



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1732815 A3

(51)5 C 12 P 19/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

1

(21) 3770904/13  
(22) 26.07.84  
(31) 58-135982  
(32) 27.07.83  
(33) JP  
(46) 07.05.92. Бюл. № 17  
(71) Кабусики Кайся Эдванс Каихацу Кен-  
кюдзе (JP)  
(72) Ясуо Каваи и Казунага Язава (JP)  
(53) 577.114(088.8)  
(56) 1. Патент СССР № 929015, кл. C 12 P  
19/04, 1982.  
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГИПОТРИГЛИ-  
ЦЕРИДАЛЬНО-AKТИВНЫХ ПОЛИСАХА-  
РИДОВ  
(57) Изобретение относится к способу пол-  
учения физиологически активных полисаха-

2

ридов, которые могут найти применение в  
медицине. Целью изобретения является по-  
вышение активности целевого продукта.  
Способ заключается в том, что на бульоне  
Рогозы в аэробных условиях культивируют  
штамм *Streptococcus faecium* FERM BP-296  
или *Streptococcus faecalis* FERM BP-297,  
или *Streptococcus savium* FERM BP-298,  
или *Streptococcus salivallis* FERM BP-299,  
или *Streptococcus olivans* FERM BP-300, или  
*Streptococcus mitis* FERM BP-301, или  
*Streptococcus equinus* FERM BP-302, отде-  
ляют биомассу от культуральной жидкости  
с последующим выделением целевого про-  
дукта. Получаемые полисахариды обладают  
способностью снижать уровень триглицери-  
да в крови от 45 до 50%. 11 табл., 4 ил.

Изобретение относится к способам пол-  
учения гипоглицеридально-активных полисахаридов, т.е. полисахаридов, снижающих содержание триглицерида в крови млекопитающих.

Вещества подобного типа действия могут быть применены в качестве терапевтических препаратов против атеросклероза или гиперлипидемии, которые являются наиболее типичными заболеваниями людей среднего и пожилого возраста.

Известен способ получения физиологически активного полисахарида путем культивирования штаммов-продуцентов из рода *Pseudomonas* на соответствующей питательной среде и выделения из ферментаци-

онного бульона посредством фракционирования биополимеров [1].

Недостатком способа является недостаточная высокая физиологическая активность полисахарида.

Целью изобретения является повышение активности целевого продукта.

На фиг. 1-4 приведены хроматограммы, поясняющие предлагаемый способ.

Сущность способа получения гипотриглицеридально-активных полисахаридов состоит в том, что на питательной среде — бульоне Рогозы — в аэробных условиях выращивают штаммы-продуценты *Streptococcus faecium* FERM BP-296 или *Streptococcus faecalis* FERM BP-297, или *Streptococcus savium* BP-298, или *Streptococcus salivallis*

(19) SU (11) 1732815 A3

FERM BP-299, или *Streptococcus durans* FERM BP-300, или *Streptococcus mitis* FERM BP-301, или *Streptococcus equinus* FERM BP-302 до максимального наполнения целевого продукта, отделяют биомассу от культуральной жидкости и осуществляют выделение целевого продукта из культуральной жидкости или из биомассы после ее депротеинизации и дезинтеграции.

Наиболее общие примеры таких микроорганизмов сданы на хранение в Исследовательский институт ферментации (ИИФ, т.е. Международный центр хранения в соответствии с Будапештским соглашением) в Японии, а шифры хранения перечислены в табл. 1.

Микробиологические характеристики микроорганизмов, используемых в предлагаемом способе, являются такими же, что и микробиологические характеристики известных микроорганизмов, принадлежащих тому же классу, т.е. общие микробиологические характеристики, методы культивирования и другие свойства соответствуют характеристикам, описанным в Руководстве Берге по определительной бактериологии, 8-е изд.

Наиболее общие микробиологические свойства указанных штаммов приведены в табл. 2 и 11.

Указанные микроорганизмы можно культивировать известным методом. Например, бактериальные клетки могут быть получены при помощи стационарного культивирования в среде бульона Рогоза при аэробных условиях, затем бактериальные клетки отделяются при помощи центрифугирования культуры.

Состав среды бульона Рогоза следующий, г: триптиказа 10; экстракт дрожжей 5; триптоза 3;  $K_2HPO_4$  3;  $KH_2PO_4$  3; триаммоний цитрат 2; твин-80 1; глюкоза 20; хлоргидрат цистеина 0,2, кроме того, раствор соли ( $1 MgSO_4 \cdot 7H_2O$  11,5;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,68;  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  2,4; дистиллированная вода 100 мл) 1-5 мл и дистиллированная вода — до объема 1 л, (pH 7, стерилизация нагреванием до температуры 121 °C, которая поддерживается в течение 15 мин).

Получение полисахарида ПССТ.

