



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 130663

(13) C2

(51) МПК

C12N 1/20 (2026.01)

C12R 1/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**(21)** Номер заявки: **а 2023 03434****(22)** Дата подання заявки: **13.07.2023****(24)** Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **09.04.2026****(41)** Публікація відомостей
про заявку: **15.01.2025, Бюл.№ 3****(46)** Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **08.04.2026, Бюл.№ 14****(72)** Винахідник(и):**Іваниця Володимир Олексійович (UA),
Гудзенко Олена Володимирівна (UA),
Підгорський Валентин Степанович (UA),
Варбанець Людмила Дмитрівна (UA),
Штеніков Микола Дмитрович (UA)****(73)** Володілець (володільці):**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА,
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082 (UA),
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ.
Д.К. ЗАБОЛТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
НАУК УКРАЇНИ,
вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143 (UA)****(56)** Перелік документів, взятих до уваги експертизою:

EP 431811 B1, 08.06.1994
CN 101113422 B, 15.06.2011
KR 19980056257 B1, 01.12.1999
US 20130196415 B2, 14.07.2015
AFIFAH D. N. Proteomics study of extracellular
fibrinolytic proteases from *Bacillus licheniformis* RO3
and *Bacillus pumilus* 2.g isolated from Indonesian
fermented food // 2nd International Conference on
Tropical and Coastal Region Eco Development 2016.
IOP Publishing. IOP Conf. Series: Earth and
Environmental Science. 2017. Vol. 55. P. 012025.
doi:10.1088/1755-1315/55/1/012025
FOOPHOW T. et al. Purification and Characterization
of a Novel Extracellular Haloprotease Vpr from
Bacillus licheniformis Strain KB111 // Food
Technology & Biotechnology. April-June 2022. Vol.
60. no. 2. P. 225. DOI: 10.17113/ftb.60.02.22.7301
SHLEEVA M. O. et al. *Bacillus licheniformis*: A
Producer of Antimicrobial Substances, including
Antimycobacterials, Which Are Feasible for Medical
Applications // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15. no.
1893 P. 1-44.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071893>
НІДЯЛКОВА Н.А. та ін. Оптимізація середовища
для синтезу фібриногенолітичної пептидази
Bacillus thuringiensis IMB B-7324 // Біотехнологія.
2012. Т.5. №4. С.74-81

**(54) ШТАМ BACILLUS LICHENIFORMIS - ПРОДУЦЕНТ ПОЗАКЛІТИННОЇ ПРОТЕЇНАЗИ З
ФІБРИНОГЕНОЛІТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ****(57)** Реферат:

Винахід належить до біотехнології, а саме до одержання протеолітичних ензимів з
фібриногенолітичною активністю за допомогою мікробного синтезу.
Запропонований штам-продуцент *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 дозволяє отримати з
культуральної рідини препарат з високою фібриногенолітичною активністю (8,6 од/мг білка).

UA 130663 C2

Ензимний препарат, одержаний з культуральної рідини *B. licheniformis* IMB B-8008, здатний ефективно деградувати фібриноген при значеннях рН середовища від 5,0 до 9,0 з максимумом активності при рН 8,0. Фермент стабільний при зазначених значеннях рН. Ензимний препарат ефективно гідролізує фібриноген за 37 °С.

Із глибинної культури запропонованого продуцента може бути одержаний ензимний препарат, придатний для застосування в медико-технологічних процесах.

Винахід належить до біотехнологічної промисловості, а саме до одержання нового штаму, продуцента фібриногенолітичної протеїнази.

Серед великої кількості ферментів особливий інтерес становлять фібриногенолітичні ензими. Фібриноген - білок плазми крові, попередник фібрину, волокна якого складають основу тромбу. Надмірне тромбоутворення призводить до розвитку тромбоемболічних захворювань з можливим летальним наслідком. Видалення тромбів з судин можливо хірургічно або ферментативно. Протеїнази з фібриногенолітичною активністю формують фрагменти фібриногену, які не полімеризуються під дією тромбіну і можуть розглядатися як основа для створення лікарських засобів, які запобігають згортанню крові та знижують артеріальний тиск. З цією метою застосовуються протеїнази тваринного, рослинного і мікробного походження з фібриногенолітичною активністю. Перевагу надають ферментним препаратам, які мають високу фібриногенолітичну активність.

Фібриногенолітична активність у мікроорганізмів зустрічається досить рідко. На сьогодні описані поодинокі штами з фібриногенолітичною активністю у *Bacillus* sp, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*.

Найбільш близьким до винаходу по технічній суті та результату, що досягається, є штам *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 [Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д. Оптимізація середовища для синтезу фібриногенолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324//Біотехнологія. - 2012. - Т. 5, № 4. - с. 74-81], при глибинному культивуванні якого в певних умовах можна отримати ензимний препарат з активністю 4,17 од/мг білка.

Недоліком відомого штаму є незначна швидкість росту і низький рівень фібриногенолітичної активності позаклітинного ферменту, що продукується.

