

(19)



(10) **LT 3878 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3878**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 1/16**

(21) Paraiškos numeris: **IP1868**

C12N 9/96

A61K 37/48

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 02 02**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 04 25**

(72) Išradėjas:

Saulius Grigiškis, LT
Aldona-Ona Špokienė, LT
Egidijus-Vladas Baškys, LT
Kęstutis Vilutis, LT

(73) Patent savininkas:

Saulius Grigiškis, Stiklių g. 16-11, 2024 Vilnius, LT
Aldona-Ona Špokienė, Rinktinės g. 41-69, 2051 Vilnius, LT
Egidijus-Vladas Baškys, Tujų g. 17-8, 2000 Vilnius, LT
Kęstutis Vilutis, Konarskio g. 10-9, 2015 Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

K-91, UAB "Biocentras", LT

(54) Pavadinimas:

Fermentinis preparatas, lizuojantis mikroorganizmų ląsteles, jo gavimo būdas ir panaudojimas

(57) Referatas:

Sukurtas naujas fermentinis preparatas, gautas iš *Streptomyces flavus* 197 (deponuotas UAB "Biocentras", mikroorganizmų muziejaus kolekcijos numeris K-91) kulūros skysčio, jį filtruojant, koncentruojant ir iš koncentrato išsodintą organiniais tirpikliais fermentinį kompleksą džiovinant. Gautas fermentinis preparatas yra lizuojančių fermentų kompleksas, pasižymintis proteolitiniais, peptidaziniu, kolagenaziniu bei elastaziniu aktyvumais, efektyviai lizuojantis kai kuriuos gramteigiamus ir gramneigiamus mikroorganizmus, jų tarpe ir patogeninius. Fermentinis preparatas gali būti taikomas medicinoje ir veterinarijoje.

Išradimas priskiriamas mikrobiologijos sričiai. Jis gali būti taikomas biotechnologijoje, veterinarijoje bei medicinoje. Žinomi lizuojančių fermentų kompleksai, gaunami giluminiu būdu auginant *Actinomyces* kamienus, pvz. fermentinių kompleksas, sintetinas *Actinomyces* *levoris* Nr.96, lizuoja A grupės streptokokus, taikomas streptokokinių antigenų gavimui. Esminis šio fermentų komplekso trūkumas - siauras lizuojančio veikimo į mikroorganizmus spektras ir gana ilgas jo biosintezės laikas (2-6 paros). (Su aut. 1. Nr.528340)

Artimiausias siūlomam fermentiniam preparatui yra lizuojančių fermentų kompleksas, sintetinas *Streptomyces griseus* 205, kuris lizuoja streptokokus ir stafilokokus, naudojamas veterinarijoje streptokokinių, stafilokokinių infekcijų gydymui bei profilaktikai. Šio fermentinio komplekso trūkumas - ribotas lizuojantis veikimas į mikroorganizmus. Jis lizuoja tik gramteigiamas bakterijas (streptokokus ir stafilokokus) ir ši savybė mažina jo panaudojimo galimybes. (Su aut. 1. Nr.1112778)

Išradimo tikslas - sukurti naują kompleksinį fermentinį preparatą, efektyviai lizuojantį gramteigiamus ir gramneigiamus, jų tarpe ir patogeninius mikroorganizmus, tinkamą naudojimui medicinoje ir veterinarijoje.

Išradimo tikslas pasiekiamas sukuriant kompleksinį fermentinį preparatą, kuris gaunamas kultivuojant giluminiu būdu aktinomicetą *Streptomyces flavus* 197 (UAB "Biocentras", mikroorganizmų muziejaus kolekcinis numeris K-91). Fermentų komplekso išskyrimui kultūrinis skystis filtruojamas, filtratas garinamas, koncentratas džiovinamas purkštuvinėje džiovykloje arba fermentų kompleksas iš koncentrato išsodinamas acetonu santykiu 1:3 ir džiovinamas. Gautas fermentinis preparatas susideda iš lizuojančiu veikimu pasižyminčio fermentų komplekso, kuris naudojamas kovai su patogeniniais mikroorganizmais, ypačingai tais atvejais, kai infekcija atspari antibiotikams.

