УКРАЇНА

(19) UA (11) 67205 (13) U

(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під відповідальність власника патенту

(54) ПОЛІШТАМОВА БАКТЕРІАЛЬНА СУБСТАНЦІЯ З ПРОБІОТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

1 2

(21) u201108218
(22) 30.06.2011
(24) 10.02.2012
(46) 10.02.2012, Бюл.№ 3, 2012 р.
(72) СТАРОВОЙТОВА СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ОРЯБІНСЬКА ЛАРИСА БОРИСІВНА, ГОРЧАКОВ ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ, ДУГАН ОЛЕКСІЙ МАРТЕМ'ЯНОВИЧ
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ "КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ"
(57) Поліштамова бактеріальна субстанція з пробіотичними властивостями на основі високопробіотичних штамів роду Lactobacillus, які знаходяться у певному співвідношенні - L. delbrueckii subsp. bulgaricus LB86 ВКПМ-В-5788: L. delbrueckii subsp. delbrueckii DSM20074: L. rhamnosus LB3 IMB B-7038: L. rhamnosus V®: L. acidophilus (C) - 1:2:1:1:1, кінцева концентрація штамів у субстанції - 1 x 10^9 КУО/мл, яка характеризується синергізмом основних пробіотичних властивостей порівняно з окремими штамами, що входять до її складу: стійкість до агресивних умов шлунково-кишкового тракту, висока антагоністична активність по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, адгезивна активність, помірне кислотоутворення, антибіотикорезистентність та має додаткові властивості: антимутагенну, гіпохолестеринемічну, протеолітичну, здатність до сорбції та виведення з організму хазяїна іонів важких металів, імуномодулюючу та противірусну.

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості, а саме до отримання поліштамової бактеріальної субстанції з пробіотичними властивостями на основі бактерій роду Lactobacillus, і може бути використана у виробництві бактеріальних препаратів з пробіотичними властивостями.

Найбільш близьким до заявленої субстанції аналогом є пробіотик "Симбітер-2" [Патент UA №28040, А23С 9/12, C12N 1/20, 2000].

Пробіотик, що отримується даним способом, володіє високою антагоністичною активністю по відношенню до широкого кола умовно-патогенних мікроорганізмів, помірним кислотоутворенням, високою врожайністю клітин, високою адгезивністю та вітамін-синтезуючою здатністю. Недоліком відомого пробіотику є те, що він зовсім не проявляє антимутагенної та гіпохолестеринемічної активності, не володіє здатністю до накопичення зовнішніх протеолітичних ферментів та сорбцією іонів важких металів, а також імуномодулюючою та противірусною активністю.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення поліштамової бактеріальної субстанції з стійкими терапевтичними властивостями та розширення спектра терапевтичної дії за рахунок додаткових корисних активностей, а саме: антимутагенної, гіпохолестеринемічної, протеолітичної дії, сорбції іонів важких металів, імуномодулюючої та противірусної властивостей. Поставлена задача вирішується тим, що до складу субстанції відібрано п'ять високопробіотичних штамів бактерій роду Lactobacillus, які знаходяться у певному співвідношенні - L. delbrueckii subsp. bulgaricus LB86 ВКПМ-В-5788: L. delbrueckii subsp. delbrueckii DSM20074: L. rhamnosus LB3 1MB B-7038: L. rhamnosus V®: L. acidophilus (C) - 1:2:1:1:1, кінцева концентрація штамів у субстанції - 1*10^9 КУО/мл. Це співвідношення штамів відповідає за високі показники пробіотичних властивостей розробленої субстанції. Всі штами виділені від здорових людей, стійкі до агресивних умов шлунково-кишкового тракту людини (шлунковий сік, низький рівень pH, ферменти травлення) (на фіг. 1 та 2 наведено виживання лактобактерій (%) під дією різноманітних агресивних умов шлунково-кишкового тракту), володіють високою антагоністичною активністю по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів за рахунок синтезу ряду біологічно активних сполук (бактеріоцини, органічні кислоти, лізоцим, перекис водню), належать до високоадгезивних, характеризуються помірним кислотоутворенням. Штами володіють антибіотикорезистентністю по відношенню до широкого кола сучасних хіміотерапевтичних засобів, це дає можливість використовувати їх як препарати супроводу під час антибіотикотерапії. Відібрані штами во-

