



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(SU) 1327791 A3

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

(51) 4 C 12 P 1/02, C 12 N 1/16,  
A 61 K 35/72// (C 12 N 1/16,  
C 12 R 1:645)

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

## К ПАТЕНТУ

(21) 3278848/28-13  
(86) РСТ/JP 80/00203/ (01.09.80)  
(22) 30.04.81  
(31) 112294/79  
(32) 01.09.79  
(33) JP  
(46) 30.07.87. Бюл. № 28  
(75) Синен Касиваяма (JP)  
(53) 576.8.093.33(088.8)  
(54) ШТАММ TRICHOSPORON KASHIWAYAMA -  
ПРОДУЦЕНТ ВЕЩЕСТВА, ОБЛАДАЮЩЕГО СТИ-  
МУЛИРУЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ НА РЕПАРАТИВНЫЕ  
ПРОЦЕССЫ КОЖИ, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ  
ВЕЩЕСТВА, ОБЛАДАЮЩЕГО СТИМУЛИРУЮЩИМ  
ДЕЙСТВИЕМ НА РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ  
КОЖИ.

(57) Изобретение относится к микро-  
биологической промышленности, в част-  
ности к производству лекарственных  
препаратов. Цель изобретения - раз-  
работка способа получения вещества,

используемого для стимуляции репа-  
ративных процессов кожи, а также  
выявление штамма - продуцента веще-  
ства, обладающего стимулирующим дей-  
ствием на репаративные процессы ко-  
жи. В качестве продуцента использу-  
ют штамм Trichosporon kashiwayama  
FERM-P4821 который характеризуется  
определенными признаками. Способ  
получения упомянутого вещества за-  
ключается в выращивании штамма  
FERM-P 4821 в питательной среде,  
содержащей % (мас./об): 0,3 глюкозы,  
0,5 снятого молока и 0,05 дрожжево-  
го экстракта, при pH 4,0-6,0 и 20-30°C  
в течение 20 ч, затем культуральную  
жидкость фильтруют и отделяют филь-  
рат. Полученный фильтрат при необхо-  
димости концентрируют и/или высуши-  
вают. С полученным препаратом можно  
готовить лечебные мази, косметические  
препараты. 1 н.з.п. ф-лы.

(SU) 1327791 A3

Изобретение относится к микробиологии, в частности к микробиологическому производству лекарственных средств.

Цель изобретения - разработка способа получения вещества, используемого для стимуляции репаративных процессов кожи, и выявление штамма-продуцента, способного вырабатывать вещество, обладающее стимулирующим действием на репаративные процессы кожи.

Штамм *Trichosporon kashiwayama* депонирован в коллекции культур НИИ ферментации, Япония, под номером FERM-P 4821 и характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки.

Форма и размер (жидкая среда на солодовом экстракте МВ).

После культивирования в течение 3 суток при 25°C наблюдаются клетки, имеющие прямоугольную или овальную форму и размер (3-4) x (2-20) мкм, после проведения культивирования в течение 5 сут и более форма клеток становится нерегулярной и, наконец, клетки становятся мицелиоидными.

Образование псевдомицелия (культура на предметном стекле, культуральная среда - агар с картофельным экстрактом).

Клетки псевдодиффальные или псевдомицелиальные, имеют характерные зигзагообразные артроспоры, но без конидий.

Аскоспоры. Аскоспор клетки не имеют.

Баллистоспоры. Баллистоспор клетки не имеют.

Культуральные признаки.

Колония на агаровой культуральной среде со штриховой разводкой (агаровая культуральная среда на солодовом экстракте МВ).

Тусклая, белая, волосовидная и грубая поверхность, очень мягкая, без подъямов, но с реснитчатой периферической частью.

Пленка на жидкой культуральной среде (жидкая культуральная среда на солодовом экстракте МВ).

Белая, волосовидная, хлопьевидная и прочная пленка.

На 50% (мас/мас) глюкозно-агаре рост отсутствует, на 60% (мас/мас) агаровой среде с дрожжевым экстрактом не растет.

Физиологические признаки.

Ферментация углеводов.