Kultūra *Streptomyces flavus* 197, sintetinanti lizuojančių fermentų kompleksą, išskirta iš dirvos Pietryčių Lietuvoje ir charakterizuojama sekančiomis savybėmis:

Morfolginės. Kultūros paviršinis micelis baltas arba bespalvis, vidutinis hifų storis 0,6-0,8 mikronų. Sporos ovalios arba pailgos, paviršius lygus.

Kultūrinės. Auginant kultūrą *Streptomyces flavus* 197 ant agarizuotos kukurūzinės terpės Nr.2, susiformuoja gausus micelis (paviršinis - baltas, o substratinis - šviesiai rudas). Ant agarizuotos avižinės terpės formuojasi baltas paviršinis ir smėlio spalvos substratinis micelis.

Fiziologinės. Aerobas, optimali augimo temperatūra $+(28-30)^{\circ}\text{C}$, pH 7,0-7,5. Silpnai hidrolizuoja krakmolą, pieną sutraukia ir peptonizuoja, želatiną suskystina. Asimiliuoja gliukozę, sacharozę, fruktozę, ksilozę, neįsisavina arba tik silpnai - manitą ir rafinozę.

Fermentinio preparato, mikroorganizmų ląsteles
lizuojančio fermentų komplekso,
gavimas iš *Streptomyces flavus* 197

Auginant *Streptomyces flavus* 197 giluminiu būdu sekančios sudeties terpėje (%): mikroorganizmų baltyminis-vitamininis koncentratas (BVK) - 0,75; fermentinis mikroorganizmų baltyminio-vitamininio koncentrato hidrolizatas - 0,25; natrio chloridas - 0,5; magnio sulfatas - 0,05; kreida - 0,5, po 24-36 kultivavimo valandų $28-30^{\circ}\text{C}$ temperatūroje išsiskiria lizuojančių fermentų kompleksas, kuris ardo kai kurių gramteigiamų ir gramneigiamų (jų tarpe ir patogeninių) mikroorganizmų ląstelių sienelės; kompleksas pasižymi proteolitinu, peptidaziniu, kolagenaziniu bei elastaziniu aktyvumu. Fermentų komplekso išskyrimui kultūrinis skystis *Streptomyces flavus* filtruojamas, filtratas koncentruojamas, $25-30^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, 2,5 karto tūrio atžvilgiu. Fermentų preparato gavimui fermentinis kompleksas iš koncentrato išsodinamas acetonu santykiu 1:3, dializuojamas ir džiovinamas.

Siūlomo fermentinio preparato - mikroorganizmų ląsteles lizuojančių fermentų komplekso iš *Streptomyces flavus* 197 veikimo į atskirus mikroorganizmus ir komplekso fermentinio aktyvumo palyginimas su žinomu fermentiniu kompleksu *Streptomyces griseus* 205 pateiktas 1 lentelėje.

Fermentų kompleksų, išskirtų iš kultūrų *Streptomyces flavus* 197 ir *Streptomyces griseus* 205, lizuojančio veikimo į mikroorganizmus ir kompleksų fermentinio aktyvumo palyginimas

