

Винахід відноситься до мікробіологічної і медичної промисловості, до галузі біотехнології і стосується способів одержання біологічно активної речовини з гепатопротекторними і гастроентерологічними лікувальними властивостями.

З давніх пір і в теперішній час для лікування гастроентерологічних захворювань (виразкової хвороби шлунку та дванадцятипалої кишки, гастритів) і захворювань печінки використовується велика кількість препаратів хімічного і біологічного походження, які представлені в основному засобами рослинного і тваринного походження.

В останній час вважаються більш перспективними і розроблюються нові препарати з гепатопротекторними і гастроентерологічними властивостями мікробного походження. Це обумовлено широкою можливістю одержання нових препаратів за рахунок відбору штамів і штучного мутагенезу продуцентів для направленої біосинтезу.

Відомі способи одержання препаратів на основі живих клітин мікроорганізмів-симбіонтів природної мікрофлори шлунково-кишкового тракту ссавців (пробіотики, нормофлори). Препарати біфідумбактерін, колибактерін, бактилсубтін, лактобактерін проявляють антагоністичну дію на патогенні мікроорганізми і застосовуються при різних шлунково-кишкових захворюваннях (Машковский М.Д. „Лекарственные средства“, справочник, М., Медицина. 1993). Проте, при одержанні цих препаратів приходиться вирішувати основні проблеми - збереження життєздатності клітин в процесах впровадження, консервації, зберігання і реактивації, які ускладнюють і роблять дорожчою технологію виготовлення вказаних препаратів.

Увагу дослідників давно приваблюють штами мікроорганізму *Lactobacillus bulgaricus*, які відомі своїм сприятливим впливом на організм ссавців.

Так, відомий спосіб одержання гастроентерологічного і біостимулюючого засобу шляхом гомогенізації нативних клітин *Lactobacillus bulgaricus*, пектину та бджолиного молочка (а.с. Болгарії № 46478, 1990 р.). Даний спосіб пропонує введення таких дороговартісних і дефіцитних компонентів, як пектин і бджолине молочко. Відомий також спосіб одержання лікарського засобу шляхом культивування лактобацил на білковому середовищі з подальшим висушуванням цільового продукту. Останній препарат має тільки симптоматичну дію.

Найбільш близьким (прототипом) до заявленого є спосіб одержання біоактивного засобу для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань шляхом культивування *Lactobacillus bulgaricus* на соєвому середовищі в анаеробних умовах з подальшим висушуванням біомаси і виготовленням лікарської форми (а.с. Болгарії, № 38806, 1986 р.). Препарат ефективний тільки при лікуванні гастриту і виразкової хвороби шлунку.

Задача, яку вирішують автори запропонованого способу, складається з розробки промислового способу одержання біологічно активної речовини з гастроентерологічними властивостями з додатковими терапевтичними функціями (стимулюючий ефект по відношенню до біоелектричної активності шлунку і тонкого кишечника, сприятливий вплив на травну функцію шлунково-кишкового тракту), а також з гепатопротекторними властивостями (лікування захворювань печінки), без токсичного ефекту.

Поставлена задача вирішується способом одержання біологічно активної речовини (БАР) з гепатопротекторними і гастроентерологічними властивостями шляхом культивування мікроорганізму *Lactobacillus bulgaricus* з подальшим виділенням і сушкою біологічно активної речовини, який відрізняється тим, що в якості культури-продуцента використовують штам *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702, депонований в колекції Депозитарію Інституту мікробіології і вірусології НАН України (реєстраційний номер 1MB B-7085), а одержану при культивуванні біомасу клітин піддають ферментативному гідролізу почергово розчином лізоциму концентрацією 0,4-0,6% і розчином трипсину концентрацією 0,4-0,6% при оптимальних для цих ферментів умовах. Спільними з прототипом ознаками є:

- використання мікроорганізму *Lactobacillus bulgaricus*;
- культивування в анаеробних умовах;
- висушування біологічно активної речовини. Відмінними ознаками є:
- використання в якості вихідної культури нового штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702;
- обробка одержаної в результаті культивування біомаси розчином лізоциму концентрацією 0,4-0,6% і розчином трипсину концентрацією 0,4-0,6% при оптимальних для цих ферментів умовах.

Для реалізації способу використовують новий штам *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702, виділений із асоціативної культури молочнокислих бактерій. Штам депонований в колекції Депозитарію Інституту мікробіології і вірусології НАН України як *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 1MB B-7085.

Дата депонування 18.12.2002 р.