Не ферментируют глюкозу, галактозу, сахарозу, пактозу, трегалозу, рафинозу и инулин.

Ассимиляция источников углерода.

D-глюкоза+, D-галактоза+, мальтоза-, рафиноза-, сахароза-, лактоза-, лактат натрия+, D-ксилоза+, эритрит-, D-маннит+, L-сорбоза+, инозитол-, трегалоза-, D-арабиноза-, L-арабиноза-, сукцинат натрия+, цитрат натрия+, ацетат натрия+, инулин-, растворимый крахмал-, этанол+, глицерин+, целлюлоза-, (+: используется, -: не используется).

Использование нитратов: не используются.

Использование нитритов: не используются.

Использование этиламина гидрохлорида: не используется.

Разложение глюкозида (арбутин)-: разлагается.

Образование аналогов крахмала: не образуется.

Образование пигмента: не образуется.

Образование сложных эфиров: образуются.

Реакция с лакмусовым молоком: не коагулирует.

Потребность в витаминах: не требуется.

Устойчивость к соли: критическая концентрация 6-8% (мас./об).

Оптимальная температура 25°C.

Оптимальное значение pH 5,0.

Разложение мочевины: не разлагается.

Рост при 37°C: не растет.

Образование кислоты из глюкозы: не образуется.

Устойчивость к циклогексимиду: резистентен.

Жиры и масла разлагает.

Выделяет при культивировании на среде, состоящей из 0,3% (мас./об.) глюкозы, 0,5% (мас./об.) снятого молока и 0,05% (мас./об.) дрожжевого экстракта, при pH 4,0-6,0 при 20-30°C в течение 20 ч биологически активное вещество, и фильтрат, содержащий данное вещество, имеет следующие свойства.

Бесклеточный очищенный фильтрат надосадочной жидкости культурального продукта содержит небольшие ко-

личества аминокислот, сахаридов и липидов. При проведении количественного анализа фильтрата оказалось, что суммарный азот составляет 0,005-0,015%, а суммарный фосфор - 0,004 - 0,014%.

Характер и состояние.

Фильтрат представляет собой прозрачную жидкость цветом от бесцветного до слабо желтоватого и имеет слабый запах.

Пробы на подтверждение.

20 мл фильтрата упаривают на водяной бане до уменьшения объема приблизительно до 50 мл. Затем к концентрату добавляют 1 мл раствора нингидриновой пробы. После нагревания смеси в течение 30 мин жидкость приобретает фиолетовую окраску.

5 мл азотной кислоты добавляют к концентрату полученному проведением упариванием по известной методике, и смесь кипятят в течение 20 мин. После охлаждения смеси ее нейтрализуют 10%-ным раствором гидроокиси натрия. Затем к смеси добавляют 2 мл раствора аммоний-молибдатной пробы. Если смесь нагревают, жидкость приобретает желтоватую окраску. Если к жидкости добавляют 10%-ный раствор гидроокиси натрия, она становится бесцветной.

К 5 мл фильтрата добавляют 10 мг индола и 2 мл хлористоводородной кислоты, и смесь встряхивают достаточное время. Когда смесь затем нагревают в течение 10 мин, жидкость становится красной.

Физические характеристики:

Удельный вес ( $d_{44}^{25}$ ) 1,000-1,015

Коэффициент преломления ( $n_D^{25}$ ) 1,330-1,340

pH (25°C) 4,5-5,5

Остаток после испарения, % 0,5-2,0

Содержание воды (согласно методу сушки при атмосферном давлении) % 98,7

Белки (коэффициент 6,25) Следы

Содержание липидов (согласно методу экстракции в аппарате

Сокслета), % 0,2

Содержание волокон, % 0

Содержание золы, % 0,1

Содержание сахара, % 1,0

Суммарное содержание сухого вещества, %

(в пересчете на воду) 1,3

Содержание азота в аминформе, мг. % 10

Кислотность по титрованию, число мл 1 н щелочи, оттитрованных для

нейтрализации 100 г образца

0,6

Содержание азота в форме летучих оснований, мг. % 1

Содержание мышьяка

(в виде  $As_2O_3$ ) Не выявлено (предел детектирования

0,1 ч/мин

Содержание тяжелых металлов (в виде Pb) Не выявлено (предел детектирования

1 ч/мин)