Выращивание микроорганизмов. Каждый из указанных микробных штаммов, засевают на среду бульона Рогоза и инкубируют без перемешивания при 37°C в течение 5-10 ч при аэробных условиях, в результате чего получают культуральный бульон с некоторой концентрацией живых бактериальных клеток.

Культуральный бульон непрерывно подвергают центрифугированию со скоростью 12000 об/мин, а собранные бактериальные клетки затем промывают в соляном растворе (0,85% NaCl) 2 или 3 раза.

Разрушение бактериальных клеток. Промытые клетки суспендируют в физиологический соляной раствор и обрабатывают термическим способом при 115°C в течение 10 мин с целью их разрушения.

Бактериальные клетки, промытые и суспендированные в физиологический соляной раствор, разрушают при помощи обработки ультразвуком (15 кГц, 60 мин) французским прессом или другими известными способами.

Удаление жира из клеток. Суспензию разрушенных клеток смешивают со смесью хлороформ-метанол (2:1 об/об). Компоненты, экстрагируемые органическим растворителем, затем полностью удаляются при помощи центрифугирования со скоростью 300 об/мин в течение 10 мин, а слой хлороформа сливают.

Обработка протеолитическими ферментами. Обезжиренные пробы обрабатывают протеолитическими ферментами, такими как проназа, трипсин и пепсин при помощи известных процедур. Из этих протеолитических ферментов проназа является наиболее предпочтительной для этой цели. Условия обработки этим ферментом являются известными.

Очистка. В верхний слой после центрифугирования протеолитической реакционной смеси добавляют такие осаждающие агенты, как трихлоруксусная кислота или сульфат аммония с тем, чтобы протеиновая фракция выпала в осадок и ее можно было удалить. Фракцию верхнего слоя затем обрабатывают соответствующей нуклеазой или протеолитическими ферментами с тем, чтобы удалить составляющие нуклеиновых кислот, таких как ДНК и РНК или протеины фракции. После такой ферментной обработки несколько раз осуществляют диализ.

Частично очищенную фракцию затем снова подвергают другим процедурам очистки, таким как гелевая фильтрация и очистка с использованием хроматографической колонны. Чистая препаратия полисахарида, обозначаемого как полисахарид ПССТ, получается в конце последней стадии.

В общем случае этот полисахарид ПССТ может быть получен в соответствии с его физико-химическими характеристиками при помощи многочисленных процедур изоляции и очистки, которые уже давно широко используются в этой области техники, таких как осаждение-растворение и экстра-

кция, экстрагирование растворителем, диализ, применение хроматографической колонны, электрофорез, гелевая фильтрация или любая комбинация этих процедур. Таким образом, изобретение никоим образом не ограничивается какой-либо конкретной из упомянутых процедур.

Т.е. подготовка изобретения относится к способам получения активных продуктов, снижающих содержание триглицеридов в крови, которые состоят из полисахарида, и их получают из микроорганизмов, принадлежащих семейству *Streptococcus*, так как фармакологическая активность была обнаружена во фракции полисахарида.

Отметим, что активность по снижению содержания триглицерида в верхнем слое культурального бульона составляет примерно 1/5 от активности в бактериальной клетке.

Физико-химические и физиологические характеристики полисахарида ПССТ состоят в следующем.

Химическая природа и свойства растворимости. Тонко измельченная проба, полученная после обессоливания и сушки вымораживанием, является негигроскопичным белым порошком, обладающим высокой растворимостью (~100 мг/мл) в воде, но она только частично растворяется в этаноле, метаноле и ацетоне и совсем не растворяется в простом эфире и хлороформе.

Молекулярный вес. Молекулярный вес полисахарида ПССТ оценивается в примерно  $14000 \pm 3000$  и устанавливается при помощи гелевой фильтрации с использованием нескольких правовращающих материалов различного молекулярного веса в качестве индексов, и колонны Тойопеарл HW/55 (фирма Тойосодэ Ко., Лтд), уравновешенной при помощи 25 мМ трис-НСI буфера, содержащего 0,3М NaCl (pH 7,5).

Удельный показатель вращения. Удельный показатель вращения упомянутого полисахарида ПССТ в 1,8%-ном растворе,  $[\alpha]_D^{20}$ , равен + 190,1 (правое вращение). Этот показатель определяется при помощи поляриметра (модель ДИП-4, фирма Джапан Спектроскопик, Ко. Лтд.).

Сахарный состав. 4 мг пробы обрабатывают 0,2 М раствором ТФК (трифторуксусной кислоты) при 100°C в течение 7 ч, а триметилсилилирование осуществляют следующим образом: пробу смешивают с 0,2 мл гексаметилдисилазана (20% в пиридине) и 0,02 мл триметилхлорсилана, смесь перемешивают в течение 15 мин и после отстаивания в течение 5 мин подвергают газовой хроматографии с целью определения содер-

жания глюкозы, рамнозы и т.д. Температура колонны разделения составляет 179°C. Содержание уроновой кислоты определяют с использованием метода карбазол- $H_2SO_4$  (модифицированный метод Биттера-Муира).

