



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85272 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
C12N 1/04  
C12P 1/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

### (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ РІДКОГО ПРОБІОТИКА З АЕРОКОКІВ

1

(21) а200702466

(22) 06.03.2007

(24) 12.01.2009

(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.

(72) КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ ГЕННАДІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, UA, РИЖЕНКО СЕРГІЙ АНАТОЛІЄВИЧ, UA (73) КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ ГЕННАДІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, UA, РИЖЕНКО СЕРГІЙ АНАТОЛІЄВИЧ, UA

(56) UA 53270 A, 15.01.03.

UA 53301 A, 15.01.03.

Риженко С.А., Кременчуцький Г.М., Бредихіна М.О., Дикленко Т.В., Дробот О.В., Степанський Д.О., Хілько Л.В., Вальчук С.І., Юргель Л.Г., Кондратьєв А.Ю., Кошева І.П. Технологія одержання рідкого пробіотику з аерококів.- Annals of Mechnicov Institute.- 2006.- N 4.-С.23 - 28  
UA 52151 A, 16.12.02.

2

UA 72065 A, 17.01.05.

RU 2176887 C2, 20.12.01.

UA 2628 U, 15.06.04.

RU 2204260 C2, 20.05.03.

(57) Спосіб одержання рідкого пробіотику з аерококів, що полягає в тому, що біомаса *A. viridans* для засіву у рідке живильне середовище накопичується у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА) при 37°C протягом 24 годин, клітини аерококів змивають фізіологічним розчином і засівають у рідке живильне середовище, що виготовлено на основі бульйону грибів гливи звичайної з рівнем амінного азоту 150мг % та вмістом 1% глюкози, засів інкубують при 37°C протягом 16 годин, який відрізняється тим, що після вирощування до препарату додають 0,5-1,5% альгінату натрію.

Винахід відноситься до мікробіології, а саме, до способу одержання рідких лікувально-профілактичних бактеріальних препаратів з мікроорганізмів.

Метою винаходу є підвищення рівня збереження концентрації клітин аерококів при зберіганні препарату протягом 3-х місяців.

Відомий спосіб одержання пробіотику з *Aerococcus viridans* 167, що включає вирощування виробничого штаму культури аерококів на живильному середовищі у пробірках з м'ясо-пептоновим агаром при температурі (36±1)°C, бактеріоскопічний та бактеріологічний контроль чистоти культури, розлив препарату у ємності, наступну ліофілізацію у вакуум-сушильних апаратах і герметизацію [1]. Згідно винаходу, вирощування культури вказаного штаму проводять в декілька етапів, причому на першому етапі вирощують першу генерацію культури протягом 18-48 годин, на другому етапі вирощують наступну генерацію маткової культури протягом 18-48 годин, а на третьому етапі генерацію маткової культури засівають в матрицю з казеїновим агаром, який містить 10мг/мл глюкози, 20-50мкг/мл грамуруну, 1-5мкг/мл етонію, і протягом 18-48 годин вирощують виробничу культуру, а по

закінченні строку інкубації здійснюють змив мікробної маси в асептичних умовах додаванням водного розчину стабілізатора. На наступному етапі проводиться ліофілізація суспензії, що зменшує концентрацію клітин у препараті і дає неактивні клітини. Для їх активації необхідно додавати розчинник і витримувати певний час для відновлення життєдіяльності. У розчиненому вигляді клітини аерококів зберігаються тільки 24 години.

Найбільш близьким рішенням (прототипом) до "Способу одержання рідкого пробіотику "А-бактерину", що заявляється, є "Технологія одержання рідкого пробіотику з аерококів" [2].

На відміну від сухого, головна перевага рідкого «А-бактерина» полягає в тому, що бактерії в ньому перебувають у біологічно активній формі. Свій корисний вплив вони роблять негайно - відразу після прийому препарату, що привабливо відрізняє його від аналогічних сухих препаратів. Крім живих бактерій, рідкі пробіотики містять їх продукти життєдіяльності та корисні для організму людини біологічно активні речовини: незамінні амінокислоти, органічні кислоти, вітаміни, стимулятори імунітету та продукції інтерферону [3, 4].

(13) C2

(11) 85272

(19) UA

Конструювання живильного середовища, що враховує біохімічні аспекти метаболізму пробіотичного мікроорганізму *A. viridans* дозволило приступити до розробки технології виробництва рідкого пробіотику «А-бактерин».

Об'єкт дослідження - популяція виробничого штаму *A. viridans* № 167, що вирощувалася в грибно-живильному середовищі (грибний відвар гливи звичайної - *Pleurotus ostreatus*) [5].

