



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111319** (13) **U**
(51) МПК

A61K 35/741 (2015.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 03895	(72) Винахідник(и): Краснопольський Юрій Михайлович (UA), Хижняк Оксана Сергіївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 11.04.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.11.2016	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ "ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ", вул. Фрунзе, 21, м. Харків, 61002 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.11.2016, Бюл.№ 21	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СИНБІОТИЧНОГО БАКТЕРІАЛЬНОГО КОНСОРЦІУМУ ДЛЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНИХ ЦІЛЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб одержання синбіотичного бактеріального консорціуму для лікувально-профілактичних цілей включає сумісне глибинне культивування біфідобактерій та лактобацил і внесення пребіотичного компонента. Для сумісного глибинного культивування використовуються біфідобактерії штаму *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 II генерації та лактобацили штаму *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 V генерації у співвідношенні 1:3, пребіотичний компонент лактитол, який додають у кількості $1 \pm 0,1$ % під час культивування, та у кількості $1 \pm 0,1$ % разом із середовищем стабілізації, а під час сумісного культивування послідовно створюють оптимальні умови для накопичення біомаси кожного штаму, а саме початкове значення рН середовища $6,5 \pm 0,2$, температура протягом першої доби культивування становить $38 \pm 0,5$ °C; на другу добу - рН $7,0 \pm 0,2$, а температура становить $37 \pm 0,5$ °C.

UA 111319 U

Корисна модель належить до області одержання препаратів медичного призначення і може бути використана в біотехнології, медицині при створенні лікарських або профілактичних засобів чи біологічно-активних добавок (БАД), призначених для лікування чи профілактики дисбіотичних порушень шлунково-кишкового тракту (ШКТ) різної етіології.

5 В останні роки в Україні дуже гостро постала проблема захворювань ШКТ різної етіології. За оцінками медиків, від 75 до 90 % населення України тією чи іншою мірою страждають на дисбактеріоз. У результаті зниження рівня пробіотичних штамів, у тому числі біфідо- та лактобактерій порушуються процеси травлення, погіршується всмоктування речовин, засвоєння заліза та кальцію, синтез вітамінів, втрачається здатність до активізації різних ферментів, знижується стійкість мікрофлори кишечника по відношенню до умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів. Продукти метаболізму та токсини умовно-патогенних та патогенних бактерій знижують дезінтоксикаційну здатність печінки, пригнічують регенерацію слизового шару кишечника, гальмують перистальтику та призводять до розвитку діареї. Причиною цього є великий перелік факторів, серед яких головними є неконтрольоване використання антибіотиків та неякісних біологічних добавок, відсутність препаратів, які включають місцеві штамми пробіотичних бактерій, недостатнє і нераціональне харчування, шкідливі звички, психоемоційне перевантаження, швидкий ритм життя, надмірне використання пестицидів, харчових добавок, консервантів, барвників виробниками продуктів харчування.

20 Основним засобом профілактики і лікування захворювань ШКТ є препарати, які належать до групи пробіотиків, використання яких дозволяє покращити стан мікрофлори у кишечнику та на слизових оболонках організму людини, що приводить до загального покращення стану здоров'я, та попереджає розвиток цілого ряду хронічних захворювань.

25 Для створення пробіотичних препаратів широко використовуються найпоширеніші групи мікроорганізмів - біфідобактерії (рід *Bifidobacterium*) та лактобацили (рід *Lactobacillus*), а особливо їх консорціями, отримані змішуванням окремих штамів, оскільки вони впливають на різні локуси слизової кишечника. Однак, застосовуючи метод сумісного культивування, необхідно провести аналіз міжштамової взаємодії (симбіотичного ефекту) мікроорганізмів в умовах *in vitro* [1], оскільки ефективність бактеріальних препаратів визначається не лише сукупністю біологічних властивостей пробіотичних штамів, що входять до його складу, а й рівнем симбіотичної взаємодії.