Задачею, на рішення якої спрямовано винахід, що пропонується, є виділення нового штаму зі значною швидкістю росту, і який продукує позаклітинний фермент з високим рівнем фібриногенолітичної активності.

Поставлена задача вирішується завдяки використанню штаму *Bacillus licheniformis* IMB B-8008.

Запропонований штам *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 - продуцент позаклітинної протеїнази з фібриногенолітичною активністю, ізольований з донних осадів Чорного моря. Знаходиться в депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Основні характеристика штаму.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості.

Штам *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 добре росте на МПА. На МПА діаметр колоній через 72 години при +30 °С 2 мм, форма округла, дисоціація за кольором - білий та світло-сірий, край цілий, поверхня гладенька, по краях востає в агар. Клітини забарвлюються за Грамом позитивно. Паличкоподібні. Кінці заокруглені, довжина 1,3 мкм, ширина 0,3 мкм. Спори не здують спорангій, розташовані центрально, рідше субтермінально, вузькоеліптичної чи циліндричної форми. Спори в клітині розташовані центрально, спори не змінюють морфологію клітин. Утворення спор розпочинається на 18-24 год. культивування.

Ферментація джерел вуглецю: використовує глюкозу в аеробних умовах без утворення газу, дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера.

Асиміляція вуглеводів: штам не асимілює ерітрітол, D-арабінозу, L-ксилозу, D-адонітол, метил-β-D-ксилопіранозид, L-сорбозу, L-рамнозу, дульцитол, інозитол, D-сорбітол, інулін, D-меліцитозу, малонат, амілодекстрин, глікоген, ксиліт, D-ліксозу, D-фукозу, D-арабітол, L-арабітол, натрію глюконат, натрію 2-кетоглюконат, натрію 5-кетоглюконат.

Як джерела вуглецю культура використовує пептон, глюкозу, мальтозу, дріжджовий автолізат.

Штам росте на МПБ при концентрації хлориду натрію 7 %, не здатний рости при температурі 2 °С, не утворює сірководню, не утворює індол, редукує нітрати до нітритів, гідролізує желатин, ескулін.

Фізіолого-біохімічні властивості:

Відношення до вуглецевого живлення: культура *Bacillus licheniformis* синтезує позаклітинну фібриногенолітичну протеїназу на середовищах, що містять мальтозу, глюкозу та дріжджовий екстракт.

Відношення до азотного живлення: із органічних джерел азоту асимілює желатин, дріжджовий екстракт та дріжджовий автолізат, а з неорганічних (NH₄)₂SO₄ Найбільшу фібриногенолітичну активність забезпечує поєднання желатини, дріжджового автолізату та (NH₄)₂SO₄ як джерел азоту в середовищі.

Відношення до кислотності поживного середовища: культура росте в діапазоні pH від 5,0 до 8,0. Оптимальне вихідне значення pH середовища для синтезу ферменту становить 6,0.

Штам *Bacillus licheniformis* зберігається на косяках МПА при температурі +4 °С. Пересів культури необхідно здійснювати кожні 6 місяців.

Штам *Bacillus licheniformis* було ізолювано із донних осадів Чорного моря. Ідентифікація штаму проведена за визначником Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

5 *B. licheniformis* IMB B-8008 згідно отриманих у "гострих" дослідів результатів та відповідних нормативних матеріалів є авірулентним неінвазивним мікроорганізмом (ЛД₅₀ в/ч >1*10⁹, ЛД₅₀per_{os}>10*10⁹ клітин/мишу). Штам належить до IV класу небезпеки мікроорганізмів: "мало небезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії". Мікроорганізми цього класу небезпеки дозволені МОЗ України до використання у виробництві [Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсико-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів. Методичні вказівки МОЗ України. Київ, 2004.].

Відношення до кисню: факультативний анаероб.

15 Відношення до температури: мезофіл, оптимальна температура для росту та біосинтезу фібриногенолітичної протеїнази 25-28 °С.

Відношення до кислотності поживного середовища: культура росте в діапазоні рН від 5,0 до 8,0. Оптимальне вихідне значення рН середовища для синтезу ферменту становить 6,0, а в процесі росту та ферментації спостерігається зростання рН до 8,0.

20 Поживним середовищем для ферментації є середовище наступного складу, (г/л): КН₂РО₄-1,0; MgSO₄×7H₂O-0,75; ZnSO₄×7H₂O-0,25; (NH₄)₂SO₄-0,5; мальтоза - 1,0; желатина - 10,0; дріжджовий автолізат - 0,15; рН 6,0.

25 Вирощування бактеріальної культури проводять в глибинних умовах у пробірках або колбах Ерленмейера (750 мл) на качалці, що робить 244 об/хв (рівень аерації 16,76 мг О₂/л*год) при 28 °С впродовж 72 год. Засів поживного середовища здійснюють 5 % однодобовим інокулюмом. Після культивування клітини відділяють центрифугуванням (5000 g, 20 хв), ензиматичну активність визначають у супернатанті культуральної рідини.