(19) UA (11) 67205 (13) U

лодіють гіпохолестеринемічною активністю, тобто здатністю знижувати рівень сироваткового холестерину. Штами володіють високим рівнем накопичення зовнішніх протеолітичних ферментів, що вказує на можливість їх застосування при розладах травлення, пов'язаних з недостатністю відповідних ферментів в організмі хазяїна, а також для зміни імуногенності чужорідних білків шляхом їх протеолізу. Штами, що увійшли до складу субстанції, не мають потенційної мутагенної активності, а також володіють високими антимутагенними властивостями (на рівні 58,43-99,03 %). Вони проявляють високий десмутагенний ефект. Відібрані штами не проявляють антагоністичної активності по відношенню один до одного, а навпаки характеризуються симбіотичними взаємовідносинами у суміші. Усі пробіотичні ефекти відібраних штамів наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Властивості штамів бактерій роду Lactobacillus, що входять до складу субстанції.

Показник	Штами лактобактерій				
	L. rhamnosus LB3 IMB B-7038	L. acidophilus (C)	L. delbrueckii subsp. bulgaricus LB86 BKIIM-B-5788	L delbrueckii subsp. delbrueckii DSM20074	L. rhamnosus V®
Антагонізм, мм E. coli	42,3±0,51	36,1±1,05	37,9±1,23	36,6±1,21	31,2±1,25
P. fluorescens	30,4±1,0	24,2±0,83	27,8±0,94	26,8±0,97	29,8±1,03
A. colcoaceticus	35,3±0,73	32,3±0,99	20,9±0,71	21,2±0,83	31,3±1,18
S. marcescens	36,4±1,12	19,2±0,52	38,2±0,99	27,8±0,79	33,4±1,22
B. linens	30,7±1,09	28,8±0,74	22,8±0,85	23,1±0,67	34,2±1,07
B. mycoides	30,5±0,95	35,1±1,22	34,7±1,13	32,4±1,18	30,3±1,19
B. megaterium	33,2±1,21	20,1±1,07	26,1±0,97	34,3±1,21	24,3±0,98
B. subtilis	34,1±,18	28,4±0,98	20,9±0,81	29,8±0,99	30,7±1,14
B. cereus	37,7±2,07	33,4±0,83	37,8±1,13	38,3±1,22	30,4±1,17
S. citreus	37,5±1,17	34,6±1,15	34,0±1,15	36,1±1,25	36,4±1,15
S. aureus	37,6±1,32	33,7±1,20	34,7±1,24	32,4±1,18	32,5±1,23
N. carollina	22,3±1,16	27,4±0,85	31,1±1,18	20,3±0,76	30,3±1,26
S.flava	20,3±0,92	28,6±0,91	34,1±1,11	33,9±1,08	33,4±1,29
Кислотоутворення,°Т	210,8±4,75	193,8±5,81	170,0±7,81	178,5±6,33	197,2±5,45
Лізоцим-синтезуюча активність, мм	0	5	0	0	0
Адгезивність, IAM					
нативні еритроцити	5,08±0,23	3,23±0,11	4,93±0,17	5,09±0,25	6,57±0,28
формалізовані еритроцити	4,21±0,18	3,34±0,08	4,16±0,18	4,93±0,22	6,0±0,29
Антибіотико резистентність, зони затримки росту, мм					
бензилпеніцилін	2±0,07	0	0	11±0,52	3±0,12
ампіцилін	0	0	0	0	0
амоксицилін	0	0	4±0,11	13±0,59	7±0,35
цефазолін	0	0	0	11±0,55	5±0,21
амікацин	0	0	0	6±0,28	0
гентаміцин	4±0,13	0	9±0,44	11±0,49	7±0,36
стрептоміцин	7±0,34	0	3±0,08	7±0,31	0
лінкоміцин	17±0,75	5±0,22	9±0,24	25±1,14	13±0,54
доксициклін	0	0	0	9±0,38	7±0,32
левофлоцин	4±0,17	0	2±0,06	5±0,24	0
левоміцетин	0	3±0,14	0	4±0,18	4±0,17
Антимутагенна дія, %	99,03±2,87	58,43±1,99	90,38±3,12	95,90±4,05	81,22±3,98
Протеаза, од/мг	637,04±17,13	339,13±15,01	74,82±2,34	492,5±9,81	70,84±3,42

Поліштамова бактеріальна субстанція отримується відомим способом, який описаний [Патент UA №28040, А23С 9/12, C12N 1/20, 2000], тільки відрізняється тим, що кожен із штамів бактерій культивується окремо, а потім культури змішуються у певному співвідношенні зазначеному вище.