Состав сахаров полисахарида ПССТ следующий, %: глюкоза 70,3; рамноза 13,7; уроновая кислота 16,0.

Кислотно-основные характеристики. pH 0,1 и 0,5%-ного раствора полисахарида ПССТ составил 6,71.

Спектр инфракрасного поглощения. Инфракрасный спектр поглощения полисахарида ПССТ, полученный с использованием инфракрасного спектрометра (модуль IASLO A 302, Джапан Спектроскопик Ко, Лтд), приведен на фиг. 1, где по осям абсцисс и ординат отложены длина волны и пропускание соответственно.

Элементарный анализ. Элементарный анализ при помощи элементарного анализатора (модель 240 В, Перкин-Элмер) дал следующий результат: С 37,2%, Н 6,4% и О 56,4%, для полисахарида ПССТ. Упрощенная формула имеет следующий вид  $C_{31}H_{64}N_{35}$ .

Температура точки плавления. Точка плавления полисахарида ПССТ составила 235–241°C, ее измеряют при помощи установки для измерения температуры точки плавления (модель Яанако МР-3, фирма Яанагимото Сейсакушо, Япония).

Физиологические характеристики. Полисахарид ПССТ является активным при применении с целью снижения содержания триглицерида в крови млекопитающего при стоматическом применении.

Эта активность является стабильной в области температур от -80°C до 115°C и при pH в области от 4,1 до 11, если даже полисахарид перед применением хранился.

Фармакологическое действие полисахарида ПССТ.

Фармакологические эффекты. Предлагаемый антиатеросклеротический препарат, содержащий предлагаемый полисахарид ПССТ, является в высшей степени эффективным при снижении содержания триглицерида в крови млекопитающих. В соответствии с этим предлагаемый препарат используется в качестве терапевтического или профилактического препарата при заболеваниях, связанных с атеросклерозом, гиперлипидемией, гиперлипопротеинемией, ксантоматозом, холецистолитизмом, гипертонией, диабетом и другими заболеваниями.

Предлагаемая композиция может быть применена к млекопитающим стоматическим, внутрибрюшинным внутривенным или любым другим способом. Количество

препарата в одной дозе должно составлять от примерно 1 мг до 0,5 г/кг веса тела. При стоматическом применении в предпочтительном варианте это количество в одной дозе составляет от примерно 0,01 мг до 100 мг/кг веса тела. Для применения лекарственного препарата может быть выбрана любая его форма: его можно применять в виде раствора в физиологическом соляном растворе или в других носителях, в виде инъекций, изготовленных при помощи лиофилизации и т.д., в виде суппозиторий, таблеток с покрытием, гранул, таблеток, капсул и т.д. с соответствующими носителями и разбавителями.

Острая токсичность. Указанная величина для предлагаемого полисахарида ПССТ составляет более 1200 мг/кг веса тела при внутривенном применении мышам. Предлагаемый материал является по существу нетоксичным при стоматическом применении.

**П р и м е р 1.** Получение и очистка полисахарида ПССТ. *Streptococcus faecium* ФЕРМ БП-296 прививают в 2 л среды бульона Рогоза с конечной концентрацией клеток  $1 \times 10^6$  бактерий/мл. Среду после прививки культивируют в течение 10 ч при 37°C без перемешивания в аэробных условиях с тем, чтобы в результате получить культуральный бульон с концентрацией клеток  $10^9$  бактерий/мл. Бактериальные клетки собирают при помощи непрерывного центрифугирования со скоростью 12000 об/мин, промывают физиологическим соляным раствором (0,85% NaCl) и суспендируют в такой раствор с тем, чтобы получить 100 мл суспензии клеток с концентрацией  $2 \times 10^{10}$  бактерий/мл.

Упомянутую суспензию бактериальных клеток обрабатывают при 115°C в течение 10 мин и обрабатывают 3 раза смесью хлороформ-метанол (2:1 в/в) с целью удаления жиров.

Обезжиренную суспензию бактерий подвергают центрифугированию со скоростью 3000 об/мин в течение 10 мин, а нижний слой, т.е. слой хлороформа, удаляют. Водный слой используют в качестве исходного материала на следующих стадиях очистки.

Исходный материал затем обрабатывают 20 мг проназы (сигма протеаза типа XIY) в 100 мл фосфатного буфера (pH 7,8), содержащего 0,0015 мг  $\text{CaCl}_2$ , при 47°C в течение 24 ч, а затем обрабатывают при помощи 10 мг проназы при тех же условиях.

Материал, обработанный проназой, разделяют на осажденную фракцию и фракцию верхнего слоя после отстаивания при

помощи центрифугирования со скоростью 3000 об/мин в течение 10 мин.