Штам характеризується наступними властивостями:

Морфологія клітин

Грампозитивні, нерухомі, рівні палички 0,5х3-8мкм з заокругленими кінцями, розташовуються ланцюжками різної довжини.

Фізіологічна характеристика штаму.

Факультативний анаероб, оптимальна температура (40±1)°С. Оптимум pH 6,0-6,2. Каталазонегативний, нітрати і нітроти не відновлює, желатину не розріджує, аміак із аргініну не утворює. Молоко згущує, утворюючи кислоту (1,3%), молоко з лакмусом відновлює без утворення газу, відновлює молоко з метиленовою синькою, на середовищах з підвищеним вмістом (більше 4%) зористого натрію і pH більше 9,6 не росте.

Не виживає після прогрівання при температурі 63°С протягом 30 хвилин, слиз не утворює, росте на середовищах з жовцю (40%).

Зброджує: глюкозу, фруктозу, лактозу, сахарозу.

Не зброджує: арабінозу, мальтозу, дульцит, ксилозу, рафінозу, інозит, рибозу, манніт, інουλін, целобіозу, галактозу, ескулін, сорбозу, амідгалін, трегалозу, маннозу.

Штам відноситься до групи *delbrueckii* роду *Lactobacillus*, ріст можливий від 28 до 50°С і pH від 3,5 до 8,5, оптимальна температура від 36 до 40°С, pH від 5,6 до 6,4.

Культурально-морфологічні особливості штаму.

Штам росте на середовищах, селективних для молочнокислих бактерій. На поверхні агаризованих середовищ утворює напівпрозорі, білуваті колонії, гладенькі з блиском, слабовипуклі, круглі з нерівним краєм

діаметром 1-3мм. В товщі агару - білуваті дисковидні колонії діаметром 1-2мм. В рідкому середовищі утворює однородну муть і дрібнодисперсний осад.

Спосіб, умови і склад середовищ для зберігання:

На рідкому середовищі MRS з вмістом 0,5% глюкози і 2% крейди протягом 2-х місяців при температурі 4°C.

Тривале зберігання в ліофілізованому стані при температурі (4-8)°C.

Захисні середовища при висушуванні: сахароза - 10%, желатин - 1%, рН - 7,0±0,2 або сахароза - 10%, поліглюкін - 2%.

Спосіб, умови і склад середовищ для розмноження штаму:

Температура росту (39±1) °C, час 18-24 години, рН - 6,6-6,8. Середовище MRS; середовище Р-4 слідуєчого складу, г/л:

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Рибний гідролізат | -10,0; |
| Дріжджовий екстракт | - 10,0; |
| Цукор | -10,0; |
| Магній сірчаноокислий 7-водний | - 0,2; |
| Марганець сірчаноокислий 5-водний | - 0,005; |
| Натрій лимоннокислий | - 5,0. |

Умови і склад середовищ для ферментації:

Температура росту (39 ±1) °C, рН - 6,6-6,8.

Середовище В-1 з вмістом амінного азоту слідуєчого складу, %:

Ферментолізат казеїну - 50% по амінному азоту;

Ферментолізат соєвого борошна - 23% по амінному азоту;

Дріжджовий екстракт - 17% по амінному азоту;

Кукурудзяний екстракт - 10% по амінному азоту;

Цукор - 0,5-1,5;

Магній сірчаноокислий 7-водний - 0,2;

Марганець сірчаноокислий 5-водний - 0,005;

Калій фосфорнокислий двоаміщійий - 2,0;

Вода дистильована - до 1 літра.

Активність культури: накопичення біомаси 1-10⁸ кл/мл. Титр визначають методом граничних розведень в стовпчиках агаризованого середовища MRS.

Вирішення поставленої задачі обумовлене сукупністю властивостей нового штаму-продуцента і запропонованим способом лізису біомаси клітин ферментами лізоцимом і трипсином в названій послідовності і певній концентрації. Саме ця сукупність ознак забезпечує одержання біологічно активної речовини з широким спектром фармакологічної дії.

Культивування штаму здійснюють в анаеробних умовах при температурі (39±1)°C на збалансованому поживному середовищі, яке містить:

| | |
|------------------------------------|--------------|
| Калій фосфорнокислий однозаміщений | -0,18-0,22 |
| Магній сірчаноокислий 7-водний | -0,01-0,03 |
| Марганець сірчаноокислий 5-водний | -0,005-0,007 |
| Цукор-пісок | -0,5-1,5 |
| Ферментолізат казеїну | -1,8-2,2 |
| Ферментолізат борошна соєвого | -0,8-1,2 |
| Екстракт дріжджовий | -1,8-2,4 |
| Екстракт кукурудзяний | -0,3-0,6 |

Після культивування протягом 14-24 годин проводять відокремлення біомаси клітин сепаруванням.