Požymiai	Fermentų kompleksas	
	<i>Streptomyces flavus</i> 197	<i>Streptomyces griseus</i> 197
Mikroorganizmų gyvų lastelių lizavimas (%):		
<i>Bacillus subtilis</i> KP 340	25,50	0
<i>Micrococcus lysodeicticus</i>	40,4	0
<i>Staphylococcus albus</i>	71,2	68,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	72,0	60,2
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	48,6	50,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	50,3	45,2
<i>Streptococcus mutans</i>	37,1	25,0
<i>Streptococcus paracitrovorum</i>	65,2	60,0
<i>Clostridium perfringens</i>	35,0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48,4	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	28,9	0
<i>Escherichia coli</i> 078	35,0	0
<i>Escherichia coli</i> 12K	22,4	0
<i>Escherichia coli</i> M17	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15,8	0
<i>Candida utilis</i>	32,5	0
<i>Candida guilliermondii</i>	35,8	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0
<i>Aspergillus awamori</i>	0	0
<i>Penicillium funiculosum</i>	0	0
Komplekso fermentinis aktyvumas (v/g):		
proteolitinis (pH=7,2)	65±5	
proteolitinis (pH=9,5)	90±8	
peptidazinis	1200±5	
kolagenazinis	9500 mikro v/g	
elastazinis	9,5	

Preparato fermentinis aktyvumas buvo nustatomas sekančiais metodais: preteolitinis (GOST 202664.2-74), peptidazinis (Wachsmuth E.D., Fritze I., Cleidere G. (1966) Biochemistry, 5, p.179-182.), kolagenazinis (Kundu AK., ir kt. (1974) Indian J. Exper. Biol., t. 17, p.441-443.; Leach A.A, (1960) Biochem. J. Biol. Chem., t. 240, p. 3295-3304.), elastazinis (Norichara K. ir kt. (1965) J. Biol. Chem., t. 240, p. 3295-3304.) ir mikroorganizmų ląstelių lizavimas (Gascon, ir kt. (1968) Arch. Microbiol, t. 51, p. 155-162.).

Iš pateiktų 1 lentelėje rezultatų matyti, kad fermentų kompleksas *Streptomyces flavus* 197 pasižymi platesniu lizuojančio veikimo į mikroorganizmus spektru, lizuoja kai kurias gramteigiamas ir gramnegiamas bakterijas, jų tarpe patogeninius mikroorganizmus - ligų sukėlėjus. Tuo tarpu fermentų kompleksas *Streptomices griseus* 205 lizuoja tik streptokokų ir stafilokokų genties atstovus.

Ištirtas kamieno *Streptomyces flavus* 197 kenksmingumas su žiurkėmis, linijos Vistar ir pelėmis, linijos CC57W. Vidutinė virulentinė dozė VD_{50} nustatyta įvedant mikroorganizmų masę (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ir 10^{10} ląstelių vienam gyvuliukui) į pilvo ertmę ir į skrandį. Kiekvienoje grupėje buvo 12 pelių ir 12 žiurkių (6 patelės ir 6 patinai). Gyvuliukus stebėjo 30 dienų. Vidutinė virulentinė dozė VD_{50} *Streptomyces flavus* 197 pelėms ir žiurkėms sudaro daugiau 10^{10} mikroorganizmų vienam gyvuliukui. Pagal mikroorganizmų kamienų klasifikaciją *Strptomycies flavus* 197 yra nekensmingas ir gali būti priskirtas mažai pavojingų mikroorganizmų klasei (4 klasė), t.y. neturinčio bendro toksinio poveikio.

Ištirtas ir fermentinio preparato iš *Streptomyces flavus* 197 aštrus toksiškumas. Aštraus toksiškumo tyrimai atlikti su pelėmis linijos CC57W. Preparatą įvedėme į skrandį ir stebėjome 30 parų. Nustatyta, kad preparato LD_{50} , yra 5000 mg/kg. Sutinkamai su GOST 12.1.007-76 preparatas priskiriamas 4 pavojingumo klasei, t.y. mažai pavojingoms medžiagoms.

Atsižvelgiant į siūlomo kompleksinio fermentinio preparato, išskirto iš *Strptomycies flavus* 197, fermentinį aktyvumą bei lizuojantį veikimą į mikroorganizmus, jis buvo taikomas patogeninių mikroorganizmų, išskirtų iš ligonių nosiaryklės, dantų, pūlinių žaizdų, ardymui ir gauti teigiami rezultatai, taip pat preparatas efektyviai buvo taikomas nudegimų gydymui, nekrotinių audinių pašalinimui, pooperacinių randų lyginimui ir t.t.