30 Відомий спосіб одержання пробіотичного консорціуму, в якому розробники одним із шляхів підвищення ефективності вибирають багатовидовий склад останнього. Подібна методика використана у патенті [2], який стосується консорціуму на основі 9 штамів біфідобактерій *B.bifidum* 791, *B.bifidum* ЛВА-3, *B.longum* В379М, *B.longum* Я-3, *B.breve* 79-119, *B.breve* 79-88, *B.infantis* 73-15, *B.infantis* 79-43, *B.adolescentis* Г7513. Проте, вказаний патент не враховує того, що раціональний підхід до створення ефективного бактеріального препарату повинен бути заснований на максимальній спорідненості до біоценозу людини, який включає і лактобацили також. Тобто, препарати повинні представляти собою асоціації домінуючих мікроорганізмів, які максимально наближені за своїм складом до природної мікрофлори ШКТ людини.

40 Відомий також патент [3], в якому врахована необхідність застосування різних штамів бактерій. Лікувально-профілактичний бактерійний препарат на основі біфідобактерій і лактобацил отримують шляхом окремого культивування та висушування кожного штаму, з подальшим змішуванням сухих біомас бактерій та допоміжних речовин. Таке технологічне рішення не дає можливості отримання ефективного консорціуму бактерій з високими показниками активності, а лише містить різні штамми бактеріальних культур, які притаманні організму людини.

45 Відомий також засіб для корекції мікрофлори ШКТ людини, створений на основі консорціуму біфідобактерій і лактобацил (штами *B.bifidum*, *B.longum*, *B.adolescentis*, *L.acidophilus*, *L.plantarum*) [4]. Пробіотичний засіб представляє собою консорціум пробіотичних мікроорганізмів, ліофільно висушений для отримання бактеріального препарату або продуктів функціонального призначення. Недоліком зазначеного пробіотичного засобу є застосування інокулятив біфідобактерій у рівних співвідношеннях, без врахування симбіотичної взаємодії та особливостей кожного штаму; відсутність стимуляторів росту - пребіотиків у складі готового консорціуму та імовірність інактивації бактерій під час проходження через шлунок та дванадцятипалу кишку [4].

50 Найближчим аналогом вибрано пробіотичний препарат [5]. Відповідно до вказаного патенту, консорціум бактерій складається із кількох штамів біфідобактерій (*Bifidobacterium bifidum* OV-19, *B.bifidum* 791, *B.longum* В379М, *B.breve* OV-12, *B.infantis* 73-15) та кількох штамів лактобацил (*Lactobacillus helveticus* КЗш24, *L.helveticus* НК-1, *L.casei* КНМ-12). Консорціум отримують сумісним культивуванням штамів з урахуванням тривалості експоненційної фази росту кожного з

60

них, на основі чого встановлюють послідовність висіву на поживне середовище кожного з вказаних штамів.

1-ша генерація. Кожен штам бактерій окремо регідратують у 1 мл фізіологічного розчину і проводять десятикратне розведення у поживному середовищі до 10^7 - 10^8 та інкубують при температурі (37-38)°C протягом 36 годин.

2-га генерація. Кожну з культур із розведення 10^6 , 10^7 , 10^8 в об'ємі 3 % вводять до 30 мл поживного середовища і культивують протягом 7 годин при температурі (37-38)°C.

3-тя генерація. Кожну культуру висівають на поживне середовище і культивують протягом 17 годин при температурі (37-38)°C.

10 Культивування консорціуму. Вибір співвідношення посівних інокулятив біфідобактерій і лактобацил вибрано на основі даних про їх кількісні співвідношення в організмі людини - 100:1, тому біфідобактерії висівали у кількості 2 % від об'єму для кожного з п'яти штамів; лактобацили - 0,1 % від об'єму для кожного з штамів. рН середовища перед введенням біфідобактерій - 6,8, лактобацил - 6,0. Температура культивування протягом всього процесу 37 °C до рН середовища 3,9-4,3. Тривалість культивування консорціуму - 8-10 год.

15 Активність кислотоутворення консорціуму складала 210°Т, кількість КУО/мл - (8,6±0,2)·10⁹. Для покращення кількісного показника бактерій до поживного середовища введено пребіотичні компоненти інулін, олігофруктоза та аскорбінова кислота [5].