Одержану біомасу змішують зі стерильною очищеною водою в співвідношенні 1:10 для промивки біомаси.

Одержану суспензію сепарують для відокремлення біомаси.

Промиту біомасу подають на сублімаційну сушарку для одержання сухої біомаси.

Одержана суха біомаса повинна мати слідуєчі показники:

- порошок від світло-бежевого до світло-коричневого кольору;
- масова частка вологи не більше 5%;
- загальна кількість мікроорганізмів, не більше 1-10³ кол/г;
- нешкідливість - 10мг/1 мишу;
- наявність бактерій групи кишкової палички не допускається;
- вміст глюкозаміну не менше 1,0%;
- кількість життєздатних клітин не менше 1-10⁵ кол/г;

Далі проводять ферментативний гідроліз сухої біомаси. Для чого одержану біомасу суспендують в стерильній очищеній воді, доводять рН суспензії до значення (7,0±0,1) 20% розчином натрію гідроокису.

До суспензії біомаси приливають 0,5% розчин лізоциму в кількості 0,4-0,6% до вихідної біомаси. Для виключення бактеріального забруднення додають хлороформ.

Гідроліз проводять при температурі (38±1)°C, перемішуванні з числом обертів мішалки 60 хв⁻¹ протягом 8-10 годин. В процесі гідролізу щогодинно корегують рН суспензії до значення (6,9±0,2) 20% розчином натрію гідроокису.

Контроль лізису проводять по змінюванню оптичної густини суспензії.

Вимірювання оптичної густини проводять на фотоколориметрі КФК при довжині хвилі 540нм в кюветах товщиною 0,5см. Розведення вихідної суспензії підбирають таким чином, щоб значення оптичної густини $ОГ_{540}$ складало 0,4-0,6 од. ОГ.

Замір оптичної густини проводять через годину.

Після проходження 7 годин гідролізу, ступінь гідролізу К розраховують по формулі:

$$K = \frac{ОГ_{вих} - ОГ_{кін}}{ОД_{вих}}$$

При $K = 0,55-0,60$ лізис клітин пройшов практично повністю.

У випадку, якщо K менше вказаного значення, процес проводять протягом однієї години і повторюють вимірювання.

Після закінчення лізису біомаси лізоцимом встановлюють рН суспензії ($8,0 \pm 0,1$), добавляючи невеликими порціями 20% розчин натрію гідроокису і доливають 1,0% розчин трипсину концентрацією 0,4-0,6% до вихідної біомаси. Процес гідролізу з трипсином проводять на протязі 8-10 годин, щогодинно корегуючи рН до значення ($7,9 \pm 0,2$) 20% розчином натрію гідрокису.

Контроль закінчення процесу гідролізу трипсином здійснюють спектрофотометричне. Через 8 годин з інтервалом в 30 хвилин відбирають проби суспензії об'ємом 5,0мл, проби центрифугують при $10\,000 \text{ хв}^{-1}$, підбираючи розведення розчину таким чином, щоб величина ОГ складала 0,4-0,6од, при довжині хвилі 280нм вимірюють оптичну густину.

Процес обробки клітинного матеріалу трипсином вважається закінченим, якщо значення ОГ проб не відрізняються більше, ніж на 10%. У випадку, якщо різниця ОГ проб, взятих послідовно через 30хв., складає більше 10%, процес продовжують протягом однієї години і повторюють вимірювання. По закінченню лізису доводять рН до значення ($7,0 \pm 0,2$) 14%-ним розчином соляної кислоти.

Далі проводять відокремлення продуктів ферментативного гідролізу на ультрафільтраційній установці.

Концентрат після ультрафільтраційної установки подають на центрифугування ($n = 18000 \text{ хв}^{-1}$). Одержаний осад збирають в ємкість і передають на стадію знешкодження відходів.

Одержаний ультрафільтрат разом з супернатантом від центрифуги подають на стерилізуючу фільтрацію на мембранній установці.

Стерильний фільтрат передають на установку сублімаційної сушарки. Сушку ведуть при заданому режимі. Одержаний препарат фасують по 100г або 1000г в подвійні пакети із поліетиленової плівки і запаюють.

Одержана біологічно активна речовина (субстанція) зберігає активність протягом двох років.

Відокремлення і очистку продуктів ферментативного гідролізу можна проводити і іншими відомими способами.

