



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92983** (13) **C2**
(51) **МПК-2011.01**
C12N 1/20
C12R 1/225 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ШТАМ LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS IMB B-7281 - АКТИВАТОР ФАГОЦИ-
ТИВ**

1

(21) a200907302
(22) 13.07.2009
(24) 27.12.2010
(46) 27.12.2010, Бюл.№ 24, 2010 р.
(72) СПІВАК МИКОЛА ЯКОВИЧ, ПІДГОРСЬКИЙ
ВАЛЕНТИН СТЕПАНОВИЧ, ШИНКАРЕНКО ЛЮ-
БОВ МИКОЛАЇВНА, ЛАЗАРЕНКО ЛЮДМИЛА МИ-
КОЛАЇВНА, ТИМОШОК НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВ-
НА, ГОРЧАКОВ ВОЛОДИМИР ЮРІЄВИЧ,
СТАРОВОЙТОВА СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА
(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ.
Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
НАУК УКРАЇНИ
(56) Козлов Л.В. Ростовцева Л.И. и соавт. Дейст-
вие на комплимент человека бластолизина, а так-
же гликопептидных (МДП, ГМДП) и углеводов
фрагментов пептидогликанов. Биоорганическая
химия. Том 11, №11, 1985 весь документ
UA64160A 15.02.2004 весь документ
UA63201A 15.01.2004 весь документ
Довідка з переліку депонованих у ВКПМ мікроор-
ганізмів про штам *Lactobacillus bulgaricus*.
[http://www.genetika.ru/vkpm/katalog-](http://www.genetika.ru/vkpm/katalog-mikroorganizmov/group_)
[mikroorganizmov/group_](http://www.genetika.ru/vkpm/katalog-mikroorganizmov/group_) весь документ
Довідка з переліку депонованих у ВКМ мікроор-
ганізмів про штам *Lactobacillus bulgaricus*.

2

http://www.sevin.ru/collections/microcoll/vkm_coll/bac-
[teria_kl.html](http://www.sevin.ru/collections/microcoll/vkm_coll/bac-) весь документ
Довідка з переліку депонованих у IMB мікрооргані-
змів про штам *Lactobacillus bulgaricus*.
www.imv.kiev.ua/catalog/default.htm весь документ
G. Perdigon, M.E. de Macias, S. Alvarez, G. Oliver,
A.A. de Ruiz Holgado Effect of perorally administered
lactobacilli on macrophage activation in mice // Infect
Immun. - 1986. - 53(2). - P. 404-410. весь документ
Popova P., Guencheva G., Davidkova G, Bogdanov
A., Pacelli E, Opalchenova G., Kutzarova T., Koychev
C. Stimulating effect of DEODAN (an oral preparation
from *Lactobacillus bulgaricus* "LB51") on
monocytes/macrophages and host resistance to
experimental infections // Int. J. Immunopharmacol. -
1993. - 15(1). реферат
Пинегин Б.В., Андронova Т.М., Карсонова М.И.
INTERNATIONAL JOURNAL ON
IMMUNOREHABILITATION, No 6, JUNE
1997. Препараты мурамилдипептидного ряда -
иммунотропные лекарственные средства нового
поколения. весь документ
(57) Штам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*
IMB B-7281 - активатор фагоцитів.

Винахід відноситься до біотехнологічної про-
мисловості, а саме до одержання нового штаму
лактобактерій, який є активатором клітин фагоци-
тарної системи.

Насьогодні пробіотики, створені на основі ін-
дигенної мікрофлори шлунково-кишкового тракту,
зокрема лактобактерії, широко використовуються
для цілеспрямованої імунокорекції у хворих із різ-
ними нозологічними формами хвороб. Імуномоду-
лювальні властивості таких пробіотиків пов'язані,
насамперед, з їх впливом на фактори природжено-
го імунітету, в першу чергу, на клітини фагоцитар-
ної системи, які представляють антиген Т- та В-

лімфоцитами в процесі розвитку специфічної імун-
ної відповіді на патоген.

Тому пошук нових штамів лактобактерій, які
будуть впливати на функціональну активність
ефекторних клітин імунної відповіді, є одним із
ключових напрямків створення нових високоефек-
тивних пробіотичних препаратів для корекції імуні-
тету.

Запропонований штам *Lactobacillus delbrueckii*
subsp. bulgaricus IMB B-7281, який підвищує функ-
ціональну активність клітин фагоцитарної системи,
виділений самостійно в лабораторних умовах із
асоційованої культури під час лабораторних дос-
ліджень ферментованого біологічного матеріалу,

(13) **C2**

(11) **92983**

(19) **UA**

знаходиться в колекції живих культур Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

На Україні потреби у пробіотичних штаммах лактобактерій із імуномодулювальними та інтерферогенними властивостями задовольняються переважно за рахунок штамів закордонного походження.

