



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **88595** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
C12N 1/00
C12R 1/465 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2013 11433	(72) Винахідник(и): Тодосійчук Тетяна Сергіївна (UA), Покас Олена Вікторівна (UA), Яремчук Сандра Миколаївна (UA)
(22) Дата подання заявки:	27.09.2013	(73) Власник(и): Тодосійчук Тетяна Сергіївна, вул. Борщагівська, 46/2, кв. 26, м. Київ, 03055 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.03.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.03.2014, Бюл.№ 6	

(54) СТРЕПТОФУНГІН, ЩО МАЄ ПРОТИГРИБКОВУ ДІЮ

(57) Реферат:

Стрептофунгін, що має протигрибкову дію, синтезований штамом *Streptomyces albus* UN 44, депонованим в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під реєстраційним номером *Streptomyces albus* IMB Ac-5030.

UA 88595 U

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості, а саме до нового антибіотика стрептофугіну, синтезованого штамом культури роду *Streptomyces* виду *Streptomyces albus*, і може бути використана при отриманні нового антибіотика, придатного для використання як кормової добавки при лікуванні тварин.

Штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* (реіндентифікований як *Streptomyces albus*) IMB Ac-5001 продукує комплекс літичних ферментів (UA, патент України на винахід № 34119, опубліковано 15.02.2001). Відомий штам дозволяє здійснювати біосинтез ферментного комплексу, який використовується як субстанція для виділення клітинних структур та для отримання ферментних препаратів, що застосовуються в різних галузях промисловості і медицині як антисептик побутового, ветеринарного, косметичного, медичного та промислового призначення.

Відсутні відомості щодо здатності відомого штаму до синтезу антибіотичних речовин.

Задачею корисної моделі є створення нового антибіотика протигрибкової дії, придатного для використання як основи ветеринарних та медичних препаратів.

Поставлена задача вирішується стрептофунгіном, що має протигрибкову дію, синтезованого штамом *Streptomyces albus* UN 44, депонованим в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під реєстраційним номером *Streptomyces albus* IMB Ac-5030.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки культури.

Штам *Streptomyces albus* UN 44 одержують в результаті ступінчастого індукованого мутагенезу при послідовній обробці суспензії спор вихідної культури штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* IMB Ac-5001 ультрафіолетовим випромінюванням в дозі 240 Дж/м² та азотистою кислотою (0,5 М NaNO₂) протягом 50 хвилин. Вирощування здійснюють при температурі 28±1 °С та перемішуванні при швидкості до 220 об./хв. впродовж 48-72 годин на рідкому середовищі Чапека або іншому середовищі. Оптимальне рН середовища 6,5±1.

Характер росту штаму *Streptomyces albus* UN 44 на різних середовищах та морфологія органів плодоношення показані у Таблиці 1.

Таблиця 1

Морфологія органів плодоношення штаму *Streptomyces albus* UN 44 при вирощуванні на різних середовищах

Середовище культивування	Характер росту	Повітряний міцелій	Субстратний міцелій	Розчинний пігмент	Форма спороносців	Форма спор та спосіб утворення
Агар Чапека	задовільний	блідо-білий	безбарвний	немає	прямі трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Вівсяний агар	дуже добрий	білий	безбарвний	немає	прямі трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Мінеральний агар Гаузе	добрий	білий	безбарвний	немає	прямі трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Органічний агар Гаузе	дуже добрий	білий до кремового	безбарвний	немає	прямі трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації
Глюкозо-аспарагіновий агар	задовільний	світло-сірий з жовтуватим	безбарвний	немає	прямі трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації

Продовження таблиці 1

Середовище культивування	Характер росту	Повітряний міцелій	Субстратний міцелій	Розчинний пігмент	Форма спорноспів	Форма спор та спосіб утворення
Сусло-агар	добрий	світло-кавовий	безбарвний	немає	прямі трохи хвилясті	овальні гладкі, утворюються шляхом фрагментації

Наприкінці вирощування в середовищі утворюється непрозора густа міцеліальна маса жовтувато-оливкового кольору з легким запахом дусту.

5 Клітини штаму формуються у вигляді гіфів діаметром 0,7-0,9 мкм. Як зазначено у Таблиці 1, спорноспів короткі трохи хвилясті, мало розгалужені. Спори овальні, гладкі, утворюються шляхом фрагментації. Забарвлення повітряного міцелію коливається від білого до світло-кавового, субстратний міцелій майже безбарвний. Добре розвинутий повітряний міцелій утворюється на більшості вказаних у Таблиці 1 середовищах.

10 Штам *Streptomyces albus* UN 44 ідентифікували за результатами генетичного аналізу, морфології та фізіолого-біохімічних ознак батьківського та отриманого штаму.

Для короткострокового зберігання (до 2-х місяців) штам *Streptomyces albus* UN 44 підтримується на середовищі агар Гаузе органічний або середовищі Чапека при температурі 4 °С.

15 Довготривале зберігання штаму *Streptomyces albus* UN 44 можливе у вигляді ліофілізованої спорової суспензії, запаяної у ампулах при температурі 4 °С. Захисне середовище під час висушування - глюкоза.