Конструювання поліштамової бактеріальної субстанції ґрунтується на тому, що для кожної особи, яка застосовує бактеріотерапевтичний препарат на її основі, створюються сприятливі умови для відбору з нього представників тих видів лактобактерій, які в його кишечнику знаходяться в дефіциті, а також поліштамові пробіотики концентрують в собі широкий спектр біотерапевтичних функцій.

На відміну від аналогу запропонована субстанція володіє додатковими властивостями за рахунок відібраних штамів: високою імуномодулюючою активністю, противірусною активністю, антимута-

генною та гіпохолестеринемічною активностями, а також здатністю до сорбції та, як наслідок, виведення з організму хазяїна іонів важких металів. Це вказує на можливість використання розробленої субстанції як потенційного пробіотику із здатністю до біосорбції та виведенню іонів важких металів з організму людини.

Розроблена субстанція в концентрації 10^6 кл/мл не токсична для моношару клітин тестикулів поросят ПТП, фібробластів мишей L-929 та спленоцитів та здатна стимулювати функціональну активність макрофагів перитонеального ексудату мишей in vivo та in vitro, підвищувати цитотоксичність природних клітин кілерів, має противірусну активність in vivo та in vitro та є не токсична in vivo та in vitro.

Приклад 1. Визначення здатності поліштамової бактеріальної субстанції сорбувати іони важких металів.

Спосіб здійснюється методом рентгено-флуоресцентного аналізу.

Використано розчини важких металів в концентраціях, що відповідають: гранично допустимій концентрації (ГДК) металу у воді, подвійній ГДК та потрійній ГДК.

Клітини лактобактерій вирощували у розчинах з відповідними металами при 37 °С протягом 2, 4, 8 та 24 год. для встановлення оптимального часу вилучення максимальної кількості іонів металів з розчину клітинами лактобактерій.

По закінченні інкубації біомасу вилучали центрифугуванням при 3000 об/хв. протягом 30 хв. та проводили рентгено-флуоресцентний аналіз. Результати наведені в таблицях 2, 3, 4, 5.

Таблиця 2

Сорбційна здатність субстанції лактобактерій по відношенню до іонів важких металів

Зразок	Концентрація іонів важких металів у розчинах культивування					
	2 ГДК Pb^{2+}		2 ГДК Cu^{2+}		2 ГДК Cd^{2+}	
	СЗ	КС	СЗ	КС	СЗ	КС
Субстанція лактобактерій	27,67±1,22	5,49±0,18	32,87±1,33	36,72±1,34	16,17±0,75	1,87±0,02

Примітка: сорбційна здатність (СЗ) - відсоток адсорбованих іонів металу з розчину по відношенню до внесеної концентрації іонів металу до розчину; коефіцієнт сорбції (КС) - відношення концентрації іонів металу, що адсорбували клітини до початкової концентрації іонів відповідного металу в клітинах (у %).

Таблиця 3

Здатність композиції лактобактерій сорбувати іони кадмію

Зразок	Концентрація іонів важких металів у розчинах культивування							
	20 ГДК Cd^{2+}		100 ГДК Cd^{2+}		200 ГДК Cd^{2+}		300 ГДК Cd^{2+}	
	СЗ	КС	СЗ	КС	СЗ	КС	СЗ	КС
Субстанція лактобактерій	86,33±3,97	3,64±0,15	30,34±1,43	36,52±1,72	25,33±1,11	42,11±1,94	16,84±0,69	99,38±4,51