Preparato pritaikymas gydymui

Gydymui preparatas paruošiamas sekančiai: 4-20 g preparato ištirpinama 100 ml distiliuoto vandens, po to praskiedžiamas 500 ml glicerolio ir gerai sumaišomas. Toks fermentinio preparato tirpalas buvo naudojamas ligonių gydymui.

Jis buvo naudojamas sekančiai: setonų arba tamponų pagalba buvo dedamas ant žaizdos paviršiaus arba įvedamas į pūlinio ertmę. Gilios pūliojančios žaizdos buvo setonuojamas marliniais tvarsčiais, sumirkytais fermentinio preparato tirpale. Ant nekrozių ir paviršinių žaizdų buvo dedami tirpalu sutepti marliniai tvarsčiai arba tepamas žaizdos paviršius. Ligoniai buvo perrišami kiekvieną dieną. Gydomo efektyvumas fermentiniu preparatu pateiktas 2 lentelėje.

2 lentelė

Gydymo efektyvumas fermentiniu preparatu

Žaizdos pobūdis	Ligonų skaičius	Gydymo trukmė	Teigiami rezultatai
Pūlinės žaizdos	14	3-5 dienos	100%
Nekrotinės žaizdos	9	5-8 dienos	100%
Nudegimai	8	3-5 dienos	100%
Šautinės žaizdos	5	4-6 dienos	80%
Pragulos	10	4-5 dienos	100%

Jokių alerginių reakcijų ligonų gydymo metu nepastebėta. Tokiu būdu siūlomas fermentinis preparatas gali būti taikomas medicinoje bei veterinarijoje.

Išradimo apibrėžtis

1.Kamienas *Streptomyces flavus* 197 (deponuotas UAB "Biocentras" Nr. K-91) - lizuojančiu veikimu pasižyminčio fermentų komplekso producentas.

2.Fermentinis kompleksas, išskirtas iš mikroorganizmų kamieno *Streptomyces flavus* 197, pasižymintis

- fermentiniais aktyvumais:

proteolitiniu (pH - 7,2 - 9,5),

peptidaziniu,

kolagenaziniu,

elastaziniu;

- substratiniu specifiškumu:

lizuoja sekančių mikroorganizmų sienelės:

Clostridium perfringens,

Candida utilis,

Pseudomonas aerogenosa,

stafilokokus,

streptokokus.

3.Fermentinio komplekso, gaunamo auginant mikroorganizmą giluminiu būdu, gavimo būdas, **besiskiriantis** tuo, kad augina mikroorganizmą *Streptomyces flavus* 197 terpėje su mikroorganizmų sienelėmis ir mikroorganizmų hidrolizatais, kultūrinį skystį kultivuoja 24-36 val. 28-30°C temperatūroje, po to kultūrinį skystį filtruoja, filtratą koncentruoja, iš susidariusio fermentinio koncentrato fermentinį kompleksą išskiria nusodinant acetonu, po to dializuoja ir džiovina.

4.Būdas pagal 3 punktą, **besiskiriantis** tuo, kad fermentinį kompleksą išskiria iš kultūrinio skysčio filtrato koncentrato, nusodinant acetonu santykiu 1:3.

5.Fermentinio preparato, skirto kovai su patogeniniais mikroorganizmais, gavimo būdas **besiskiriantis** tuo, kad fermentinį kompleksą, gautą pagal 3-4 punktus, ištirpina vandenyje santykiu 1:5 iki 1:25, ir gautą praskiestą fermentinio komplekso tirpalą vandenyje skiedžia gliceroliu santykiu 1:5.

6.Fermentinis preparatas gautas pagal 5 punktą, skirtas panaudoti dujinės gangrenos, nekrotinių žaizdų, šautinių žaizdų, randų, pragulų ir nudegimų gydymui.