20 Штам *Streptomyces albus* UN 44 на 3-4 добу продукує комплекс літичних ферментів з широким спектром бактеріолітичної активності щодо грам-позитивних та частини грам-негативних мікроорганізмів. В ході вивчення біологічних властивостей, нами було встановлено, що на 4-5 добу штам *Streptomyces albus* UN 44 продукує комплекс антибіотичних речовин - стрептофунгін, що має протигрибкову дію.

Крім того, штам *Streptomyces albus* UN 44 здатен розріджувати желатин, звурджувати молоко, відновлювати нітрати в нітрити. Не виявляє тирозиназної активності.

25 Для росту мікроорганізмів штам *Streptomyces albus* UN 44 здатен використовувати: глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, арабінозу, мальтозу, маніт. Слабко використовує: лактозу, дульцит, інозит, сахарозу, рамнозу. Не зброджує: сорбіт.

Генетичні та інші особливості штаму. Штам є мутантом. Стійкість до антибіотиків та ауко-трофність не вивчалися.

30 Стрептофунгін, що має протигрибкову дію, являє собою комплекс антибіотичних речовин аліфатичної будови, бактерицидної дії, синтезованих штамом *Streptomyces albus* UN 44. Характеристика стрептофунгіну визначається антагоністичною активністю штаму *Streptomyces albus* UN 44.

35 Антагоністичну активність штаму *Streptomyces albus* UN 44 визначали методом радіальних штрихів, використовуючи агаризоване стрептоміцетне середовище Гаузе. Чашки Петрі засівали культурою *Streptomyces albus* 2435 і ставили на пророщування протягом 5 діб в термостат при температурі 28 °С. Після цього методом радіальних штрихів підсівали тест-штами мікроорганізмів (концентрація $1 \cdot 10^5$ кл/мл), чашки Петрі ставили на 24 год. в термостат ($t=37$ °С). Вимірювали зони затримки росту.

40 Для дослідження антагоністичної активності *Streptomyces albus* UN 44 використовували міжнародні референс-штами тест-мікроорганізмів з Української колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології і вірусології НАН України). Дані тест-штами мікроорганізмів є загально прийнятими у світовій практиці для оцінки антимікробної дії антибіотичних сполук і включені в Фармакопеї країн світу.

45 Антагоністична активність штаму *Streptomyces albus* UN 44 показана у Таблиці 2.

Антагоністична активність штаму *Streptomyces albus* UN 44

№ п/п	Тест-штами	Зона затримки росту, мм
	Грампозитивні	
1	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0
2	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0
3	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0
4	<i>Kocuria (Micrococcus) varians</i> ATCC 9341	10
	Грамнегативні	
5	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0
6	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6896	0
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0
	Дріжджі	
9	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	15

Для отримання стрептофунгіну - препарату комплексу антибіотичних речовин, з культуральної рідини штаму *Streptomyces albus* UN 44, вирощеної, на 4-5 день виділяють біомасу центрифугуванням, висушують і фасують у пакети. Концентрація комплексу антибіотичних речовин стрептофунгіну у готовому препараті - 50-60 мг/г. У такому вигляді препарат може бути застосований у ветеринарії. Нешкідливість та безпечність штаму *Streptomyces albus* UN 44 для теплокровних тварин підтверджено "Висновком щодо дослідження вірулентності штаму *Streptomyces albus* UN 44" Інституту мікробіології і вірусології НАНУ від 27.05.2013 р. Для отримання очищеного препарату проводять екстрагування антибіотику з біомаси етиловим спиртом.

Одержаний комплекс антибіотичних речовин активний щодо дріжджів та частини грампозитивних культур.

Приклад

Вихідну культуру штаму *Streptomyces albus* UN 44, вирощену на поживному середовищі: глюкоза - 6,0; соєве борошно дезодороване - 8,0; NaCl-14,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ - 2,0; $CaCl_2$ -4,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ -5,8; $MnCl_2 \times 4H_2O$ -0,04; пропінол Б-400-0,014 л; pH 7,8-8,2, вносять до поживного середовища для біосинтезу стрептофунгіну штамом *Streptomyces albus* UN 44 у ферментаторі.

Склад поживного середовища для біосинтезу штаму *Streptomyces albus* UN 44: соєве борошно - 8,0; крохмаль картопляний гідролізований - 10,0; NaCl-14,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ - 2,0; $MgCl_2$ -2,2; $CaCl_2$ -2,0; $MnCl_2 \times 4H_2O$ - 0,04; пропінол Б-400; pH 7,8-8,2. Культуру вирощували при температурі 28 °С та перемішуванні при швидкості 220 об./хв. впродовж 4 доби у ферментері ($V=1000$ л, при аерації $0,4 \times V_{пов}/V_{сер}$, $V_{пов}$ - об'єм повітря, $V_{сер}$ - об'єм середовища). Центрифугуванням відокремлюють біомасу. Одержану біомасу висушують і очищують.

Одержаний антибіотик стрептофунгін характеризується: активний щодо дріжджів - *Candida albicans*, активний щодо частини грампозитивних культур - *Kocuria (Micrococcus) varians*. Концентрація комплексу антибіотичних речовин стрептофунгіну у готовому препараті - 58 мг/г.

Таким чином, отриманий комплекс антибіотичних речовин стрептофунгін, що має протигрибкову дію, продукований штамом *Streptomyces albus* UN 44.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Стрептофунгін, що має протигрибкову дію, синтезований штамом *Streptomyces albus* UN 44, депонованим в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під реєстраційним номером *Streptomyces albus* IMB Ac-5030.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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