Примітка: скорочення мають той самий зміст, що і в таблиці 2

Таблиця 4

Накопичення клітинами лактобактерій іонів важких металів

Штами лактобактерій	Концентрація іонів важких культивування металів в розчинах					
	2 ГДК Pb^{2+}		2 ГДК Cu^{2+}		2 ГДК Cd^{2+}	
	СЗ	К, %	СЗ	К, %	СЗ	К, %
Композиція лактобактерій	27,67±1,22	0,00	32,87±1,33	0,00	16,17±0,75	4,53±0,18
L. delbrueckii subsp. bulgaricus LB86	46,50±1,38	0,00	30,155±1,28	0,00	0,00	0,00
L.delbrueckii subsp.delbrueckiiDSM20074	30,17±1,29	0,00	19,54±0,88	0,00	0,00	0,00
L. acidophilus	0,00	0,00	20,245±0,97	0,00	14,67±0,59	64,37±2,74
L. rhamnosus V®	0,00	0,00	6,455±0,31	0,00	0,00	0,00
L. rhamnosus LB3	0,00	0,00	13,95±0,43	0,00	12,67±0,57	51,66±2,43
L plantarum (Лактобактерин)	0,00	0,00	3,00±0,09	0,00	0,00	0,00

Примітка: сорбційна здатність (СЗ) - відсоток адсорбованих іонів металу з розчину по відношенню до внесеної концентрації іонів металу до розчину; К % - відсоток іонів калію, що вийшли з клітини бактерій по відношенню до вихідної їх кількості у клітині.

Таблиця 5

Накопичення композицією лактобактерій іонів кадмію

Зразок	Концентрація іонів важких металів в розчинах культивування							
	20 ГДК Cd^{2+}		100 ГДК Cd^{2+}		200 ГДК Cd^{2+}		300ГДК Cd^{2+}	
	СЗ	К, %	СЗ	К, %	СЗ	К, %	СЗ	СЗ
Композиція	86,33±3,97	14,44±0,64	30,34±1,43	64,44±2,81	25,3±1,11	59,04±2,10	16,84±0,69	66,60±2,93

Примітка: скорочення мають той самий зміст, що і в таблиці 4.

Це вказує на можливість використання розробленої субстанції як пробіотика із здатністю до біосорбції та виведенню іонів важких металів з організму людини.

Приклад 3. Визначення противірусної активності поліштамової бактеріальної субстанції.

Спосіб здійснюється на моделі експериментального герпетичного менінгоенцефаліту на мишах Balb/c вагою 16-18 г. Мишей інфікували інтрацеребрально ВПГ-1 типу, дозою 100 ЛД50/0,025 мл (титр вірусу - 5 lg ЛД50). Композицію лактобактерій та препарат Лактобактерин тваринам вводили per os по 0,5 мл за схемами: 1) до інфікування та щодобово протягом 6 діб - профілактична схема введення; 2) через 24 години після зараження вірусом та протягом наступних 6 діб - лікувальна схема. Кожна схема лікування включала по 4 групи тварин: перша та друга групи тварин отримували композицію лактобактерій у концентрації 10^9 кл/мишу та 10^5 кл/мишу відповідно; миші третьої групи отримували Лактобактерин у концентрації 10^9 кл/мишу; контрольна група тварин - одержували фізіологічний розчин. Оцінку активності препаратів проводили шляхом порівняння летальності в дослідних та контрольних групах. Враховували: відсоток летальності тварин; кратність захисту (КЗ) - кратність зниження летальності тварин в дослідній групі порівняно з контролем; індекс ефективності (ІЕ) препарату.

Вивчення противірусної активності in vitro проводили на моделі вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) штам Індіана в дозах 10^1, 10^2, 10^3 інфекційної дози (ІД). На моношарах перевивної культури фібробластів мишей L-929 та культурі тестикулів поросят ПТП. Для цього на моношар клітин вносили препарати у концентраціях 10^3 кл/мл, 10^6 кл/мл та 10^9 кл/мл, а потім додавали ВВС. Результати наведені в таблиці 6.

Таблиця 6

Протективна субстанції при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті у мишей

