

Винахід відноситься до галузі мікробіологічної промисловості, а саме, до біотехнології одержання ферментно-бактеріальних препаратів, які використовуються в якості лікарських засобів.

Відомий препарат лізосубтилін Г10Х [1], який одержується шляхом глибокого культивування *B.subtilis*-402 з подальшим виділенням літичних ферментів з культуральної рідини та очищенням від супутніх амілази і протеїнази шляхом кислотної інактивації при рН 4,0 - 4,2 і шляхом сорбції баластних речовин на гелі фосфату кальцію при рН 6,0 та осадженням літичних ферментів етанолом при рН 6,5. Препарат володіє здатністю руйнувати клітини бактерій, дріжджів і грибів і може бути використаний для лікування деяких захворювань, викликаних патогенною бактеріофлорою.

Відомий ферментний препарат, який лізує бактеріальні клітинні стінки, і спосіб його одержання [2]. Препарат одержують на основі культивування мікроорганізму *Ps. aeruginosa* L-1028 на поживному середовищі, яке містить джерела вуглецю, азоту, фосфору та деякі інші мінеральні солі. В якості джерела вуглецю штам-продуцент споживає 1 - 5% масових частин органічних субстратів: вуглеводнів, спиртів, органічних кислот та інших дефіцитних компонентів. Технологія одержання препарату передбачає: вилучення вирощеної біомаси, добування ферменту з культуральної рідини шляхом осадження етиловим спиртом з послідовними операціями очистки і концентрації та висушування.

Відомий лікарський препарат, який застосовується при захворюваннях типу коліту, ентероколіту, гострої і хронічної діареї, запорів, порушеннях кишкового мікробіоценозу, викликаних лікуванням антибіотиками. Препарат працює за принципом заміщувальної терапії, має наступний склад: клітини дріжджів, молочнокислі бактерії і сапрофітні колібактерії, висушені, сублімаційно, а також компоненти культурального середовища для молочнокислих бактерій і кишкової палички [3]. Як видно, запропонований лікарський засіб не містить комплексу гідролітичних ферментів, які сприяють нормалізації процесів травлення у хворих тварин і людей.

Відомий препарат "Протосубтилін-ГЗХ" [1]. Цей препарат являє собою гіроскопічний водорозчинний порошок світло-коричневого кольору, одержаний шляхом глибокого культивування штаму-продуцента *Bacillus subtilis* №103 та послідовного зневодження одержаної культуральної рідини за допомогою розпилювальної сушарки. Препарат містить комплекс протеаз,  $\alpha$ -амілазу,  $\beta$ -глюканазу та домішки баластних речовин. Масова доля вологи не перевищує 8%. Стандартизація протосубтиліну ГЗХ здійснюється за протеолітичною активністю. Середня протеолітична активність препарату без наповнювача складає 700 од./г, а з наповнювачем (кухарська сіль) - 70 од./г. Препарат призначений для одержання білкових гідролізатів в мікробіологічній промисловості, а також для застосування в якості добавки до кормів з метою підвищення продуктивності тварин і риб. Але поряд з відміченими достоїнствами протосубтилін ГЗХ, як і інші згадані препарати, мають істотні недоліки.

Згадані препарати і технології їх одержання

недостатньо економічні, тому що поживні середовища для глибокого культивування штамів-продуцентів включають ряд компонентів, які дорого коштують і малодоступні, а також такі складні технологічні операції, як гельфільтрація, ізоелектрофокусування, фільтрація через іонообмінні смоли, осадження органічними розчинниками. Крім того, одержані препарати літичних ферментів недостатньо універсальні і в більшості випадках невідома можливість їх застосування з медичною і ветеринарною метою.

Найбільш близьким за технічною суттю і досягнутому ефекту до запропонованого винаходу є препарат СЛ-бактерии - прототип [4]. Це порошкоподібна суха маса світло-коричневого кольору, нерозчинна у воді, але створює в ній і молоці гомогенну стійку суспензію бактерій - *Bacillus subtilis* і *B.licheniformis*. Препарат застосовується для профілактики і лікування гострих шлунково-кишкових захворювань молодняку сільськогосподарських тварин, має широкий спектр антагоністичної дії по відношенню до патогенних і умовно патогенних бактерій. Препарат випускають в скляних ампулах або флаконах. З профілактичною метою новонародженим тваринам виводять по 200 мл суміші, що містить 100 млрд. мікробних тіл, не пізніше 1 - 2 годин після народження, потім через 24 і 48 годин, з лікувальною - по 200 мл суміші дві-три рази на добу до повного одужання.