У середовище додавався гідролізат рибного борошна до наявності в середовищі 150мг % амінного азоту. Для нейтралізації активних форм кисню, насамперед перекису водню, у середовище додавалися антиоксиданти - вітамін С і вітамін Е в концентрації 10мг на 1л середовища. Для зменшення конвекції кисню в середовище додавався агар-агар до 0,1%.

Для накопичення біомаси *A. viridans* 167 застосовувалися рідкі живильні середовища різного складу, що виготовлені на основі бульйону грибів гливи звичайної: грибний бульйон; грибний бульйон з рівнем амінного азоту 150мг %; грибний бульйон з додаванням різних вуглеводів, амінокислот і вітамінів.

У експерименті використані різні сполучення й концентрації (глюкоза, цистеїн солянокислий, цистин солянокислий, амонію хлорид, амонію нітрат, натрію сульфат, калій водень фосфат, калій водень діфосфат, магній сульфат, нікотинова кислота, пантотенат кальцію, інозит, аденін, натрію хлорид, аскорбінова кислота, вітамін Е, ембріональна теляча сироватка, глютамінова кислота, гліцин, натрію гідроксид, агар-агар).

Біомасу *A. viridans* для засіву у рідке живильне середовище накопичували у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА).

Після чого проводили мікроскопічний і біохімічний контроль чистоти культури, що виросла на середовищі. Контроль рівня концентрації мікробних клітин здійснювали шляхом титрування куль-

тури і висіву із рідкого живильного середовища на живильні середовища різного складу (МПА, ентокок-агар, гонок-агар, живильний агар з додаванням 1-3% дефібрінованої крові, середовище Блаурока).

У результаті проведених досліджень була обрана основа живильного середовища, що є невід'ємною частиною рідкої форми пробіотику «А-бактерин» наступної рецептури: грибний бульйон, аміний азот ( $\text{NH}_2$ ) - 150мг %, глюкоза - 1%, цистеїн солянокислий - 100мг/л.

Основним недоліком прототипу є падіння концентрації клітин аерококів у процесі зберігання препарату протягом 3-х місяців до  $10^5$  -  $10^6$  КУО/мл, що недостатньо для його пробіотичної дії.

В основу винаходу поставлено задачу створити спосіб одержання рідкого пробіотику з аерококів, при зберіганні якого протягом 3-х місяців концентрація клітин аерококів не знижувалась менш ніж  $10^8$  КУО/мл.

Задача винаходу вирішується тим, що для одержання рідкого пробіотику з аерококів біомаса *A. viridans* для засіву у рідке живильне середовище накопичується у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА) при  $37^\circ\text{C}$  на протязі 24 годин. Клітини аерококів змиваються фізіологічним розчином і засіваються у рідке живильне середовище наступного складу:

- грибний бульйон з вмістом амінного азоту - 150мг %,

- глюкоза - 1%,

Далі проводиться інкубація культури на протязі 16 годин при температурі  $37^\circ\text{C}$ , після чого у препарат додається альгінат натрію у концентрації 0,5 - 1,5%, після чого проводиться контроль концентрації клітин, рН розчину і розлив рідкого препарату у ємності. Концентрація клітин аерококів контролюється протягом 3-х місяців. Збереження концентрації аерококів наведено у таблиці.

Таблиця

Збереження концентрації клітин аерококів протягом 3-х місяців у препараті різного способу виготовлення

№ п/п	А-бактерин, виготовлений різними способами	Концентрація клітин аерококів у препараті при зберіганні протягом 3-х місяців (КУО/мл)			
		0	1	2	3
1	За прототипом	$1,4 \cdot 10^9 \pm 0,9 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^8 \pm 0,5 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^6 \pm 0,6 \cdot 10$	$2,4 \cdot 10^5 \pm 0,8 \cdot 10^5$
2	За заявленим рішенням з 0,5% альгінату натрія	$2,7 \cdot 10^9 \pm 0,5 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^9 \pm 3,5 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^8 \pm 0,3 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^8 \pm 0,3 \cdot 10^6$
3	За заявленим рішенням з 1 % альгінату натрія	$2,6 \cdot 10^9 \pm 1,5 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^9 \pm 1,3 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^8 \pm 1,2 \cdot 10^6$	$5,3 \cdot 10^8 \pm 0,8 \cdot 10^6$
4	За заявленим рішенням з 1,5% альгінату натрія	$2,8 \cdot 10^9 \pm 0,7 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^9 \pm 0,7 \cdot 10^7$	$3,8 \cdot 10^8 \pm 0,5 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^8 \pm 0,9 \cdot 10^6$

Вирішення поставленого завдання ілюструється наступними прикладами.