Суммарное содержание ртути Не выявлено (предел детектирования

0,01 ч/мин)

Содержание кадмия Не выявлено (предел детектирования

0,01 ч/мин)

Содержание кальция, мг. % 14,7

Содержание фосфора, мг. % 9,8

Содержание муравьиной кислоты Не выявлено (предел детектирования

0,1%)

Содержание уксусной кислоты Не выявлено (предел детектирования

0,01%)

Содержание бутировой кислоты Не выявлено (предел детектирования

0,01%)

Содержание молочной кислоты, % 0,06

Содержание лимонной кислоты, %	0,02	
Число живых клеток	Менее 30 клеток на 1 мл	5
<i>E. coli</i>	/-/	
<i>Staphylococcus aureus</i>	/-/	
Число грибов	/-// мл	
Число дрожжей	/-// мл	10
Содержание пропионовой кислоты	Не выявлено (предел детектирования 0,02 г/кг)	15
Содержание сорбиновой кислоты	Не выявлено (предел детектирования 0,005 г/кг)	20
Бензойная кислота, г/кг	0,42	25
Сложный эфир п-гидроксibenзойной кислоты	Не выявлено (предел детектирования 0,005 г/кг)	30
Содержание витамина B <sub>1</sub>	Не выявлено (предел детектирования 0,01 мг.%)	35
Содержание витамина B <sub>2</sub> , мг.%	0,02	40
Суммарное содержание витамина C	Не выявлено (предел детектирования 2 мг.%)	45
Содержание витамина B <sub>6</sub>	не выявлено (предел детектирования 5 мкг.%)	50
Содержание витамина B <sub>12</sub>	Не выявлено (предел детектирования 0,05 мкг.%)	55
Содержание пантотеновой кислоты, мг.%	0,09	
Содержание холина	Не выявлено	

Содержание фолиевой кислоты

Содержание ниацина

Суммарное содержание каротина

Значение pH

Аминокислотный состав аминокислоты в 100 г образца (цистин: метод окисления надмуравьиной кислотой, триптофан: анализ с помощью микроорганизмов)

Аргинин	менее 0,01
Лизин	менее 0,01
Гистидин	менее 0,01
Фенилаланин	Менее 0,01
Тирозин	Менее 0,01
Лейцин	Менее 0,01
Изолейцин	Менее 0,01
Метионин	Менее 0,01
Валин	Менее 0,01
Аланин	Менее 0,01
Глицин	Менее 0,01
Пролин	Менее 0,01
Глутаминовая кислота	Менее 0,01
Серин	Менее 0,01
Треонин	Менее 0,01
Аспарагиновая кислота	Менее 0,01
Триптофан	Менее 0,01
Цистин	Менее 0,01

Бесклеточная стерильная надосадочная жидкость может быть использована в качестве дерматологического лекарственного аппарата и без концентрирования. Однако предпочтительно концентрировать бесклеточную стерильную надосадочную жидкость. Кроме того, возможно применение концентрата с высокой степенью концентрирования, превышающей 25, или сухого продукта. Подобный концентрат, имеющий высокую степень концентрации или

(предел детектирования 0,03%)

Не выявлено (предел детектирования 1 мкг.%)

Не выявлено (предел детектирования, 0,03 мг.%)

Не выявлено (предел детектирования 0,02 мг.%)

4,9

сухой продукт, может использоваться в качестве дерматологического лекарственного препарата. Кроме того, дерматологический препарат может быть получен смешиванием подобного концентрата, сильного концентрата или сухого продукта с кремом, мазевой основой или другим носителем.

Результаты испытания на токсичность с использованием куриного эмбриона показывают, бесклеточный стерильный концентрат (степень концентрирования 4) токсичностью не обладает. Результаты кожной аллергической пробы на теле человека и пробы на непрерывное раздражение кожи человека показывают, что концентрат совершенно нетоксичен для кожи человека. Результаты пробы на раздражение слизистой оболочки глаза кролика показывают, что концентрат не является раздражителем совсем. Результаты антибиотической пробы показывают, что концентрат не содержит антибиотических веществ.

