



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **122859**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

**C12R 1/25** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2017 08828**

(22) Дата подання заявки: **04.09.2017**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.01.2018**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.01.2018, Бюл.№ 2**

(72) Винахідник(и):

**Книш Оксана Василівна (UA),  
Ісаєнко Олена Юріївна (UA),  
Бабич Євгеній Михайлович (UA),  
Полянська Валентина Павлівна (UA),  
Зачепило Світлана Вікторівна (UA),  
Компанієць Антоніна Михайлівна (UA),  
Горбач Тетяна Вікторівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ  
МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І.  
МЕЧНИКОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ  
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",  
вул. Пушкінська, 14/16, м. Харків, 61057  
(UA)**

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДЕРИВАТИВ БАКТЕРІЙ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ**

(57) Реферат:

В способі одержання біологічно активних дериватів бактерій пробіотичних штамів у вигляді суміші клітинних структур та продуктів метаболізму бактерій проводять дезінтеграцію бактеріальних клітин шляхом 10-кратного циклічного заморожування-відтавання та здійснюють культивування пробіотичного мікроорганізму у дезінтеграті власних клітин.

**UA 122859 U**



Корисна модель належить до мікробіології і може бути використана при виробництві імунобіологічних препаратів дериватного типу, які містять біологічно активні структурні компоненти та продукти метаболізму бактерій пробіотичних штамів.

Дослідження останніх років доводять, що основні ефекти пробіотиків забезпечуються саме завдяки їх метаболітам і структурним компонентам клітин. Тому застосування клітинних похідних пробіотичних бактерій розглядають як альтернативу недостатньо ефективної терапії живими клітинами пробіотиків [1-3]. Екзометаболіти лакто- та біфідобактерій позитивно впливають на мікробіоценоз, роботу шлунково-кишкового тракту, обмін речовин та імунну систему макроорганізму. Бактеріальна суспензія і культуральна рідина лакто- і біфідобактерій містить біологічно активні речовини: вітаміни, ферменти, органічні кислоти (молочну, оцтову, бурштинову та ін.), вуглеводи, пептиди, амінокислоти та ін. [4].

В останні роки поширення резистентності патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів до існуючих антибіотиків набуває загрозливих масштабів. Завдяки наявності у складі бактерій пробіотичних штамів структурних компонентів з протимікробною активністю та здатності лактобактерій і біфідобактерій утворювати цілий ряд речовин з антибактеріальним ефектом (лізоцим, бактеріюцини, амінокислоти, перекис водню, антимікробні поліпептиди та ін.) велика надія покладається на розробку альтернативних протимікробних засобів на основі структурних компонентів та продуктів метаболізму пробіотиків - природних антагоністів збудників захворювань [5, 6]. Крім цього структурні компоненти бактерій (ліпополісахариди, похідні пептидоглікану та ін.) входять до складу імуномодуляторів мікробного походження, клінічний ефект яких реалізується через вплив на вроджений імунітет [7].

Корисні властивості біологічно активних речовин бактеріального походження використовують шляхом виготовлення з них лікарських препаратів та лікувально-профілактичних продуктів харчування.

Структурні компоненти бактерій отримують в результаті застосування різних способів дезінтеграції (хімічних, біологічних та фізико-механічних), кожен з яких має свої недоліки і переваги [3, 8, 9]. Метаболіти отримують шляхом культивування штаму-продуценту у рідкому поживному середовищі з наступним відокремленням мікробних клітин від культуральної рідини. Таким чином, продукти метаболізму залишаються у поживному середовищі, повністю позбутися якого і отримати метаболіти у чистому вигляді неможливо [10].

Відомий спосіб отримання метаболітів біфідобактерій шляхом культивування бактеріальної суспензії штаму *Bifidobacterium bifidum* в реакторі із застосуванням казеїново-дріжджового середовища (доза посівного матеріалу складає  $10,0 \pm 2,5$  % від об'єму поживного середовища) при температурі  $38^{\circ}\text{C}$  з додаванням розчинів аміаку і глюкози протягом до 24 годин до закінчення фази логарифмічного росту культури. Отриману бактеріальну суспензію, що містить не менше 10 КУО/мл, концентрують в 4 рази методом ультрафільтрації з використанням розподільчих приладів на мембранах з полісульфону 146 (20 кДа). Ємність з ультрафільтратом піддають автоклавуванню при  $110^{\circ}\text{C}$  впродовж 15 хвилин. Отриманий стерильний препарат розливають в ампули по 3 мл та запаюють [11].