20 Однак, слід зазначити, що застосування великої кількості посівного матеріалу не приводить до високого показника титрованої кислотності, а забезпечує його на рівні, характерному для монокультури лактобактерій (180-220)°Т. При застосуванні 7-ми різних штамів, кількість КУО/мл становить лише - (8,6±0,2)·10⁹. Причиною такого показника може бути:

1) нераціональний вибір штамів без урахування симбіотичного ефекту. Автори посилаються на дані про кількісні співвідношення бактерій в організмі людини, не враховуючи симбіотичну взаємодію саме вибраних штамів;

2) незначний лакто- та біфідогенний ефект пребіотичних компонентів середовища (інулін, олігофруктоза, аскорбінова кислота);

3) процес культивування проходить при параметрах, що не враховують індивідуальні особливості культивування кожного виду бактерій;

30 4) процес культивування консорціуму нетривалий, внаслідок чого симбіотичний ефект не встигає проявитися.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб створення нового синбіотичного бактеріального консорціуму на основі штамів біфідобактерій і лактобацил, отриманих сумісним глибинним культивуванням з додаванням пребіотичного компонента з доведеною біфідо- та лактогенною дією.

35 Поставлена задача вирішується тим, що у способі одержання синбіотичного бактеріального консорціуму для лікувально-профілактичних цілей, що включає сумісне глибинне культивування біфідобактерій та лактобацил і внесення пребіотичного компонента, в якому, згідно з корисною моделлю, вноситься пребіотичний компонент разом із середовищем стабілізації, встановлено симбіотичний тип взаємодії бактерій у консорціумі, використано біфідобактерії штаму *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 II генерації та лактобацили штаму *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 V генерації у співвідношенні 1: 3, вибрано пребіотичний компонент з високою лакто- і біфідогенною дією, під час сумісного культивування послідовно створено оптимальні умови для накопичення біомаси кожного штаму, а саме початкове значення рН середовища (6,5±0,2), температура протягом першої доби культивування становить (38±0,5)°C; на другу добу - рН (7,0±0,2), температура (37±0,5)°C.

45 Одержаний симбіотичний консорціум відрізняється: 1) застосуванням найбільш відповідних представників мікробіоценозу кишечнику для мешканців України; 2) застосуванням експериментально доведеного продуктивного співвідношення бактерій; 3) вибором пребіотичного компонента з високою біфідо- та лактогенною дією; 4) умовами культивування з урахуванням індивідуальних особливостей кожного штаму.

На графічному зображенні наведена оптична густина біфідобактерій на середовищах з різними пребіотиками.

55 Можливість здійснення корисної моделі ґрунтується на основі висновків і досліджень, проведених за такими етапами:

1) попереднє дослідження кожного окремого штаму, вибір штамів для сумісного культивування по принципу біосумісності та симбіотичної взаємодії, вибір ростового поживного середовища для сумісного культивування з урахуванням ростових вимог кожного штаму. Для проведення досліджень було одержано штами біфідобактерій і лактобацил із ДНДІ ім. Л.А. Тарасевича. На вибраному поживному середовищі проведено глибинне культивування

наступних штамів бактерій: Bifidumbacterium bifidum ЛВА-3, Bifidumbacterium longum, Lactobacillus plantarum 8R-A3, Lactobacillus casei. На основі максимальних значень основних показників росту визначено штами для сумісного глибинного культивування. Для створення синбіотичного рідкого консорціуму було вибрано біфідобактерії штаму Bifidumbacterium bifidum ЛВА-3 та лактобацили штаму Lactobacillus plantarum 8R-A3.

2) Експериментальне встановлення співвідношення бактерій в інокуляті. Для цього різні співвідношення бактеріальних культур було висіяно на поживне середовище та визначено основні ростові показники. У дослідженні застосовано біфідобактерії II генерації та лактобацили V та VI генерації. Використання V та VI генерації лактобацил проводили з метою вибору оптимальної фази росту культури для сумісного культивування. Отримані результати наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Склад та основні ростові показники експериментальних зразків

Номер зразку	Співвідношення бактерій у інокуляті	Біфідобактерії		Лактобацили	
		К-сть живих бактерій, КУО/мл	Ак-сть кислотоутворення, °Т	К-сть живих бактерій, КУО/мл	Ак-сть кислотоутворення, °Т
1	1: 1	10 ¹²	210±5	6,27· 10 ⁹	343±10
2	1:2	10 ¹²	217±5	5,12· 10 ⁹	349±10
3	1:3	10 ¹²	228±5	5,28· 10 ⁹	367±10
4	2: 1	10 ¹²	221±5	2,10· 10 ⁹	359±10
5	3: 1	10 ¹²	218±5	1,80· 10 ⁹	355±10
6	Контроль лактобацил	-	-	3,84· 10 ⁹	393±10
7	Контроль біфідобактерій	10 ¹²	238±5	-	-
8	1: 1	10 ¹²	180±5	6,10· 10 ⁹	383±10
9	1:2	10 ¹²	195±5	6,89· 10 ⁹	365±10
10	1:3	10 ¹²	215±5	8,95· 10 ⁹	356±10
11	2: 1	10 ¹²	220±5	3,48· 10 ⁹	342±10
12	3: 1	10 ¹²	210±5	3,28· 10 ⁹	343±10
13	Контроль лактобацил	-	-	4,48· 10 ⁹	423±10
14	Контроль біфідобактерій	10 ¹²	220±5	-	-