Во фракцию верхнего слоя добавляют 1/9 объема 100%-ного (в/о) раствора трихлоруксусной кислоты (ТХК), выдерживают при 4°C в течение 3 ч при перемешивании, а затем полученный материал подвергают центрифугированию при скорости 3000 об/мин в течение 10 мин, в результате чего получают осадок и верхний слой. В осажденную фракцию добавляют такой же объем 10%-ного раствора ТХК и повторяют описанную процедуру. Полученный верхний слой промывают 3 раза этиловым простым эфиром с целью удаления ТХК, растворяют в 50 мл дистиллированной воды, нейтрализуют 1 н. раствором NaOH, диализируют с целью полного удаления ТХК и, наконец, подвергают его лиофилизации с тем, чтобы получить 258 мг (сухой вес) фракции верхнего слоя.

Полученную фракцию верхнего слоя обрабатывают проназой, подвергают диализу, в результате чего получают 176 мг (сухой вес) диализированной фракции (МВ 3500). Диализированную фракцию в дальнейшем будем называть очищенной фракцией I.

Очищенную фракцию I подвергают фракционированию при помощи хроматографической колонны Сефадекс-Г-100 (фирма Фармация), уравновешенной буфером 0,05 М трис-HCl. Полученная в результате хроматограмма очищенной фракции I при скорости элюирования 1 мл/мин, приведена на фиг.2, где по абсциссе откладывают объем элюирования, а по оси ординат — концентрацию элюированного материала. Фракцию после 124 мл собирают и в дальнейшем будем ее называть очищенной фракцией II (сухой вес 93,6 мг).

На фиг.3 — приведена хроматограмма очищенной фракции II, которая была получена при помощи колонны Тойопеарал HW-55F, уравновешенной 25 mM буфера трис-HCl, содержащего 0,3 М NaCl.

Скорость элюирования составила 1 мл/мин. На фиг.3 кривые 1-3 представляют собой профили элюирования сахара, протеина и нуклеиновой кислоты соответственно.

Очищенный полисахарид ПССТ (87,9 мг сухой вес) выделяют при помощи отбора порции, элюированной в области фракций 80 ~ 100 мл.

На фиг.4 приведена хроматограмма полисахарида ПССТ при тех же экспериментальных условиях, которые были использованы для фиг.3.

В табл.3 приведен количественный выход протеина, который определялся ме-

тодом Лоури, РНК, который определялся методом орсинола, ДНК, который определялся методом дифениламина, и сахара, который определялся методом фенола- $H_2SO_4$  в каждом способе получения.

Удельная активность, приведенная в табл.3, указывает на относительную активность по снижению содержания триглицерида каждой фракции при испытании на крысах на единицу веса, причем активность термически обработанных бактериальных клеток равна 1. Методы анализа по определению активности снижения содержания триглицерида у животных описаны в примере 2.

Установлено, что полисахарид ПССТ может быть выделен и очищен из других бактериальных штаммов, перечисленных в табл.1, по аналогии с настоящим примером, но с меньшим выходом.

**П р и м е р 2.** Фармакологический эффект полисахарида ПССТ.

Активность по снижению содержания триглицерида.

1. Пробы физиологического раствора, содержащие эквивалент 16 мг/кг веса тела лиофилизованного полисахарида ПССТ, получают аналогичным образом. Эти пробы применяют стоматическим способом в ежедневной дозе 1 мл в крысам (возраст 18 недель, самцы, средний вес 246 г, 10 крыс в группе) и стерильным мышам (возраст 18 недель, самцы, средний вес тела 30 г, 10 мышей в группе). Крысы и мыши вскармливаются в течение 8–12 недель. Затем собирают артериальную кровь из абдоминальной аорты этих животных, а пробы сыворотки отделяют при помощи центрифугирования всей крови. Определяют содержание триглицерид ТГ ВАКО (фирма Вако Юниаке Ко, Лтд, Ацетил-ацетоновый метод).

Полученные результаты собраны в табл.4 (степень снижения по сравнению со значениями в контрольных группах, к которым описанная обработка не применялась).

Состав диеты, которая применялась на период вскармливания, приведен в табл.5.

2. Упомянутые пробы применяют орально стоматическим способом в ежедневной дозе 1 мл к обычным крысам (возраст 18 недель, самцы, средний вес животного 238 г, 15 крыс в группе) и к обычным стерилизованным мышам (возраст 18 недель, самцы, средний вес животного 31 г, 10 мышей в группе) в течение 4 недель. Содержание триглицерида в крови определяют в точности так же, как это было описано. Полученные результаты собраны в табл.6 (степень снижения по сравнению со значениями,

полученными для необработанной контрольной группы).

3. Физиологические соляные пробы, содержащие 4 мг/мл полисахарида ПССТ, применяют стоматическим способом в ежедневной дозе 1 мл на крысу в течение 2 недель к крысам, больным гиперлипидемией (возраст 18 недель, самцы, средний вес животного 250 г, 5 крыс в группе), которых вскармливают кормом, богатым холестерином. Содержание триглицерида в крови определяется в соответствии с приведенным описанием. Результаты собраны в табл.7.