Одержана біологічно активна речовина (субстанція екстрабіол) являє собою:

- порошок світло-коричневого кольору зі слабким специфічним запахом;
- помірно розчинна у воді;
- білок відсутній;
- вміст золи не більше 20%;
- рН 1% водного розчину від 6,5 до 7,5;
- масова частка води не більше 7%;
- не має антимікробної дії;
- загальна кількість мікроорганізмів не більше $1-10^3$ кол/г, дріжджових і пліснявих грибів (сумарно) не більше 100кол/г;
- вміст глюкозаміну не менше 2%;
- вміст нуклеїнових кислот не менше 2%;
- вміст пептидів не менше 40%.

Такий біохімічний склад забезпечує заданий спектр фармакологічної дії (гастроентерологічної і гепатопротекторної властивості), підтвердженої експериментами по перевірці властивостей субстанції. За даними звітів 2 МОЛГМІ ім. М.І. Пирогова (м. Москва), препарат, одержаний по описаній вище технології, не кумулюється, не токсичний в межах дозувань, що перевищують терапевтичну дозу в 10 разів, відсутня токсична дія на репродуктивну систему.

Препарат вводили внутрішньочеревне, підшкірне, перорально в широкому діапазоні концентрацій від 0,02 до 1500мг/кг ваги експериментальної тварини. При цьому виявлено, що субстанція не має алергенних властивостей, проявляє тенденцію до імуностимулюючої дії (посилюється гуморальна імунна відповідь), не викликає подразнюючої дії на слизову оболонку шлунково-кишкового тракту.

Дослідження специфічної активності субстанції показали найбільш сильну дію на репаративні процеси, значно скорочуючи строки загоювання виразок дванадцятипалої кишки. Субстанція має помірно виражену спазмолітичну і антацидну дію.

За даними інституту проблем онкології ім. Р.Є. Кавецького ПАН України встановлена LD_{50} в 5000мг/кг маси тварини, що свідчить про нетоксичність терапевтичних доз з високою глибиною запасу.

Дослідженнями ДНЦЛЗ (Україна, м. Харків) встановлено, що одержана субстанція проявляє виражену гепатопротекторну дію яка проявляється в результаті відновлення синтетичної, детоксицируючої і екскреторної функції печінки.

В експериментах на тваринах використовували, як одержану субстанцію, так і її лікарські форми (препарати гастроентерологічної і гепатопротекторної дії, пігулки). Виявлені при дослідженні субстанції закономірності підтвердились і при використанні готової лікарської форми препаратів.

При розробці ефективних доз і схем введення був вибраний оптимальний варіант, який дозволив підготувати інструкцію по клінічному вивченню препаратів. Одночасно з врахуванням ефективних доз і схеми введення проведений комплекс досліджень по хронічній токсичності і показана нешкідливість субстанції і її лікарських форм (в обсязі вимог ФК України) Українським науково-дослідним інститутом фармакології і токсикології (УНДІФТ).

Промислове застосування способу показано в нижче наведених прикладах.

Приклад 1. Вирощування культури *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 здійснювали в дослідно-промислових умовах в ферментаторі ємністю 10м³ з інокулятором ємністю 1,2м³ на середовищі складу, %:

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Калій фосфорнокислий | |
| однозаміщений | - 0,2 |
| Магній сірчаноокислий 7-водний | - 0,02 |
| Марганець сірчаноокислий 5-водний | - 0,006 |
| Цукор-пісок | - 0,8 |
| Ферментолізат казеїну | - 2,0 |
| Ферментолізат борошна соєвого | - 1,0 |
| Екстракт дріжджовий | - 2,2 |
| Екстракт кукурудзяний | - 0,5 |

Ферментолізати і екстракт дріжджовий використовували готові, в сухому вигляді, для економії часу, енерговитрат і з метою одержання стабільних результатів. Змішували всі компоненти поживного середовища, стерилізували в ферментаторі при температурі (126-128)°С 40хв. Після охолодження середовища до 40°С проводили засів інокулятора однодобовою посівною культурою, вирощеною на середовищі MRS (8-10)л.

Культивування проводять в анаеробних умовах при температурі (39±1)°С. Корегування рН в процесі росту культури не проводять.

Через 6-10 годин інокулят в асептичних умовах пересівають в підготовлене поживне середовище в ферментатор (5,0м³ поживного середовища). Ріст культури супроводжується закисанням поживного середовища до рН 3,8-4,2, накопичення біомаси контролюють під мікроскопом і шляхом вимірювання оптичної густини культуральної рідини. Через 14-16 годин при стабілізації росту культури процес культивування припиняють шляхом охолодження культуральної рідини оборотною водою до температури (15-18)°С. Потім проводять сепарування біомаси на сепараторі Westfalia (швидкість подачі 250-300л/год). Після закінчення сепарації біомасу клітин (24кг) за допомогою спеціального пристрою виймають із сепаратора. Суспендують в 240л очищеної води і повторно сепарують. Промиту вологу біомасу (19,2кг) передають на сублімаційну сушарку. Вихід біомаси після сушки - 4,0кг (W = 8%).