Відомий також спосіб отримання екзометаболітів біфідобактерій з високою антимікробною активністю: біфідобактерії культивують на тіогліколевому середовищі або в бульйоні Шедлера (1 мл суспензії з концентрацією біфідобактерій  $5 \times 10^6$  мікробних клітин в 9 мл бульйону Шедлера (рН 7,6)) в термостаті при температурі  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 24, 48, 72 та 96 годин. Отримані бульйонні культури біфідобактерій центрифугують при 3000 об/хв впродовж 30 хвилин, надосадову культуральну рідину відділяють від клітин і стерилізують через мембранні фільтри (Millipore, 0,22 мкм) [12].

Відомим на сьогодні є лікувально-профілактичний кисломолочний напій, що містить кисломолочну основу та джерело клітинного детриту, позаклітинних та внутрішньоклітинних метаболітів бактерій, комплексу бактеріальних ферментів - біомасу бактерій виду *Lactobacterium acidophilum*, та/або *Bifidobacterium bifidum*, та/або *Lactobacterium bulgaricum*, та/або кефірної, та/або кумисної, та/або мацунної закваски, піддану багатократному заморожуванню-відтаванню та/або оброблену ультразвуком [13].

Найближчим до способу, що пропонується, є спосіб отримання фрагментів клітин та метаболітів біфідобактерій, який полягає в тому, що матковий штам біфідобактерій *Bifidobacterium bifidum* штам N 791 (колекційний номер ВКПМ В-3300) або *Bifidobacterium adolescentis* штам ГО4а 200 (колекційний номер ЦМПМ В-2169) або *Bifidobacterium longum* штам В 379 М (колекційний номер ВКРМ В-2000), у кількості не менш, ніж 5 % від об'єму культурального середовища, стерильно вносять в біореактор з кукурудзяно-лактозним середовищем та інкубують при  $37-38^{\circ}\text{C}$  і слабкому перемішуванні впродовж 24-32 годин. В реакторі над поверхнею суспензії формують шар азоту. При досягненні концентрації

біфідобактерій  $10^9$  клітин/мл суспензію клітин піддають нагріванню до 100-120 °C в автоклаві. Отриману завись біологічно активних компонентів осаджують і використовують для виготовлення продукту [14].

5 Тобто, на сьогодні отримання біологічно активних структурних компонентів бактерій та їх метаболітів - складні розрізнені технологічні процеси, а виробництво готового продукту, що містить обидва компоненти, передбачає окремий етап їх поєднання.

Задача корисної моделі: розробити оптимізований спосіб одержання біологічно активних дериватів бактерій пробіотичних штамів без застосування традиційних поживних середовищ.

10 Поставлена задача вирішується тим, що для одержання біологічно активних дериватів бактерій пробіотичних штамів у вигляді суміші клітинних структур та продуктів метаболізму бактерій, проводять дезінтеграцію бактеріальних клітин шляхом 10-кратного циклічного заморожування-відтавання та здійснюють культивування пробіотичного мікроорганізму у дезінтеграті власних клітин. Цикл заморожування-відтавання проводять у наступному режимі: заморожування у камері низькотемпературного холодильника при температурі - 23 °C та швидкості охолодження 0,6-1 °C/хв, а відтавання на водяній бані при 37 °C. Мікробну суспензію пробіотика вносять у кріодезінтеграт у співвідношенні 1:9 і культивують при температурі 37 °C протягом трьох діб.

Технічний результат - оптимізація виробничого процесу отримання біологічно активних похідних бактерій пробіотичних штамів.

20 Удосконалення технології одержання біологічно активних дериватів бактерій пробіотичних штамів з високою протимікробною активністю по відношенню до потенційних патогенів полягає у поєднанні послідовних етапів отримання структурних компонентів та продуктів метаболізму пробіотичних бактерій з протимікробними властивостями у єдиний технологічний процес без застосування традиційних поживних середовищ. При цьому кріодезінтеграт, який містить біологічно активні структурні компоненти бактеріальних клітин і служить поживним середовищем, проявляє власну бактерицидну дію по відношенню до збудників захворювань.