*- зразки 1-7 містять лактобацили V генерації; зразки 8-14 - лактобацили VI генерації

За результатами проведених досліджень, було вибрано варіант № 3 із співвідношенням біфідобактерій: лактобацили = 1:3 із застосуванням лактобацил V генерації. Проведена мікроскопія свідчить про збереження основних морфологічних ознак кожного штаму при сумісному культивуванні. Високі ростові показники при сумісному культивуванні підтверджують факт симбіотичного типу взаємодії між досліджуваними пробіотичними культурами.

3) Додаткове введення стимулятора росту бактерій, пребіотики - лактитол. Введення пребіотичного компонента до складу заявленого засобу поліпшує умови для розвитку клітин за рахунок збагачення середовища ріст-стимулюючими і захисними факторами при одночасному доповненні складу препарату фізіологічно корисними компонентами. Наявність пребіотичного компонента допоможе бактеріям швидше відновитися при потрапленні в ентеральне середовище. Для підтвердження високої біфідо- та лактогенної дії пребіотики лактитол було проведено культивування вибраних штамів біфідобактерій та лактобацил з різними пребіотичними компонентами (фруктоза, інулін, лактулоза, лактитол) у кількості 1.7 % від загального об'єму середовища культивування. За даними результатів дослідження, найбільша фізіологічна активність культур проявлялася при внесенні до поживного середовища лактитолу і лактулози (графічне зображення). Інтенсивність росту бактерій визначали фотометричним визначенням оптичної густини зразків при довжині хвилі X=540 нм. Контролем порівняння було поживне середовище без бактерій.

Про переваги лактитолу і лактулози свідчили також високі значення основних показників росту (активність кислотоутворення та кількість живих бактерій).

Внесення пребіотичного компонента у поживне середовище культивування необхідне для продуктивного накопичення біомаси. Інтенсивність метаболічних процесів бактерій під час культивування приводить до трансформації цукрів в органічні кислоти, як кінцеві продукти метаболізму пребіотичних компонентів. Тому для підтримання бактерій під час відновлення у ентеральному середовищі кишечника, пребіотичний компонент вносимо у кількості $(1 \pm 0,1) \%$ одночасно із середовищем стабілізації (сахарозо-желатинове, знежирене молоко).

4) Проведення культивування консорціуму бактерій з урахуванням індивідуальних особливостей кожного штаму. Велике значення для продуктивного культивування має комплекс фізичних і фізико-хімічних факторів (рН, температура). Відомо, що оптимальними умовами для росту і накопичення біомаси біфідобактерій є рН середовища $(6,5 \pm 0,1)$, температура культивування $(38 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, а для лактобацил - рН середовища $(7,0 \pm 0,1)$, температура культивування $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Тому, для максимального накопичення біомаси під час культивування комбінованої бактеріальної культури на розробленому поживному середовищі запропоновано наступні параметри: рН середовища на початковому етапі $(6,5 \pm 0,1)$; впродовж культивування (48 годин) рН перевіряли і корегували 10 % розчином аміаку до рН $(7,0 \pm 0,1)$. Температура культивування протягом першої доби культивування становила $(38 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, протягом другої доби $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ (табл. 2).

Таблиця 2

Оптимальні умови росту біфідобактерій
та лактобацил при окремому і глибинному культивуванні

Фактори	Bifidumbacterium bifidum ЛВА-3	Lactobacillus plantarum 8R-A3	Сумісна бактеріальна культура	
			1-ша доба	2-га доба
рН	$6,5 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,1$
Температура, $^\circ\text{C}$	$38 \pm 0,5$	$37 \pm 0,5$	$38 \pm 0,5$	$37 \pm 0,5$

Алгоритмом для способу одержання синбіотичного бактеріального консорціуму є сумісне глибинне культивування визначених штамів бактерій, з урахуванням їх кількісних співвідношень, номеру генерації, умов культивування та необхідного пребіотичного компонента.