Недоліки: значні витрати на поживне середовище, до складу якого входять дефіцитні харчові продукти та витрати на ліофільне зневодження, зниження відсотка життєздатних клітин штамів бактерій-антагоністів при зберіганні препарату, недостатній лікувально-профілактичний ефект та неможливість застосування антибіотиків і інших антибактеріальних препаратів.

В основу винаходу поставлена задача розробити нову високоефективну поліферментну бактеріолітичну субстанцію для профілактики і лікування гострих шлунково-кишкових захворювань різної етіології (диспепсій), яку крім того можна використати як премікс до комбікормів для тварин і птиці та для лізису біомаси продуцентів з метою підвищення виходу продуктів біосинтезу.

В способі одержання бактеріолітичної субстанції передбачається аеробне культивування штаму продукуючого мікроорганізму *Streptomyces globisporus* №36 (АС898Д) [5, 6] на модифікованому поживному середовищі Сугimoto, яке містить хлористий амоній, сульфат магнію, калій фосфорнокислий двозаміщений, натрій фосфорнокислий однозаміщений, кальцій хлористий, натрій хлористий, кукурудзяний екстракт, пекарські або кормові дріжджі, питну воду, відділення біомаси продуцента, концентрування культуральної рідини (КР). Концентрування КР переважно ведуть ультрафільтрацією з кратністю концентрування 1 : 5 - 1 : 20, або випарюванням, а зневоднення здійснюють з попереднім внесенням до концентрату хлористого натрію і хлористого кальцію в певному співвідношенні, які виступають в якості стабілізаторів активності цільових ферментів. Крім того, в поживне середовище додатково вводять цільові індуктори біосинтезу літичних ферментів у вигляді біомаси грампозитивних бактерій *Micrococcus luteus* 2665, або *Escherichia coli* K-12, або *Staphylococcus*

aureus 941. Крім того, в якості речовин-наповнювачів використовують хлористий кальцій, хлористий натрій, крохмаль, сухе молоко, вуглеводи.

Суть запропонованого способу полягає в наступному.

Для одержання поліферментної літичної субстанції - пепсінорму для ветеринарії і пепсінорму-М (кюзан) для медицини штам *Streptomyces globisporus* №36 AC898Д культивують на модифікованому середовищі Сугімото такого складу, г/л:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 1,0;  $\text{MgSO}_4$  - 0,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  - 0,5;  $\text{CaCl}_2$  - 0,2; кукурудзяний екстракт - 0,5; сухі пекарські або кормові дріжджі - 2,0 - 5,0; вода - 1л. Активну реакцію середовища встановлюють на рівні pH 7,2. Підготовку поживного середовища і процедури глибинного культивування проводять відомими методами [6]. Стерильне середовище в ферментаторах засівають інокулятом продуценту в кількості 5 - 8% і проводять його глибинне культивування при продуванні середовища стерильним повітрям при наступному режимі: в перші 12 годин на один об'єм середовища 0,5 об'єму повітря на годину, далі з 12 до 36 год. інтенсивність аерації збільшують в 2 рази.

Після закінчення культивування готують дві бактеріолітичні субстанції - пепсінорм і кюзан. Ветеринарну субстанцію - пепсінорм одержують шляхом концентрування, сублімаційного висушування культуральної рідини (КР) або зневодження на дисковій розпилювальній сушарці. В якості речовин - стабілізаторів активності цільових ферментів використовують - хлористий натрій, хлористий кальцій, біомасу штаму-продуцента, крохмаль або сухе молоко. Температура повітря на вході в сушарку 100 - 120°C, на виході - 60 - 70°C. Бактеріолітична субстанція пепсінорм - порошок світло-кремового або світло-коричневого кольору. Порошок частково розчиняється у воді, утворюючи в ній, фізіологічних розчинах, або молоці суспензію клітин штаму-продуцента (табл.1). Препарат лізує ряд умовно патогенних бактерій (табл.2).

Для одержання кюзану культуру центрифугують протягом 30хв при 1500g з метою вилучення біомаси продуцента, потім проводять концентрування КР шляхом упарювання або ультрафільтрації кратністю 1 : 5 - 1 : 20. До концентрату вносять фізіологічно нейтральні стабілізатори - наповнювачі  $\text{NaCl}$  і  $\text{CaCl}_2$  в кількості 0,005 - 0,01 і 0,01 - 0,05 відповідно, що забезпечує можливість одержати субстанцію з активністю цільових ферментів, од./г: бактеріолітична - на *M.luteus* №2665 - 900 - 1300тис., на *E.coli* - 1000 - 1500тис.ч ліпазна - 50 - 80,5; глюканазна (дріжджовий глюкан) - 28,5 - 42,5; протеазна - 250 - 600 при наступному компонентному складі в процентах від сухої маси: білок загальний - 72 - 76, вуглеводи - 16 - 20, ліпіди - 0,5 - 1,0, зола 1,5 - 2,5, речовини-стабілізатори і наповнювачі хлористий натрій і хлористий кальцій - до 100% (табл.3).