Найбільш близьким до винаходу за результатами впливу на активність макрофагів є штами *Lactobacillus bulgaricus* CRL 423 (Center of Reference for Lactobacilli Culture Collection, Tucuman, Аргентина) [1] та *Lactobacillus bulgaricus* LB51 (DeoDan Laboratories Ltd, Болгарія) [2], однак запропонований нами штам відрізняється виразнішою імуномодулювальною активністю.

Культурально-морфологічні властивості.

Грампозитивні, факультативно анаеробні, нерухливі палички з округлими кінцями, які не утворюють спор. В неблагоприємних умовах культивування можуть набувати ланцюгову або звиту форму.

Штам вирощують при $38,0 \pm 1,0$ °C протягом 18-24 год на середовищі MRS або посівних середовищах № 1, 2 або на капустяному середовищі.

Склад середовища MRS:

пептон	10 г/л,
м'ясна вода	100 мл,
дріжджовий екстракт	10 г/л,
глюкоза	20 г/л,
K ₂ HPO ₄	2 г/л,
CH ₃ COONa	5 г/л,
амоній лимоннокислий	2 г/л,
MgSO ₄	0,2 г/л,
MnSO ₄	0,05 г/л,
твін-80	1 мл,
вода дистильована	до 1 л.

pH стерилізації дорівнює 6,6-6,8 (після стерилізації - 6,2-6,6). Для отримання більш щільного середовища MRS додають 2% агару. Можливо вирощувати штам на середовищі без твіну-80.

Модифіковане середовище MRS: в 200 мл дистильованої води розчиняють 0,05 г MnSO₄, 0,2 г MgSO₄, 0,2 г цистеїну, 2 г K₂HPO₄, 2 г цитрату амонію, 5 г CH₃COONa, 20 г глюкози, 10 г пептону. Додають також 1 мл твіну-80 (попередньо розчиняють окремо в невеликій кількості гарячої дистильованої води), 50 мл дріжджового автолізату, по 100 мл екстракту печінки та м'ясного екстракту. Об'єм рідини доводять дистильованою водою до 500 мл та додають 500 мл гідролізованого молока, pH дорівнює 6,2-6,8. Середовище фільтрують та стерилізують.

Склад посівного середовища № 1 (г/л): ферментаційний гідролізат харчових дріжджів 100 мг/мл NH₂⁺; сахароза - 10,0; CH₃COONa - 7,5; K₂HPO₄ - 3,0; MgSO₄ - 0,5; pH середовища до стерилізації дорівнює 6,5-6,8, дистильована вода додається до 1 л.

Склад посівного середовища № 2 (г/л): ферментаційний гідролізат соєвого шроту або муки - 1 л; NH₂⁺ - 0,5 мг/мл; дріжджовий екстракт - 2,0; NaCl - 3,0; K₂HPO₄ - 2,2; KH₂PO₄ - 1,7; MgSO₄ - 0,12; глюкоза - 5,0; pH дорівнює 6,7-6,8 (до стерилізації).

Склад капустяного середовища - 200 г ретельно подрібненої білокачанної капусти кип'ятять про-

тягом 10 хв в 1 л водопровідної води, проціджують через подвійний шар марлі, фільтрують через складчастий фільтр, додають 2% глюкози та 1% пептону.

Штам зберігається при 4°C на бульйоні, який містить 0,5% глюкози та 2% крейди. Пересівають культуру один раз на 1,5-2 місяці. Можливе довготривале зберігання (протягом 2 років і більше) у сублімованому стані в запаяних ампулах. Захисне середовище для ліофільного висушування: сахароза 10%, желатин 1%, pH $7,0 \pm 0,2$.

Фізіолого-біохімічні властивості.

Штам росте при 38 ± 1 °C протягом 18-24 год на поживному середовищі MRS та капустяному середовищі. Зберігає життєздатність на середовищі з широким діапазоном pH - від 2,5 до 9,6. Оптимальним значенням pH для початку росту є 5,5-6,5. Виживає після прогрівання при 63°C протягом 30 хв. Росте при температурах 40, 45 та 50°C, але не росте при 15 та 20°C. Не утворює слизь при рості на середовищі з сахарозою; зберігає життєздатність на середовищах із жовцю. Глюкозу ферментує без утворення вуглекислого газу. У рідкому середовищі MRS з 2% глюкози накопичує 0,330% молочної та 0,053% оцтової кислоти, не утворює етанол. Ферментує вуглеводи: глюкозу, фруктозу, галактозу, лактозу, сахарозу, фінозу. Слабко ферментує мальтозу, арабінозу. Не ферментує спирти та вуглеводи: целобіозу, глюконат, маніт, рамнозу, сорбіт, дульцит, ксилозу, інозит, інсулін, ескулін, корбозу, амігдалін, метил-D-глюкозид, гліцерин, декстрин.