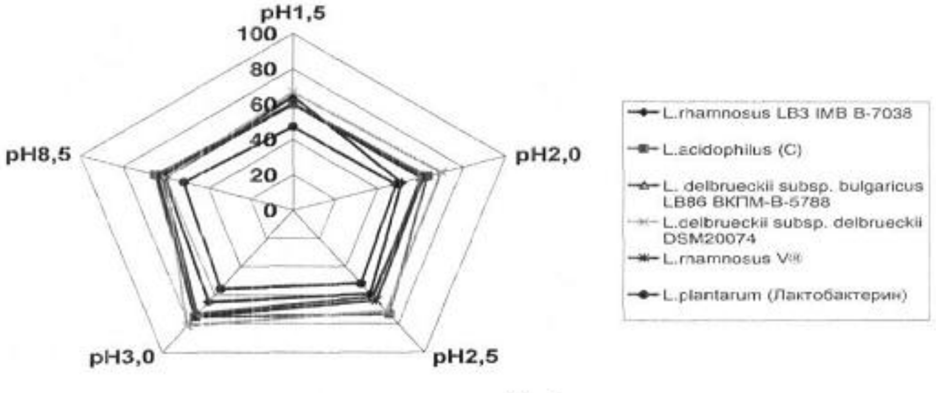
Препарат	Доза, кл/мишу	Кількість тварин	Летальність		КЗ	ІЕ
			всього	%		
Профілактична схема введення препаратів						
Субстанція лактобактерій	1×10^5	10	8	80	1,25	37,5
Субстанція лактобактерій	1×10^9	10	5	50	2,0	50,0
Лактобактерин	1×10^9	10	7	70	1,4	28,0
Лікувальна схема введення препаратів						
Субстанція лактобактерій	1×10^9	12	8	66,6	1,5	33,3
Субстанція лактобактерій	1×10^5	10	7	70,0	1,43	30,0
Лактобактерин	1×10^9	12	7	58,3	1,7	41,17
плацебо		10	10	100	-	-

Таким чином, отримано поліштамову бактеріальну субстанцію з пробіотичними властивостями, що володіє наступними перевагами в порівнянні з відомим аналогом: високі пробіотичні властивості, висока імуномодулююча активність, противірусну активність, антимутагенна та гіпохолестеринемічна (здатність знижувати рівень сироваткового холестерину в організмі хазяїна) активності, протеолітична дія, а також здатністю до сорбції та, як наслідок, виведення з організму хазяїна іонів важких металів. Також експериментально доведено повну нешкідливість розробленої субстанції для організму хазяїна в дослідах in vitro та in vivo. Характеристика поліштамової субстанції наведена в таблиці 7.

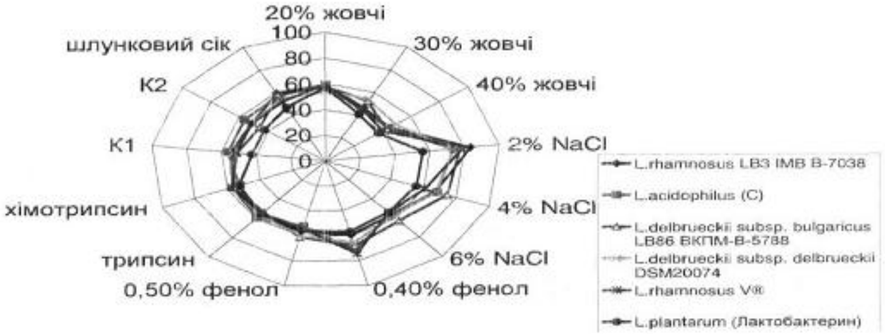
Таблиця 7

Характеристика поліштамової субстанції

Показники	Характеристика субстанції
Концентрація живих бактеріальних клітин, КУО/мл	$1*10^9$
Антагоністична активність (зона затримки росту тест культур), мм	
Staphylococcus aureus	39,0±1,20
Staphylococcus citreus	38,0±1,15
Salmonella typhimurium TA 100	41,0±1,22
Klebsiella pneumonia	39,0±1,15
Serratia marcescens	37,0±1,15
Escherichia coli	32,0±1,15.
Bacillus subtilis	38,0±1,20
Індекс адгезивності	5,31
Титр сироваткого інтерферону, од/мл	
на 6-ту годину	
на 24-ту годину	3,7 $\log_2$
	3,0 $\log_2$
Титр циркулюючого інтерферону, од/мл	4,2±0,5 $\log_2$
Концентрація фактору некрозу пухлин-α, нг/мл	
на 6-ту годину	
на 24-ту годину	1,1
	0,8
Фагоцитарне число, %	
на 1-шу добу спостереження	57,2±2,2
на 3-тю добу спостереження	57,5±2,3
на 5-ту добу спостереження	57,4±2,2
Фагоцитарний індекс, ум. од.	
на 1-шу добу спостереження	5,8±1,6
на 3-тю добу спостереження	5,7±1,3
на 5-ту добу спостереження	5,8±1,6
Індекс цитотоксичності, %	39,7
Індекс ефективності при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті у мишей	50,0



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський Підписне Тираж 23 прим.

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