Для отримання консорціуму бактерій, спочатку отримували маточні культури біфідобактерій II генерації (на середовищі Блаурокка, рН середовища $(6,5 \pm 0,1)$, температура культивування $(38 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, шляхом проведення двох пересівів, тривалість кожної генерації 48 годин) та лактобацил V генерації (на середовищах MPC-1 (рН $6,7 \pm 0,1$), температура $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, тривалість 24 години; MPC-2 (рН $7,3 \pm 0,1$) та MPC-4 (рН $7,9 \pm 0,1$), температура $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$). Далі проводили сумісне глибинне культивування на виробничому поживному середовищі, яке містить пребіотичний компонент лактитол у кількості $(1 \pm 0,1) \%$. Співвідношення маточних культур посівного матеріалу становило 1:3 біфідобактерій та лактобацил відповідно.

Для максимального накопичення біомаси під час культивування консорціуму на виробничому поживному середовищі встановлено наступні параметри: рН середовища на початковому етапі $(6,5 \pm 0,1)$; впродовж культивування (48 годин) рН перевіряли і корегували 10 % розчином аміаку до рН $(7,0 \pm 0,1)$. Температура культивування протягом першої доби культивування становила $(38 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, протягом другої доби $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ (табл. 2). Проведена мікроскопія свідчить про збереження основних морфологічних ознак кожного штаму при сумісному культивуванні.

По закінченню процесу накопичення біомаси до синбіотичного консорціуму додають середовище стабілізації (сахарозо-желатинове, знежирене молоко) та вносять пребіотичний компонент - лактитол у кількості $(1 \pm 0,1) \%$.

Для підтвердження симбіотичного типу взаємодії вибраних штамів проведено порівняння основних ростових показників (табл. 3, 4):

Таблиця 3

Основні ростові показники бактерій

Вид бактерій	Кислотоутворення, °Т		Кількість мікробних клітин	
	На середовищі Блаурокка	На середовищі МРС-1	На середовищі Блаурокка, КУО/мл	На середовищі МРС-1, млрд. мікробних кл.
Біфідобактерії	230±15	-	10 ⁹	-
Лактобацили	-	220±12	-	4,1±0,2
Консорціум	392±25	290±20	10 ¹¹	6,4±0,2

5 Як видно з таблиці 3, активність кислотоутворення консорціуму перевищує показники індивідуальних штамів; кількість бактерій також залишається високою, що свідчить про симбіотичну взаємодію вибраних штамів.

Таблиця 4

Антагоністична активність бактерій (M ± m)

Вид бактерій	Зона затримки росту тест-штамів, мм						
	Sh. Flexneri 170	Sh. Sonnci 5063	Sh. Flexneri 337	E.coli 157	P. Vulgaris 170	P. Mirabilis	St. Aureus 209
Біфідобактерії	18,8±0,27	19,3±0,34	18,6±0,44	21,3±0,49	19,8±0,7	17,6±0,53	-
Лактобацили	25,3±0,41	20,8±0,28	22,7±0,42	23,8±0,49	21,6±0,27	20,6±0,37	21,8±0,29
Консорціум	27,4±0,32	22,5±0,18	23,8±0,45	23,9±0,35	22,4±0,37	21,9±0,43	22,1±0,31

10 За даними таблиці 4, синергічний ефект консорціуму проявляється також у більшій антагоністичній активності консорціуму у порівнянні з монокультурами, особливо біфідобактеріями, що підвищує пробіотичну значимість концентрату.

Таблиця 5

Адгезивна активність бактерій

Вид бактерій	Показник адгезії, %
Біфідобактерії	60,0
Лактобацили	28,4
Консорціум	80,0

15 За даними таблиці 5 видно, що сумісне культивування не призводить до пригнічення адгезивної активності біфідобактерій і лактобацил, а навпаки показники консорціуму перевищують показники монокультур.

Приклад 1. Отримання синбіотичного бактеріального консорціуму для лікувально-профілактичних цілей проводять визначенням кількісного співвідношення бактерій.