Реакция на различные дозы. Физиологические соляные пробы, содержащие от 0,1 до 20 мг/мл полисахарида ПССТ, применяют стоматическим способом в ежедневной дозе 1 мл на обычную крысу (возраст 6 недель, самцы, средний вес животного 216 г, 5 крыс в группе) в течение 4 недель. Содержание триглицерида в крови определяют указанными методами (в качестве контрольной группы использовалась группа необработанных крыс). Полученные результаты собраны в табл.8.

Острая токсичность. Физиологические соляные пробы (0,5 мл/мышь), содержащие 1,10 и 100 мг полисахарида ПССТ, применяют внутрибрюшинным способом к мышам 1С (возраст 6 недель, средний вес  $31,6 \pm 0,6$  г, 10 животных в группе). Токсикологические наблюдения за мышами осуществляют в течение 14 дней. Контрольным материалом был физиологический соляной раствор.

Величина  $LD_{50}$ , рассчитанная в соответствии с методом Беренса-Кербера, составила более 1200 мг/кг веса животного. При стоматическом применении предлагаемый материал является по существу нетоксичным.

Фармацевтические композиции.

1. 25 мг очищенного полисахарида ПССТ тщательно перемешивают с 275 мг порошка очищенного крахмала, а затем из полученной смеси изготавливают таблетки для стоматического применения. Каждая полученная таким образом таблетка соответствует дозе в  $10^{-10}$  термически обработанных клеток/кг веса тела для взрослого пациента, имеющего вес в 50 кг.

2. Полисахарид ПССТ тщательно перемешивают с разбавителями, такими как карбонат кальция, лактоза и т.д., смазывающими материалами, такими как стеариновая кислота, тальк и т.д. и другими добавками, а затем из полученной смеси получают таблетки для стоматического применения. Ежедневная доза полисахарида

ПССТ в общем случае составляет от 01, до 100 мг/кг веса тела.

3. Полисахарид ПССТ (900 мг) суспендируют и растворяют в дистиллированной воде (30 мл), добавляют ароматизирующий сироп, а затем приготавливают композиции в виде сиропа.

Пример 3. Получение и очистка TP5-полисахарида.

*S. faecalis* FERM BP-297, *S. avium* FERM BP-298, *S. salivarius* FERM BP-299, *S. durans* FERM BP-300, *S. mitis* FERM BP-301, *S. equinus* FERM BP-302 инокулируют в бульон Рогоза (2 л) при конечной концентрации  $1 \times 10^6$  бактерий/мл. Засеянную среду инкубируют в течение 10 ч при 37°C без перемешивания при аэробных условиях до получения  $10^9$  бактерий/мл культурального бульона. Затем бактериальные клетки собирают при помощи непрерывного центрифугирования при 12000 об/мин, промывают физиологическим раствором (0,85% NaCl) и суспендируют в том же растворе до получения 100 мл суспензии клеток при концентрации  $2 \times 10^{10}$  мл.

Указанную бактериальную клеточную суспензию подвергают тепловой обработке при 115°C в течение 10 мин и трехкратной обработке смесью хлороформа и метанола (2:1 об/об) в целях удаления жиров.

Обезжиренную бактериальную суспензию центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин и нижний слой, т.е. слой хлороформа, отбрасывают. Водный слой используют в качестве исходного материала в последующей стадии очистки. Затем исходный материал обрабатывают 20 мг проназы (сигма проназа типа XIV) в 100 мл фосфатного буфера (pH 7,8), содержащего 0,0015 мг  $\text{CaCl}_2$ , в течение 24 ч при 47°C, а затем при тех же условиях обрабатывают 10 мг проназы.

Обработанный проназой материал разделяют на фракции преципитации и супернатанта путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин. Во фракцию супернатанта добавляют 1/9 объема 100 мас. %-ной трихлоруксусной кислоты (ТСА), оставляют с перемешиванием на 3 ч при 4°C, а затем центрифугируют при 300 об/мин в течение 10 мин для получения фракции преципитации и супернатанта. Фракцию преципитации дополняют тем же объемом 10% ТСА и повторяют указанную процедуру. Полученный супернатант 3 раза промывают этиловым эфиром для удаления

ТСА, растворяют в 50 мл дистиллированной воды, нейтрализуют 1н. NaOH, диализуют с целью полного удаления ТСА и, наконец, лиофилизируют для получения фракции супернатанта.

Полученную фракцию супернатанта обрабатывают проназой описанным способом и диализуют для получения диализованной фракции (MW > 3500).

Указанную очищенную фракцию фракционируют при помощи хроматографии на колонках с Сефадексом С-100, уравновешенным 0,05 М трис-HCl буфером.

Очищенный TPS полисахарид выделяют путем сбора элюированной части в 80-100 мл фракций.

