охолоджену суміш додають 5 мл 50 % розчину н-пропанолу і витримують 15 хв при кімнатній температурі. Продукти розщеплення визначають на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 600 нм. За одиницю колагеназної активності приймають кількість мкмолей вивільненого лейцину згідно зі стандартною кривою, побудованою за лейцином [6].

При глибокому культивуванні *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* одержано комплексний ферментний препарат, колагеназна активність якого досягає значень 34,5 од/мг білка, що майже в 13 разів перевищує активність комплексного ферментного препарату *Streptomyces* sp. 1349, взятого в якості стандарту порівняння (субстрат - колаген).

Перевагою запропонованого продуцента є його здатність синтезувати високоактивну та термостабільну колагеназу, відсутність сезонності та токсичності, що є технологічно ефективним. Ферментний препарат, одержаний з цієї культури осадженням сульфатом амонію (90 % насичення), здатний ефективно працювати в діапазоні значень pH реакційного середовища від 5,0 до 11,0 з помітним піком активності при pH 8,0. Фермент стабільний при зазначених вище значеннях pH впродовж 24 годин.

Ферментний препарат активний від 20 до 60 °C (оптимум при 45 °C). Термостабільність препарату при 30 °C повністю зберігається впродовж доби; при 45-50 °C - 120 хв; при 60 °C - 60 хв. Препарат зберігає активність впродовж 1 року.

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. Supphatharaprateep W., Cheirsilp B., Jongjareonrak A. Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction // N. Biotechnol. - 2011. - 28, N 6. - P. 649-55.

2. Jain R., Jain P.C. Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather // Indian J. Exp. Biol. - 2010. - 48, N 2. - P. 174-178.

3. Harrington D.J. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease // Infect. Immun. - 1996. - 64, N 6. - P. 1885-1891.

4. Liu L., Ma M., Cai Z., Yang X., Wang W. Purification and properties of a collagenolytic protease produced by *Bacillus cereus* MBL13 strain // Food Tech. Biotech. - 2010. - 48, N 2. - P. 151-160.

5. Іванко О.В., Варбанець Л.Д. Очистка та фізико-хімічні властивості колагенази *Streptomyces* sp. 1349 і кератинази *Streptomyces* sp. 1382 // Мікробіол. Журн. - 2004. - 66, N 6. - С. 11-24.

6. Mandl I. Collagenase // Science. - 1970. - 169, N 3951. - P. 1234-1238.

50 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* - продуцент позаклітинної колагенази, що зареєстрований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером IMB B-7465.

55

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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