Як видно з табл.1 - 3, запропонований спосіб одержання бактеріолітичної субстанції відповідає критерію "Суттєві ознаки".

Після висушування препарати пепсінорм і кюзан стандартизують за протеолітичною, ліпазною, глюканазною і бактеріолітичною ферментними активностями та іншими параметрами у відповідності з технічними умовами і закупорюють в склянки в умовах

асептики.

З метою аналізу ферментативної активності готують наважки препаратів 0,1 - 1,0г, ретельно розтирають скляною паличкою з невеликою кількістю 1/15М фосфатного буфера pH 6,2 (для бактеріолітичної активності) або pH 7,0 (для протеазної активності), перемішують на магнітній мішалці протягом 20хв, центрифугують протягом 20хв при 1500g. Супернатант переносять в мірну колбу місткістю 100мл і після доведення відповідним буфером до мітки - добре перемішують. Розчин використовують для визначення активностей цільових ферментів.

Бактеріолітичну активність субстанції визначають турбідиметричним методом [7]. Ступінь лізису тестових культур бактерій виражають в умовних одиницях. За 1од. приймають таку активність ферментів, яка за стандартних умов інкубації знижує оптичну щільність суспензії тест-культури на 0,001. Потім бактеріолітичну активність розраховують на 1г препарату.

Протеазну активність визначають модифікованим методом Ансона з використанням в якості субстрату казеїну [8].

Целюлазну активність пепсінорму визначають за кількістю глюкози, що звільнюється внаслідок дії ферменту на розчинний (КМЦ) і нерозчинний (хроматографічний папір) субстрати [9].

Ліпазну активність кюзану аналізують за методом [10]; глюканазну (дріжджовий глюкан) - [9].

Приклад 1. Посівний матеріал штаму-продуцента *S.globisporus* №36 AC898Д вирощують на скошеному агаризованому модифікованому середовищі Сугімото (в%):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,07;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  - 0,05;  $\text{MgSO}_4$  - 0,05;  $\text{CaCl}_2$  - 0,01; кукурудзяний екстракт - 0,05; питна вода, pH 7,2 протягом 30дб при 30°C. Якість одержаного посівного матеріалу визначають в трьох повторностях шляхом підрахунку під мікроскопом в камері Горяєва кількості спор, що проросли. Отримані результати виражають в %. Вона становила  $89 \pm 3\%$ . Посівний матеріал в кількості 1млрд. спор вносять в стерильне рідке середовище того ж складу, розлите в конічні колби об'ємом 0,75л в кількості 150мл, і інкубують на бактеріологічній качалці - 220кол/хв при температурі 30°C протягом 40 годин.

Таким чином отримали інокулят у вигляді вегетативних клітин і спор, яким засівають ферментатор об'ємом 500л, заповнення 300л. Модифіковане рідке середовище Сугімото мало вищезазначений склад. Середовище стерилізують паром 60хв при температурі 120°C і постійному перемішуванні. Додають піногасник (рослинна олія, 0,8%). Охолоджене до 30°C середовище засівають інокулятом густиною 20,0млрд кл./мл в кількості 1л і проводять ферментацію при наступних технологічних параметрах: робочий тиск - 0,3 - 0,4атм., періодичне перемішування роторною мішалкою (0 - 24год - 1хв/год; 24 - 36год - постійно) з швидкістю обертання 315об/хв; аерація 0 - 12год - на 1 об'єм середовища - 0,5 об'єму повітря/хв, 12 - 24год - на 1 об'єм середовища - 1 об'єм повітря/хв, 24 - 36год - на 1 об'єм середовища - 1,5 об'єми повітря/хв. Контроль стерильності процесу ферментації проводять 3 рази, через кожних 12 годин. Для чого асептичне відбирають проби культури, проводять мікробіологічний контроль (чистота культури продуцента).