Дерматологический препарат оказывает лечебный эффект в отношении кожных пятен, потрескавшейся кожи, контактных дерматитов и обожженной кожи.

Проба на излечение кожных пятен.

Отбирают 621 женщин, имеющих кожные пятна на лице, за исключением пациентов имеющих заболевание печени или гинекологические нарушения, а также беременных женщин, поступивших в дерматологические госпитали для излечения кожных пятен. После промывания лица кожные поры открывают воздействием озона и пара, и на область нахождения пятен наносят марлю, пропитанную концентратом (степень концентрирования 2) бесклеточной надосадочной жидкости. Нанесенную марлю покрывают лентой пленки марки Sagan-Wrap и производят облучение инфракрасными лучами для улучшения проникновения концентрата в кожу. Эту обработку проводят раз в неделю и продолжают в течение 3 мес. Обнаружено, что состояние сильно улучшилось у 363 женщин (58,4%), состояние сравнительно улучшилось у 122 женщин (19,8%), никакого улучшения у 133 женщин (21,4%), состояние ухудшилось у одной женщины (0,01%) и контактный дерматит возник у остальных двух женщин (0,03%). Контактный

дерматит, предположительно вызван причинами, не связанными с данным лечением. Доля пациенток, для которых наблюдается значительное или умеренное улучшение, составляет 80%. Кроме того, у 60% из 365 женщин, у которых состояние существенно улучшилось, пятна на коже исчезли полностью.

Проба на излечение трещин кожи и мелких морщинок.

Для банной пробы отбирают 962 женщин из числа поступивших в дерматологические госпитали (150 женщин в возрасте 25-30 лет, 218 женщин в возрасте 30-35 лет, 248 женщин в возрасте 35-40 лет, 172 женщины в возрасте 40-50 лет и 174 женщины в возрасте свыше 45 лет). После промывания кожи лица поры кожи открываются озоном и паром, на кожу лица плотно накладывают марлю, пропитанную концентратом (степень концентрирования 2) бесклеточной надосадочной жидкости и марлю покрывают лентой из пленки Sagan-Wrap. Облучение инфракрасными лучами проводят в течение 15-20 мин для улучшения проникания концентрата в кожу. Обнаружено, что после одной обработки потрескавшаяся кожа значительно улучшилась у 698 женщин (73%), сравнительно улучшалась у женщин (16%), состояние не изменилось у 72 женщин (7%) и состояние не ухудшилось ни у одной из женщин, остается 36 женщин (4%). Учитывая тот факт, что растрескивание кожи развивается в конечном счете в мелкие морщинки, можно считать, что концентрат, являющийся эффективным с точки зрения лечения растрескивания кожи, оказывает профилактический эффект, препятствуя образованию мелких морщинок.

Проба на лечебный эффект в отношении контактных дерматитов.

Выбрана женщина, 21 год, страдающая сыпью и жжением на веках обоих глаз, возникающими на следующий день после смены теней для век фирма А на тени для век фирмы Б, диагноз - контактный дерматит. Дерматологом на пораженные участки нанесена марля, пропитанная концентратом (степень концентрирования 2) бесклеточной надосадочной жидкости. Не использовалось никаких стероид-

ных препаратов, противовоспалительных и антигистаминных веществ. Пациентке представлено около 20 мл концентрата, концентрат наносят на 30 мин дважды в сутки, т.е. утром и вечером. Спустя 48 ч после начала лечения прекратилось жжение, а спустя 96 ч после начала лечения сыпь по существу исчезла. Спустя 1 неделю сыпь не наблюдается совсем.

Проба на лечение ожогов.

Женщина 47 лет, имеющая ожог, возникший в результате обваривания горячей водой, на наружной части левого предплечья (ожог II степени) с высыпанием и припухлостью величиной с ладонь, а также мелкими пузырьками, обратилась к дерматологу спустя 1 ч после обваривания. Пораженный участок немедленно охлаждают проточной водой, на пораженный участок наносят марлю, пропитанную концентратом (степень концентрирования 2) бесклеточной стерильной надосадочной жидкости и на нее накладывают пергаментную бумагу. Затем на пораженный участок накладывают повязку. Спустя 24 ч обнаружено, что мелкие пузырьки совершенно исчезли, хотя высыпание и припухлость остались и пациентка прекратила жаловаться на боль.