Беруть 250г сухої біомаси, добавляють 4,5л стерильної очищеної води, перемішують суспензію до гомогенного стану 30-40хв., корегують рН до значення (7,0±0,1) 20%-ним розчином натрію гідроокису. До суспензії біомаси добавляють розчин лізоциму (1г лізоциму розчиняють в 200мл стерильної води). Для виключення бактеріального забруднення доливають 30мл хлороформу. Нагрівають суміш до температури 38°С, число обертів мішалки встановлюють на позначку 60хв⁻¹ і при даних параметрах проводять гідроліз протягом 8-10 годин, контролюючи рН і температуру. Час закінчення гідролізу визначають по зміні оптичної густини (λ = 540nm). При ступені гідролізу (K), рівному 0,55, лізис проведений повністю.

Після закінчення гідролізу лізоцимом встановлюють рН суспензії (8,0±0,1) 20%-ним розчином натрію гідроокису і доливають розчин трипсину (1г трипсину розчиняють в 100мл стерильної води). Процес гідролізу трипсином проводять протягом 7-10 годин, контролюючи рН. Час закінчення гідролізу також визначають по зміні оптичної густини (λ = 280 nm).

Час закінчення гідролізу визначають по різниці оптичних густин проб, взятих послідовно через 30 хвилин. При різниці оптичних густин менше 10% процес закінчують. Далі доводять рН суспензії до (7,0±0,2) 14%-ним розчином соляної кислоти і передають одержаний лізат на ультрафільтрацію.

Ультрафільтрацію проводять на установці УМТ-Л при температурі менше 40°С. Фільтрат збирають в бутель. Концентрат центрифугують при 18000 хв⁻¹ протягом 40 хвилин, супернатант збирають в ємкість і вливають в бутель з фільтратом, а одержаний осад передають на знешкодження.

Далі фільтрат передають на стерилізуючу фільтрацію на мембранну установку Владипор типу МФА-А. Стерильний фільтрат висушують на сублімаційній сушарці ТГ-50 при температурі мінус 35°С протягом 38 годин. Висушену субстанцію фасують в подвійні мішки із поліетиленової плівки по 100-1000г. Вихід субстанції з порції склав 140г з вологістю 5%, або 56% від вихідної сухої біомаси (9,4% від вологої біомаси) (або 2,0 кг субстанції з однієї операції ферментації об'ємом культуральної рідини (к.р.) 5,5м³).

Субстанція - порошок світло-коричневого кольору помірно розчинний у воді. Вологість - 5%. Має стабільний склад (глюкозаміни не менше 2%, нуклеїнові кислоти не менше 2%, пептиди не менше 40%) і біологічну активність по підсиленню фагоцитозу не менше 30%. Субстанція зберігає активність на протязі 2 років.

Приклад 2. Біомасу клітин штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 одержували так само, як в прикладі 1, але при обробці ферментами використовували розчин лізоциму і розчин трипсину в кількості 0,6% по відношенню до вихідної біомаси. Останні операції проводили аналогічно прикладу 1. При цьому було одержано 135г субстанції з вологістю 5% або 54% від вихідної сухої біомаси (7,7% від вологої біомаси або 1,92кг субстанції з однієї операції ферментації з об'ємом к.р. 5,5м³).

Вихід БАР в технологічному циклі склав 5400 лікарських доз гастроентерологічної властивості і 67000 доз гепатопротекторної властивості, що практично однаково з прикладом 1. Властивості одержаної субстанції аналогічні одержаній в прикладі 1.

Приклад 3. Біомасу штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 одержували способом, описаним в прикладі 1, а обробку біомаси розчинами лізоциму і трипсину проводили в кількості 0,8% по відношенню до вихідної біомаси. Процес лізису при цьому пройшов за 2-3 години, одержано субстанції 120г. По якісним показникам препарат відповідав вимогам НТД, тільки по вмісту нуклеїнових кислот (їх було 1,8%) препарат одержаний некондиційний.

Таким чином, при використанні для стадії ферментативного гідролізу лізоциму в концентрації 0,4-0,6% і трипсину в концентрації 0,4-0,6% до вихідної біомаси вдається одержати продукт з заданими виходом і якістю, які відповідають вимогам розробленої НТД.