Бактеріолітичну активність визначають на тест-культурах *M.luteus* №2665, *S.aureus* №941, *E.coli* K-12 турбідиметричним методом, протеазну - за Т.Д. Шишкіною. Культуральна рідина містила лише вегетативні клітини, обривки міцелію та спори продуцента щільністю  $2 \cdot 10^9$  клітин і володіла слідуною ферментною активністю: протеазна - 2,5од/мл, ліпазна - 0,9од/мл, глюканазна - 0,6од/мл; бактеріолітична на *E.coli* K-12 - 7400од/мл, *S.aureus* №941 - 6500од/мл. З КР вилучають біомасу продуценти центрифугуванням при 1500g, температурі 8°C протягом 30хв. Після цього КР концентрують на ультрафільтрі А10УВ з використанням ультрафільтраційної мембрани УАМ-100 (середній діаметр пор 10нм) при робочому тиску на вході в блок модулів  $4,0 \pm 0,5$ кгс/м і на виході  $0,45 \pm 0,05$ кгс/м. В процесі ультрафільтрації підтримують температуру не вище 10°C. Ступінь концентрування КР 10 разів.

З метою зменшення втрат активності цільових ферментів на стадії зневодження проводять рідинну стандартизацію ультраконцентрату шляхом додавання в нього речовин - стабілізаторів і наповнювачів: хлористого натрію - 0,01%, хлористого кальцію - 0,05%, сирової біомаси продуцента - 100млрд. кл/л.

Зневодження концентрату проводять на сублімаційній установці ОЕ-960. Одержана зневоджена поліферментна бактеріолітична субстанція в кількості 7,5кг володіла такими активностями цільових ферментів: протеазна - 100од/г; ліпазна - 80,2од/г; целюлазна: нерозчинний субстрат - 38,6, розчинний - 70,0; глюканазна - 79,5; бактеріолітична - по *E.coli* K-12 - 600000, *S.aureus* №941 - 500000од/г.

Стандартизацію субстанції з метою одержання порошку "Пепсінорм" проводять в змішувачі шляхом додавання до неї сухого крохмалю (1 : 1) і перемішуванні суміші протягом 30хв.

складу, проте замість дріжджів додавали біомасу *E.coli* K-12. В кожній колбі містилось по 150мл поживного середовища. Термін культивування 48 годин, температура 30°C.

По закінченні процесу ферментації біомасу штаму-продуцента вилучають центрифугуванням в рефрижераторній центрифугі протягом 30 хвилин при 1500g, автоклавують і утилізують. Культуральна рідина визначалась такою активністю: бактеріолітична на *S.aureus* №941 - 6000,0од/мл, *E.coli* K-12 - 7100,0, протеазна - 4,5, ліпазна - 1,0, глюканазна - 0,7од/мл. Супернатант концентрували десятикратно на лабораторній ультрафільтраційній установці ФК 01 - 100 з використанням ацетатцелюлозних мембран "Владипор" типу УАМ-100. Робочий тиск створюють стислим повітрям - 0,2МПа при температурі 10°C.

В одержаний концентрат додають солі речовин - стабілізаторів активності цільових ферментів, 0,01% натрію хлориду і 0,03% кальцію хлориду і проводять сублімаційне зневодження препарату до вологості 6%. Субстанція кюзан володіла слідуною ферментативною активністю.

№ п/п	Найменування показника	Хар
1	Зовнішній вигляд, колір, запах	Пор
2	Масова частка води в % не більше	
3	Розчинність	
4	Бактеріолітична по <i>S. aureus</i> № 941, не менше	
5	<i>E. coli</i> K-12	
6	Протеазна	
7	Ліпазна	
8	Глюканазна (дріжджовий глюкан)	

№ п/п	Найменування параметру
1	Зовнішній вигляд, колір, запах
2	Масова частка води в % не більш
3	Розчинність
4	Бактеріолітична по <i>E. coli</i> K-12
5	<i>S. aureus</i> № 941
6	Протеазна, од/г
7	Ліпазна, од/г
8	Целюлазна
9	а) нерозчинний субстрат б) розчинний субстрат Глюканазна (дріжджовий глюкан)

Приклад 3. В якості органічного субстрату для модифікованого середовища Сугімото беруть біомасу *M.luteus* №2665 (5м/л). Технологічні операції по підготовці посівного матеріалу *S.globisporus* AC898Д аналогічні описаним в прикладі 2. По закінченні ферментації вміст колб перемішують і аналізують за згаданими методиками. Культура бактеріологічне чиста, представлена вегетативними клітинами, обривками міцелію і спорами штаму-продуцента - щільністю  $2,5 \cdot 10^9$ кл/мл. Бактеріолітична активність, визначена на *S.aureus* 941, становила 8000од/мл, на *E.coli* K-12 - 6200од/мл, протеазна - 2,0од/мл, ліпазна - 1,2од/мл, глюканазна - 1,3од/мл. Після десятикратного концентрування КР методом ультрафільтрації як в прикладі 2, концентрат має бактеріолітичну активність: на *S.aureus* - 50000од/мл, *E.coli* K-12 - 33000; протеазну - 50, ліпазну - 35, глюканазну - 25од/мл. Після рідинної стандартизації солями  $\text{CaCl}_2$  і  $\text{NaCl}$  проводять сублімаційне зневодження концентрату до вологості 6%. Характеристика сухої субстанції кюзану наведена в таблиці.