Одержання маточної культури біфідобактерій штаму *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 II генерації та лактобацил штаму *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 V генерації:

20 1) біфідобактерій II генерації - біфідобактерії I та II генерації отримують на середовищі Блаурокка, рН середовища (6.5±0.1), температура культивування (38±0,5)°С, послідовними пересівами загальною тривалістю 48 годин кожна генерація;

2) лактобацил V генерації лактобацили I генерації отримують на середовищі МРС-1 (рН 6,7±0,1), температура (37±0,5)°С, тривалість 24 години; лактобацили II генерації на середовищі МРС-2 (рН 7,3±0,1), температура (37±0,5)°С, тривалість 24 години; лактобацили III генерації - на середовищі МРС-4 (рН 7,9±0,1), температура (37±0,5)°С, тривалість 48 годин; лактобацили IV генерації - на середовищах МРС-1 та МРС-2, температура (37±0,5)°С, тривалість 24 години; лактобацили V генерації - на середовищі МРС-1, температура (37±0,5)°С, тривалість 24 години; лактобацили VI генерації - на середовищі МРС-1, температура (37±0,5)°С, тривалість 24 години.

30 Сумісне глибинне культивування проводять на виробничому поживному середовищі КД (рН 6,8±0,1, температура (38±0,5)°С, тривалість 48 годин), використовуючи наступні співвідношення

посівного матеріалу: 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1 культур біфідобактерій та лактобацил вказаних генерацій відповідно (табл. 1).

Порівнюючи основні ростові показники бактерій (кількість живих бактерій, активність кислотоутворення), вибрано співвідношення біфідобактерій: лактобацили = 1:3 із застосуванням біфідобактерій II генерації та лактобацил V генерації (табл. 1).

Приклад 2. Отримання синбіотичного бактеріального консорціуму для лікувально-профілактичних цілей проводять внесенням пребіотичного компонента.

Сумісне глибинне культивування посівного матеріалу проводять у співвідношенні біфідобактерій: лактобацили = 1:3 із застосуванням біфідобактерій II генерації та лактобацил V генерації відповідно. Виробниче поживне середовище виконано у кількох варіантах і як пребіотичний компонент містить лактитол у кількостях 0,5 %, 0,9 %, 1,0 %, 1,1 %, 1,7 % від загального об'єму. Інтенсивність росту бактерій визначали фотометричним визначенням оптичної густини зразків при довжині хвилі $\lambda=540$ нм. Контролем порівняння було поживне середовище без бактерій. Активність сумісної культури визначали по показнику активності кислотоутворення.

Таблиця 6

Активність кислото утворення

Кількість лактитолу, %	Активність кислотоутворення, °Т	
	На середовищі Блаурокка	На середовищі МРС
0,5	208±15	306±20
0,9	247±20	389±33
1,0	260±25	400±35
1,1	268±25	395±30
1,7	260±20	382±25

За даними результатів дослідження, найбільша фізіологічна активність культур проявлялася при внесенні до поживного середовища лактитолу у кількості 0,9-1,1 %. Подальше збільшення концентрації лактитолу не дає значного покращення показників, проте має економічне навантаження на готовий продукт, тобто є недоцільним.

Приклад 3. Отримання синбіотичного бактеріального консорціуму для лікувально-профілактичних цілей проводять культивуванням при відповідних технологічних умовах.

Сумісне глибинне культивування бактеріального синбіотичного консорціуму проводили при різних технологічних параметрах, характерних для біфідобактерій (рН середовища 6,5±0,1, температура культивування (38±0,5)°С) та для лактобацил (рН середовища 7,0±0,1, температура культивування (37±0,5)°С). Також було досліджено два варіанти, які враховують параметри обох штамів:

1) рН середовища на початковому етапі (6,5±0,1) - оптимальна для біфідобактерій; на другу добу - рН (7,0±0,1) - оптимальна для лактобацил. Температура культивування протягом першої доби (38±0,5)°С - оптимальна для біфідобактерій; протягом другої доби (37±0,5)°С оптимальна для лактобацил.

2) рН середовища на початковому етапі (7,0±0,1) - оптимальна для лактобацил; на другу добу - рН (6,5±0,1) - оптимальна для біфідобактерій. Температура культивування протягом першої доби (37±0,5)°С оптимальна для лактобацил; протягом другої доби (38±0,5)°С - оптимальна для біфідобактерій.