30 Для визначення активності ензиму як субстрат використовують фібриноген. При вивченні фібриногенолітичної активності в дослідну пробірку додають 1 мг фібриногену, 1,8 мл 0,01 М Трис-НСІ-буфера (рН 7,5) і 0,2 мл розчину досліджуваного препарату. Реакційну суміш інкубують впродовж 30 хв за температури 37 °С. Реакцію зупиняють додаванням 2 мл 10 %-го розчину ТХУ. В контрольну пробу ТХУ додають відразу ж. Зразки витримують при кімнатній температурі 20 хв, а потім центрифугують 10 хв при 10000 g для видалення осажденного білка. Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі СФ-26 за поглинанням при 275 нм. За одиницю активності ензиму приймають таку його кількість, при використанні якої оптична

35 густина підвищується на 0,01 за 1 хв в умовах дослідів. Фібриногенолітична активність у супернатанті культуральної рідині штаму-продуцента *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 за цих умов складає 8,6 од/мг білка.

40 Перевагою запропонованого продуцента є його здатність синтезувати високоактивну протеїназу з фібриногенолітичною активністю, відсутність сезонності та токсичності, що є технологічно ефективним. Ензимний препарат, одержаний з культуральної рідини *B. licheniformis* IMB B-8008, здатний ефективно деградувати фібриноген при значеннях рН середовища від 5,0 до 9,0 з максимумом активності при рН 8,0. Фермент стабільний при зазначених значеннях рН. Ензимний препарат ефективно гідролізує фібриноген за 37 °С.

Винахід ілюструється наступними прикладами.

45 Приклад 1.

Спосіб отримання протеїнази з фібриногенолітичною активністю за допомогою штаму *B. licheniformis* IMB B-8008.

50 Культуру бактерії вирощували на м'ясо-пептонному агарі упродовж 18 год. Фібриногенолітичну активність визначали після культивування упродовж 72 год. при 28 °С на рідкому живильному середовищі наступного складу, (г/л): КН₂РО₄-1,0; MgSO₄×7H₂O-0,75; ZnSO₄×7H₂O-0,25; (NH₄)₂SO₄-0,5; мальтоза - 1,0; желатина - 10,0; дріжджовий автолізат - 0,15; рН 6,0.

55 Вирощування бактеріальної культури проводили в глибинних умовах у пробірках або колбах Ерленмейера (750 мл) на качалці, що робить 244 об/хв (рівень аерації 16,76 мг О₂/л*год). Засів поживного середовища здійснювали 5 % однодобовим інокулюмом. Після культивування клітини відділяли центрифугуванням (5000 g, 20 хв), ензиматичну активність визначали у супернатанті культуральної рідини. Фібриногенолітична активність у супернатанті культуральної рідині штаму-продуцента *Bacillus licheniformis* IMB B-8008 за цих умов складала 8,6 од/мг білка.

60 Білки культуральної рідини осаджували сірчаноокислим амонієм при 90 % насиченні на холоді. Після формування осадів їх відділяли центрифугуванням (5000 g, 30 хв). Осад білків

розчиняли в 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 8,5), видаляли нерозчинну частину осаду, розчин діалізували при 4 °С проти того самого буфера. Отриманий розчин зберігають в холодильнику при 4 °С. Для тривалого зберігання розчин ліофілізують.

Фібриногенолітичну активність визначають шляхом, описаним вище.

5 Приклад 2.

Порівняння способів отримання протеїнази з фібриногенолітичною активністю штаму *Bacillus licheniformis* IMB B-8008i і найближчого аналога - штаму *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 проводили за прикладом 1. Фібриногенолітична активність протеїнази в культуральній рідині за запропонованим способом в 2 рази вище, ніж у найближчого аналогу.

10 При глибинному культивуванні *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 в певних умовах можна отримати ензимний препарат з активністю 4,17 од/мг білка.

Таким чином, виділено новий штам - продуцент ферменту з фібриногенолітичною активністю, який, у порівнянні з відомими, є більш активним, має інші культуральні ознаки і є новою культурою зі стійкими біохімічними властивостями. Запропонований фермент може знайти використання у медико-технологічних процесах для створення лікарських засобів, спрямованих на зменшення загрози внутрішньосудинного тромбоутворення шляхом обмеженого протеолізу фібриногену, що циркулює у кровотоці пацієнта, а також може бути застосований для розщеплення внутрішньосудинних тромбів, що перешкоджають кровопостачанню органів за таких патологій як інфаркт міокарда, ішемічний інсульт, тромбоемболія легеневої артерії. В Україні на цей час високоактивні продуценти протеїназ з фібриногенолітичною активністю відсутні.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

25 Штам *Bacillus licheniformis* - продуцент позаклітинної протеїнази з фібриногенолітичною активністю, що зареєстрований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером IMB B-8008.