Для свого росту потребує в амінокислотах та вітамінах, насамперед в рибофлавіні та біотині. Потребує іонів магнію та марганцю, які виконують роль активаторів бактеріальних протеїназ.

Штам є непатогенним.

Відношення до кисню: факультативний анаероб.

Відношення до температури: оптимальна температура для росту $38,0 \pm 1,0$ °C.

Штам довготривало зберігається (2 роки і більше) в сублімованому стані в запаяних ампулах. Захисне середовище під час ліофільного висушування: сахароза 10%/желатин 1%, pH $7,0 \pm 0,2$.

Імуномодулювальні властивості.

Результати проведених нами досліджень показали, що введення мишам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgtricus* IMB B-7281 per os призводило до зміни активності клітин фагоцитарної системи.

Після введення штаму підвищувалась здатність макрофагів перитонеальної порожнини до поглинання латексу. Показник фагоцитозу на 1, 6 та 12 добу підвищувався відповідно до $44,4 \pm 1,6$; $46,4 \pm 2,1$ та $45,8 \pm 1,8$ % проти $30,1 \pm 1,1$ % у контролі. Фагоцитарне число макрофагів на 3 добу зберігалось на рівні контролю, а 6 та 12 добу зросло суттєво - відповідно до $6,1 \pm 0,2$ та $7,3 \pm 0,1$ ум. од. порівняно з $4,4 \pm 0,2$ ум. од. у контролі.

Спостерігалась активація киснезалежної бактерицидної активності макрофагів, яку вивчали у тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест). На 1 добу встановлено підвищення кількості НСТ-позитивних макрофагів у спонтанному та

стимульованому НСТ-тесті відповідно до 59,8 і 1,9 та 68,0±1,2% (у контролі відповідно 42,0±4,3 та 59,7±1,5%). Виявлено тенденцію до підвищення показників спонтанного та стимульованого НСТ-тесту на 6 (49,6±2,2 та 60,3±2,5%) та 12 (44,3±2,7 та 55,0±2,4%) добу, однак різниця порівняно з контролем була невірогідною. Функціональний резерв макрофагів не змінювався порівняно з показниками контролю: на 1, 6 та 12 добу він дорівнював відповідно 8,2±0,5; 9,7±0,4 та 10,7±0,3% (у контролі 9,9±0,3%).

Отримані дані свідчать, що запропонований штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMB B-7281 підвищує функціональну активність клітин фагоцитарної системи.

Антагоністична активність. Запропонований штам має антагоністичну активність відносно музейних та клінічних штамів деяких бактерій. Так, під його впливом спостерігається затримка росту музейних штамів: *Staphylococcus aureus* B-918, *Staphylococcus aureus* B-917, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Staphylococcus aureus* 43, *Staphylococcus aureus* 8325, *Staphylococcus aureus* spp., *Staphylococcus epidermidis* B-919, *Enterococcus faecalis* B-915, *Escherichia coli* B-915, *Klebsiella pneumonia* B-920, *Pseudomonas*

aeruginosa B-900, *Candida albicans* Y-1918. Запропонований штам мав антагоністичну дію відносно таких клінічних штамів: *Staphylococcus epidermidis* 38 *Staphylococcus epidermidis* 14 *Staphylococcus aureus* Q394 *Pseudomonas aeruginosa* Q351 *Escherichia coli* 5921 *Enterococcus faecalis* 347 *Klebsiella oxytoca* *Candida albicans* 1763. Таким чином, запропонований штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMB B-7281 може знайти використання у харчовій промисловості при створенні харчових продуктів з оздоровчими властивостями та в медицині при створенні лікувальних, лікувально-профілактичних та профілактичних медичних і ветеринарних засобів.

Література

1. G. Perdtgon, M. E. de Macias, S. Alvarez, G. Oliver, A. A. de Ruiz Holgado Effect of perorally administered lactobacilli on macraphage activation in mice // Infect Immun. - 1986. - 53(2). - P. 404-410.
2. Popova P., Guencheva G., Davidkova G., Bogdanov A., Pacelli E, Opalchenova G., Kutzarow T., Koychev C. Stimulating effect of DEODAN (an oral preparation from *Lactobacillus bulgaricus* "LB51") on monocytes/macrophages and host resistance to experimental infections // Int. J. Immunopharmacol. - 1993. - 15(1). - P. 25-37.