Порівнюючи основні ростові показники бактерій (кількість живих бактерій, активність кислотоутворення, антагоністична активність), вибрано наступний варіант ведення технологічного процесу: рН середовища на початковому етапі (6,5±0,1); на другу добу - рН (7,0±0,1). Температура культивування протягом першої доби (38±0,5)°С, протягом другої доби (37±0,5)°С. При застосуванні другого варіанта, ростові показники бактеріальної культури знаходяться на нижчому рівні.

При здійсненні корисної моделі досягається технічний результат, а саме одержання синбіотичного бактеріального консорціуму для лікувально-профілактичних цілей є отримання продукту, що має швидку та більш ефективну дію при корекції дисбіотичних порушень ШКТ та можливість його застосування не лише як індивідуального лікувально-профілактичного засобу, а також як основи для пробіотичних препаратів у інших лікарських формах (капсули, супозиторії, таблетки).

Джерела інформації:

1. Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл в условиях совместного культивирования *in vitro*. // Журнал микроб., эпидемиол. и иммунобиол. - 2005.- № 2. - С.56-61.

2. Лянная А.М., Левченко Т.А. "Консорциум штаммов бифидобактерий для получения кисломолочных, неферментированных пищевых продуктов, биологически активных добавок и бактериальных препаратов" // Патент РФ № 2196174 (2000)4 МКП, С12N 1/20, А23С 9/12, А61К 35/74. Заявка 2000101391/13 от 24.01.2004. Оpubл. 10.01.2003.

3. Патент РФ 2257408 "Лечебно-профилактический биопрепарат на основе сухой биомассы бифидо- и лактобактерий, биологически активная добавка к пище на основе сухой биомассы бифидо- и лактобактерий, сухая биомасса бифидо- и лактобактерий и способ ее получения". Заявка 2003136785/13 от 22.12.2003 г. Оpubл. 27.07.2005 г.

4. Алешкин В.А., Амерханова А.М. "Консорциум бифидобактерий и лактобацилл, используемый для приготовления бактериальных препаратов, заквасок для кисломолочных продуктов, ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, биологически активных добавок, предназначенных для коррекции микрофлоры человека в возрасте от 12 лет и старше" // Патент РФ № 2180914 (2001); МКП С12N 1/20, А61К 35/74, А23С 9/12.

5. Амерханова А.М., Алёшкин А.В., Жиленкова О.Г. "Консорциум бифидобактерий и лактобацилл, используемый для приготовления бактериальных препаратов и биологически активных добавок к пище, предназначенных для коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта детей в возрасте до 3-х лет, и способ его получения, биологически активная добавка к пище и бактериальный препарат для лечения дисбиотических состояний желудочно-кишечного тракта детей в возрасте до 3-х лет". // Патент РФ №2491331; МПК С12N 1/20 (2006.01) А61К 35/74 А23С 9/12 А23L1/29. Заявка 05.14.2012. Оpubл. 27.08.2013.

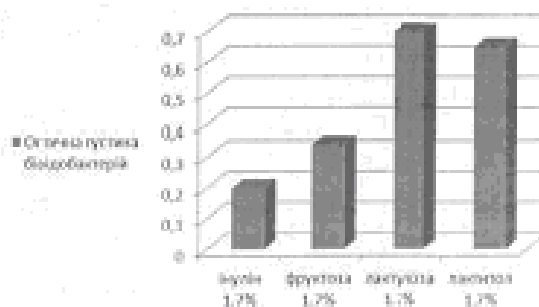
25

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання синбіотичного бактеріального консорціуму для лікувально-профілактичних цілей, який включає сумісне глибинне культивування біфідобактерій та лактобацилл і внесення пребіотичного компоненту, який **відрізняється** тим, що для сумісного глибинного культивування використовуються біфідобактерії штаму *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 II генерації та лактобацили штаму *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 V генерації у співвідношенні 1:3, пребіотичний компонент лактитол, який додають у кількості $1 \pm 0,1$ % під час культивування, та у кількості $1 \pm 0,1$ % разом із середовищем стабілізації, а під час сумісного культивування послідовно створюють оптимальні умови для накопичення біомаси кожного штаму, а саме початкове значення рН середовища $6,5 \pm 0,2$, температура протягом першої доби культивування становить $38 \pm 0,5$ °С; на другу добу - рН $7,0 \pm 0,2$, а температура становить $37 \pm 0,5$ °С.

35

Оптическая густина бифидобактерий



Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601