Мужчину 30 лет, имеющего ожог в результате обваривания горячей воды на задней части правой ноги (ожог II степени) с высыпанием и припухлостью размером с куриной яйцо, обрабатывают концентратом (степень концентрирования 2) бесклеточной стерильной надосадочной жидкости по методике, описанной выше. Спустя 24 ч припухлость исчезла, хотя высыпание осталось, и пациент прекратил жаловаться на боль.

Таким образом, концентрат оказывает сильно выраженный лечебный эффект в отношении ожогов.

**Пример 1.** В перемешиваемый ферментационный аэротенк емкостью 1000 л загружают 800 л культуральной среды, имеющей описанный выше состав, и после стерилизации нагреванием и естественного охлаждения эту культуральную среду инокулируют затравкой, образованной осуществлением предварительной культивации при 28°C в течение 30 ч в 10 л той же культуральной среды в неболь-

шом перемешиваемом ферментационном аэротенке. Затем культивацию проводят при 28°C в течение 70 ч в условиях аэрации и перемешивания. После завершения ферментации культуральную жидкость пропускают через фильтровальный аппарат модели MP 293-16 производства фирмы (Найгай Секухин Коге К.К.) (фильтровальная бумага GL-90 производства фирмы "Тое Роси", 0,5 мкм) и через фильтровальный агрегат модели MP-293-4 производства той же фирмы (мембранный фильтр-ТМ-2 производства фирмы "Тое Роси", 0,45 мкм) для удаления твердых частиц и клеток. Полученный фильтрат концентрируют в соответствии с методом использования мембраны обратного осмоса в аппарате модели производства фирмы "Байонинджиниринг Ко" так, чтобы объем уменьшился до 200 л. Полученный концентрат стерилизуют с использованием теплообменника тарельчатого типа (производства фирмы "Иван Кикай Коге К.К."), стерильно упаковывают в стеклянные емкости и хранят в холодильнике (5°C).

**Пример 2.** Стерилизованный концентрат, полученный в примере 1, сушат вымораживанием и полученный порошок смешивают со стерильной мазевой основой с получением мази для кожи.

**Пример 3.** Косметический препарат получают введением 1 г стерилизованного концентрата, полученного в примере 1, в косметическую основу, состоящую из 1 г стеариновой кислоты, 7 г пчелиного воска, 4 г самозмульгируемого глицерина моностеарата, 30 г жидкого парафина, 0,1 г водного ланолина и 40 г очищенной воды, и пластифицированием смеси в соответствии с традиционными методиками. Композицию разливают и упаковывают в ампулы, и упакованные ампулы направляют на продажу.

**Пример 4.** Лекарственный препарат лечения кожных заболеваний получают введением подходящих количеств пиридоксина гидрохлорида,  $\gamma$ -оризанола, аллатоина, DL- $\alpha$ -токоферола (витамина Е) и мятного масла в композицию, полученную в примере 3.

**Формула изобретения**  
1. Штамм *Trichosporon kashiwayama* FERM-P 4821 (Коллекция культур

FERM, Япония) - продуцент вещества, обладающего стимулирующим действием на репаративные процессы кожи.

2. Способ получения вещества, обладающего стимулирующим действием на репаративные процессы кожи, заключающийся в том, что штамм *Trichosporon kashiwayama* FERM-P 4821 выращивают в питательной среде, содержа-

щей глюкозу 0,3% (мас./об), сывороточное молоко 0,5% (мас.об), дрожжевой экстракт 0,05% (мас.об), при pH 4,0-6,0 и температуре 20-30°C, в аэробных условиях, затем отделяют биомассу в стерильных условиях и полученный стерильный фильтрат при необходимости концентрируют и/или высушивают.

Редактор Н.Киштулинец

Составитель Г.Смирнова  
Техред Л.Олейник

Корректор А.Тяско

Заказ 3398/58

Тираж 499

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР  
по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4