Выход полисахаридов приведен в табл.9.

Физико-химические свойства TPS полисахарида являются такими же, как описанные.

Пример 4. Фармакологический эффект TPS полисахарида.

Указанные образцы были введены перорально при дневной дозе 10 мг/день/крыса стандартным крысам (самцам в возрасте 18 недель со средним весом 238 г, каждая группа содержала 15 крыс). Кровь животных анализировали на уровень триглицерида.

Степень снижения триглицерида приведена в табл.10.

#### Формулы изобретения

Способ получения гипотриглицеридально-активных полисахаридов предусматривающий выращивание штамма-продуцента на питательной среде, содержащей источники углерода, азота, фосфора, минеральные соли, биостимуляторы роста и воду, в аэробных условиях до максимального накопления целевого продукта, отделение биомассы продуцента с образованием потока культуральной жидкости и последующее выделение и очистку целевого продукта с его депротеинизацией, отличающийся тем, что, с целью повышения активности целевого продукта, в качестве штамма-продуцента используют штамм *S. faecium* FERM BP-296 или *S. faecalis* FERM BP-297, или *S. avium* FERM BP-298, или *S. salivarius* FERM BP-299, или *S. durans* FERM BP-300, или *S. mitis* FERM BP-301, или *S. equinus* FERM BP-302, в качестве питательной среды — бульон Рогозы, а выделение целевого продукта проводят из культуральной жидкости или из биомассы после ее депротеинизации и дезинтеграции.

Таблица 1

Штамм	Шифр хранения
<i>S. faecium</i>	FERM BP-296
<i>S. faecalis</i>	FERM BP-297
<i>S. avium</i>	FERM BP-298
<i>S. salivallis</i>	FERM BP-299
<i>S. durans</i>	FERM BP-300
<i>S. mitis</i>	FERM BP-301
<i>S. equinus</i>	FERM BP-302

Таблица 2

Штамм	Выход полисахарида TRS из 2,0 г подвергнутых тепловой обработке клеток, мг	%
<i>S. faecium</i> FERM BP-296	87,9	4,4
<i>S. faecalis</i> FERM BP-297	8,6	4,3
<i>S. avium</i> FERM BP-298	5,4	2,7
<i>S. salivallis</i> FERM BP-299	5,2	2,6
<i>S. durans</i> FERM BP-300	7,8	3,9
<i>S. mitis</i> FERM BP-301	1,6	0,8
<i>S. equinus</i> FERM BP-302	3,2	1,6

Таблица 3

Фракции	Выход, мг (сухой вес)	Содержание компонентов, мас. %				Удельная активность
		Белок	РНК	ДНК	Сахар	
Подвергнутые тепловой обработке клетки	2000	31,9	34,8	5,8	23,2	1
Всплывающий слой	258	14,1	1,8	Следы	76,3	7,1
Очищенная фракция I	176	2,8	1,6	—	95,6	10,2
Очищенная фракция II	93,6	2,1	0,9	—	97,0	12,3
Полисахарид	87,9	Следы	Следы	—	100	23,0

Таблица 4

Животные	Степень снижения, %
Обычные крысы (12 недель)	40,5
Обычные мыши (8 недель)	45,1
Стерилизованные мыши (8 недель)	39,6

Таблица 5

Компоненты	Содержание, мас. %
Казеин	20
Соевое масло	10
Пшеничный крахмал	61
Минеральные вещества	4
Витаминная смесь	2
Измельченная фильтрованная бумага	3

Таблица 6

Животные	Степень снижения, %
Стерилизованные мыши *	45,4
Обычные мыши*	41,6
Обычные крысы *	43,2
Обычные крысы **	42,0

\* Диета, обогащенная холестерином (добавление 1% холестерина в указанную диету)

\*\* Диета, обогащенная фруктозой (замена фруктозой всего количества пшеничного крахмала в указанной диете)

Таблица 7

Животные	Степень снижения, %
Обработанные животные	45,0
Контрольные животные	0

5

Таблица 8

Доза, мг/крысу	Степень снижения, % (в среднем)
Контрольная группа	0
0,1	< 10,0
1	17,4
10	43,0
20	48,2

Таблица 9

Штамм	Выход, %
<i>S. faecalis</i> FERM BP-297	4,3 (TRSa)
<i>S. avium</i> FERM BP-298	2,7 (TRSc)
<i>S. salivallis</i> FERM BP-299	2,6 (TRSc)
<i>S. durans</i> FERM BP-300	3,9 (TRSc)
<i>S. mitis</i> FERM BP-301	0,8 (TRSe)
<i>S. equinus</i> FERM BP-302	1,6 (TRSc)

Таблица 10

Образцы	Степень снижения, %
<i>S. faecalis</i> FERM BP-297	36,5
<i>S. avium</i> FERM BP-298	34,0
<i>S. salivallis</i> FERM BP-299	32,5
<i>S. durans</i> FERM BP-300	36,0
<i>S. mitis</i> FERM BP-301	35,0
<i>S. equinus</i> FERM BP-302	30,0