## Приклад 1

Біомаса *A. viridans* для засіву у рідке живильне середовище накопичується у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА) при 37°C на протязі 24 годин. Клітини аерококів змиваються фізіологічним розчином і засіваються у рідке живильне середовище, що виготовлено на основі бульйону грибів гливи звичайної: грибний бульйон з рівнем амінного азоту 150мг % із вмістом 1% глюкози.

Засів інкубується при 37°C на протязі 16 годин. Після вирощування до препарату додається 0,5% альгілату натрія і проводиться мікроскопічний і біохімічний контроль чистоти культури, що виросла на середовищі. Контроль рівня концентрації мікробних клітин здійснюється шляхом згідно стандартного методу висіву аерококів із рідкого живильного середовища на щільні живильні середовища різного складу (МПА, ентерокок-агар) протягом 3-х місяців. У кінці зберігання протягом 3-х місяців концентрація клітин аерококів дорівнює  $1,6 \cdot 10^8 \pm 0,3 \cdot 10^6$  КУО/мл

## Приклад 2

Біомаса *A. viridans* для засіву у рідке живильне середовище накопичується у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА) при 37°C на протязі 24 годин. Клітини аерококів змиваються фізіологічним розчином і засіваються у рідке живильне середовище, що виготовлено на основі бульйону грибів гливи звичайної: грибний бульйон з рівнем амінного азоту 150мг % із вмістом 1% глюкози.

Засів інкубується при 37°C на протязі 16 годин. Після вирощування до препарату додається 1% альгілату натрія і проводиться мікроскопічний і біохімічний контроль чистоти культури, що виросла на середовищі.

Контроль рівня концентрації мікробних клітин здійснюється шляхом згідно стандартного методу висіву аерококів із рідкого живильного середовища на щільні живильні середовища різного складу (МПА, ентерокок-агар) протягом 3-х місяців.

У кінці зберігання протягом 3-х місяців концентрація клітин аерококів дорівнює  $5,3 \cdot 10^8 \pm 0,8 \cdot 10^6$  КУО/мл.

## Приклад 3

Біомаса *A. viridans* для засіву у рідке живильне середовище накопичується у пробірках зі скоше-

ним м'ясо-пептонним агаром (МПА) при 37°C на протязі 24 годин. Клітини аерококів змиваються фізіологічним розчином і засіваються у рідке живильне середовище, що виготовлено на основі бульйону грибів гливи звичайної: грибний бульйон з рівнем амінного азоту 150мг % із вмістом 1% глюкози.

Засів інкубується при 37°C на протязі 16 годин. Після вирощування до препарату додається 1,5% альгілату натрія і проводиться мікроскопічний і біохімічний контроль чистоти культури, що виросла на середовищі.

Контроль рівня концентрації мікробних клітин здійснюється шляхом згідно стандартного методу висіву аерококів із рідкого живильного середовища на щільні живильні середовища різного складу (МПА, ентерокок-агар) протягом 3-х місяців. У кінці зберігання протягом 3-х місяців концентрація клітин аерококів дорівнює  $2,6 \cdot 10^8 \pm 0,9 \cdot 10^6$  КУО/мл.

## Література:

1. Пат. 53301, UA, Спосіб одержання пробіотику з аерококів / Г.М. Кременчуцький (Україна). № заявки 2002043334; Заявл. 10.05.2002. Опубл. 15.01.2003. Бюл. №1. -7с.
2. Риженко С.А., Кременчуцький Г.М., Бредихіна М.О., Дикленко Т.В., Дробот О.В., Степанський Д.О., Хілько Л.В., Вальчук С.І., Юргель Л.Г., Кондратьєв А.Ю., Кошева І.П. Технологія одержання рідкого пробіотику з аерококів.- *Annals of Mechnicov Institute*. - 2006. - N 4. - С.23-28
3. Конструирование питательных сред для производства препаратов - пробиотиков / Р.Х. Тимербаева, Т.А. Баталова // Актуальные вопросы разработки и производства диагностических питательных сред и тест-систем: матер. III Международ. науч.-практ. конфер. - Махачкала, 2001. - С. 20-21.
4. Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E., Salminen S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. // *Am.J.Clin.Nutr.* - 2001. - Т. 73 - P.393-398.
5. Пат. 53270, UA, Живильне середовище для виділення та ідентифікації мікроорганізмів / Г.М. Кременчуцький (Україна). № заявки 2002043159; Заявл. 15.01.2003. Опубл. 15.10.2004. Бюл. №10. - 6с.