Приклад 2. Підготовку маточного посівного матеріалу і контроль його якості проводять як в прикладі 1. Щільність посіву - 8%. Глибинне культивування проводять аеробно на бактеріологічній качалці (220кол/хв) в конічних колбах об'ємом 750мл на середовищі того ж

№ п/п	Найменування показника
1	Зовнішній вигляд, колір, запах
2	Масова частка води, %
3	Розчинність
4	Бактеріолітична активність, од/г а) <i>S. aureus</i> № 941 б) <i>E. coli</i> K-12
5	Протеазна активність, од/г
6	Ліпазна активність, од/г
7	Глюканазна активність, од/г

Приклад 4. Культивування штаму-продуцента і концентрування КР проводять як в прикладі 1, проте замість пекарських дріжджів в поживне середовище вводять білково-вітамінний концентрат (БВК) в кількості 5г/л. Зневодження концентрату КР проводять на розпилювальній сушарній установці при температурі сушарного агента на вході - 135°C і на виході - 75°C. Характеристика субстанції "Кюзан" дана в таблиці.

№ п/п	Найменування показника
1	Зовнішній вигляд, колір, запах
2	Масова частка води, %
3	Розчинність
4	Бактеріолітична активність, од/г а) <i>E. coli</i> K-12 б) <i>M. luteus</i> № 2665
5	Протеазна активність, од/г
6	Ліпазна активність, од/г
7	Глюканазна активність, од/г

Як показали випробування, бактеріолітичні препарати "Пепсінорм" і "Кюзан" мають високий профілактичний (до 96 - 100%) і лікувальний (до 91 - 98%) ефекти при різних шлунково-кишкових хворобах та кишкових дисбактеріозах у тварин. Виробництво препаратів характеризується простотою технологічних операцій, використанням недорогої і доступної сировини. Внаслідок відсутності клітин штаму-продуцента і низької баластних речовин кюзан має меншу антигенність, вищу активність, що розширює можливості його застосування в медицині, ветеринарії, мікробіологічній промисловості.

#### Характеристика бактеріолітичного препарату

№ п/п	Назва показника
1	Зовнішній вигляд, колір, запах
2	Масова частка води, % не більше
3	Розчинність
4	Бактеріальна чистота, м.т. в 1 г препарату, не більше
5	Визначення нешкідливості в тест-дозі
6	Ферментативна активність, од/г препарату, коливання Бактеріолітична: а) <i>Escherichia coli</i> K-12 б) <i>Micrococcus luteus</i> № 2665
7	Протеазна
8	Ліпазна
9	Целюлазна: а) нерозчинний субстрат б) розчинний
10	Глюканазна (дріжджовий глюкан)

#### Коливання літичної здатності різних серотипів

Тест-об'єкти
<i>Escherichia coli</i> K-2
<i>E. coli</i> ПЗ 0119
<i>E. coli</i> K-12
<i>Streptococcus hemolyticus</i> 62
<i>Staphylococcus aureus</i> 941
<i>S. aureus</i> № 989
<i>Proteus vulgaris</i> , Hauser 1885
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Migula, 1900
<i>Shigella flexneri</i> Castellani
<i>Salmonella java</i> 43
<i>Vibrio cholerae</i> 39
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 534

Таблиця 3

## Характеристика бактеріолітичного препарату "Кюзан"

Назва показника	Характеристика
Суха маса препарату, яка одержана з 1 л культуральної рідини, г	0,6–0,8
Вологість не більше, %	5,5–6,0
Величина часток, мм	0,001–0,01
Розчинність у воді	Розчинний
Склад препарату:	
Білок загальний, % сухої маси	72–76
вуглеводи,            --	16–20
ліпіди,                --	0,5–1,0
зола,                  --	1,5–2,5
Наповнювачі NaCl і CaCl <sub>2</sub> (5 : 1)	До 100 %
Комплекс гідролітичних ферментів, од/г препарату:	
бактеріолітична активність	
на <i>M. luteus</i> 2665	400000–900000
на <i>E. coli</i> K-12	1000000–1500000
протеазна активність, ум./од.	950–600
ліпазна активність, ум./од.	60,0–100,0
глюканазна активність (дріжджовий глюкан)	38,5–80,0