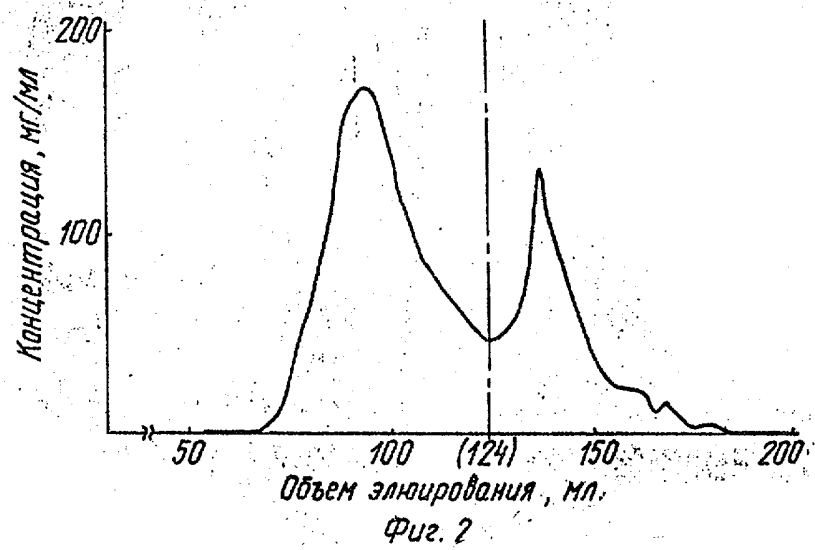
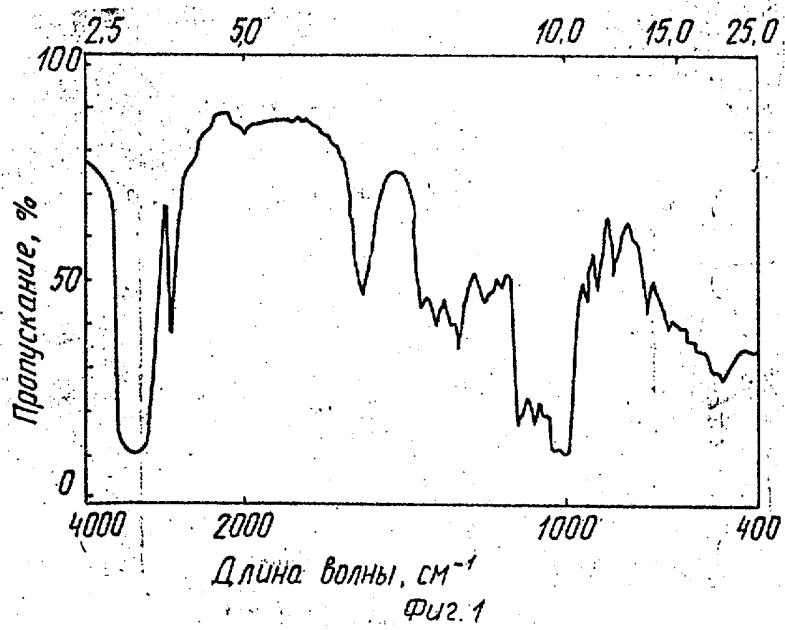


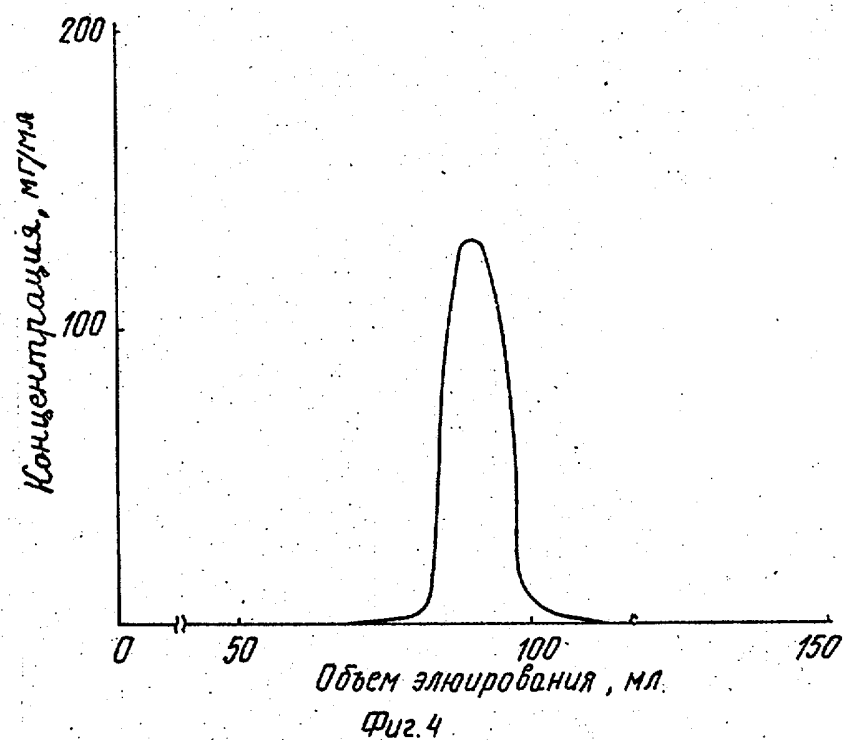
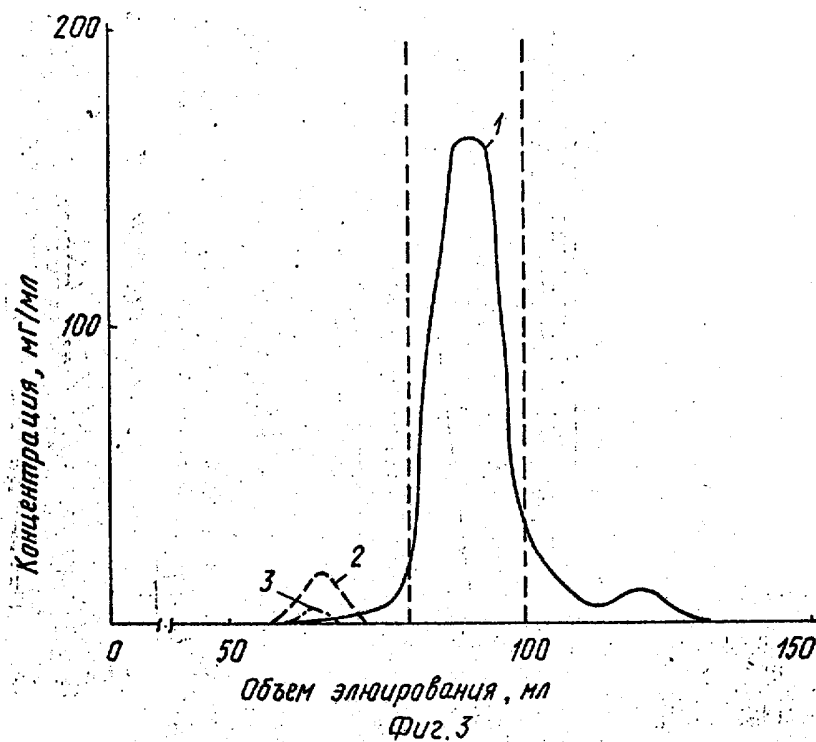
Т а б л и ц а 11

Характеристика	Штаммы FERM						
	BP-296	BP-297	BP-298	BP-299	BP-300	BP-301	BP-302
Форма клетки	Сфероид						
Размер клетки	0,5-1,0 мк в диаметре						
Соединение	Пары или цепи в жидкой среде						
Подвижность	-	-	-	-	-	-	-
Образование эндоспор	-	-	-	-	-	-	-
Каталаза	-	-	-	-	-	-	-
Оксидаза	-	-	-	-	-	-	-
Краситель по Граму	+	+	+	+	+	+	+
Гемолиз	-	-	-	-	-	-	-
Рост:							
при 10°C	+	+	±	-	+	-	-
при 45°C	+	+	+	±	+	±	+
при 50°C	+	2	2	2	+	-	-
Оптимальная температура для роста, °C	37	37	37	37	37	37	37
Теплоустойчивость при 60°C в течение 30 мин	+	+	+	-	+	-	-
Рост в культурной среде при pH 9,6	+	+	+	-	+	-	-
Способность восстановления метиленового голубого	+	+	-	-	+	-	-
Потребность в CO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-
Разжижение желатина	-	-	-	-	-	-	-
Рост в культурной среде, содержащей:							
NaCl (6,5%)	+	+	-	-	1	-	-
(40%)	+	+	+	-**	+	-	+
Продуктивность аммиака	+	+	-**	-	±	±	-
Гидролиз гиппуровой кислоты	-	±	-	-	+	-	-
Рост в культуральной среде, содержащей:							
теллурид	-	+	-	-	-	-	-
TTC*							
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
Эскулин	±	+	+	+	±	-	+
Инулин	-	-	-	±	-	-	±
Лактоза	+	+	+	+	+	±	-
Глицерин	-	+	±	-	-	-	-
Арабиноза	+	-	+	-	-	-	-
Мелецитоза	-	+	±	-	-	-	-
Сорбит	-	+	±	-	-	-	-
Антигенная группа	0/0/K/						
Источник	Фекалии человека						

\* 2,3,5-Трифенилтетразолхлорид.

\*\* Не производилось.





Редактор С. Пекарь      Составитель О. Скородумова  
 Техред М. Моргентал      Корректор Т. Палий

Заказ 1592      Тираж      Подписное  
 ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101