25 Як джерело біологічно активних дериватів - структурних компонентів клітин та продуцентів метаболітів використовували пробіотичні штами *Bifidobacterium bifidum* (з препарату "Біфідумбактерин", ТОВ "Віво-Актив", Україна) та *Lactobacillus reuteri* Protectis (BioGaia, Швеція). Пробиотичні штами бактерій субкультивували протягом 24 годин при температурі 37 °C у регламентованому рідкому поживному середовищі. З метою видалення залишків середовища культуру пробіотичного штаму центрифугували впродовж 20 хвилин при 3000 об/хв, осад двічі відмивали та ресуспендували у фізіологічному розчині натрію хлориду (0,9 %, pH 7,0). Готували робочі мікробні зависі *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*) або *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) у фізіологічному розчині натрію хлориду з оптичною густиною 10,0 одиниць за шкалою МакФарланда (прилад Densi-La-Meter). Здійснювали холодову синхронізацію культур.

30 Для отримання кріодезінтеграту проводили багаторазові цикли заморожування-відтавання отриманих бактеріальних суспензій шляхом їх поміщення у камеру низькотемпературного холодильника (температура -23 °C, швидкість охолодження - 0,6-1 °C/хв) та наступного відігрівання на водяній бані при 37 °C.

35 Зважаючи на літературні дані [8] та взявши до уваги результати власних досліджень, для дезінтеграції нами було обрано 10 циклів заморожування-відтавання. Критерієм ефективності дезінтеграції слугувала наявність у фільтраті кріодезінтеграту компонента клітинних стінок - тейхоєвих кислот. Оптичну густину суспензій вимірювали за допомогою приладу Densi-La-Meter, концентрацію лактобактерій та біфідобактерій визначали за кількістю колонієутворюючих одиниць (КУО), яку виражали в десятковому логарифмі КУО/мл [15], концентрацію білка визначали у фільтратах за методом Лоурі [16] (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика мікробних суспензій до та після кріодезінтеграції

№	Параметри	Вихідна суспензія (контроль)		Кріодезінтеграція	
		<i>B. bifidum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. reuteri</i>
1	Оптична густина мікробної суспензії, одиниці за шкалою МакФарланда, ( $M \pm \sigma$ )	10,0	10,0	8,93 $\pm$ 0,17*	9,03 $\pm$ 0,14*
2	Концентрація бактеріальних клітин, Ig КУО/мл, ( $M \pm \sigma$ )	8,62 $\pm$ 0,10	8,63 $\pm$ 0,11	3,93 $\pm$ 0,24*	4,18 $\pm$ 0,26*
3	Концентрація білка у фільтратах, мг/мл, ( $M \pm \sigma$ )	0,07 $\pm$ 0,004	0,08 $\pm$ 0,005	8,13 $\pm$ 0,13*	7,10 $\pm$ 0,12*

Примітка.

\* різниця достовірна в порівнянні з контролем,  $P=0,05$ 

Для отримання продуктів метаболізму пробіотичних бактерій в кріодезінтеграції, що містить клітинні структури *B. bifidum* або *L. reuteri*, вносили відповідні мікробні суспензії, з оптичною густиною 10 одиниць за шкалою МакФарланда у співвідношенні 9:1. Культивування здійснювали при температурі 37 °C протягом трьох діб. Проводили центрифугування при 3000 об/хв впродовж 30 хвилин та фільтрування супернатанту з використанням мембранних фільтрів "Владіпор" МФАС-Б № 4 з діаметром пор 0,2 мкм.

Фільтрати зберігали в побутовому холодильнику при температурі 0- +4 °C впродовж 1-2 діб або в камері низькотемпературного холодильника при температурі -23 °C для більш тривалого зберігання.

Ступінь наростання біомаси мікробних клітин *B. bifidum* або *L. reuteri* контролювали за концентрацією бактеріальних клітин (вираженою в десятковому логарифмі КУО/мл), кількістю загального білка у фільтратах (за методом Лоурі) та рівнем pH одразу після внесення мікробних клітин в кріодезінтеграції та після культивування протягом трьох діб (табл. 2).

Таблица 2

Показники наростання біомаси бактерій пробіотичних штамів при культивуванні у кріодезінтегратах

Параметри	Одразу після внесення мікробних клітин (контроль)	Після культивування протягом трьох діб
<i>B. bifidum</i>		
Концентрація бактеріальних клітин, Ig КУО/мл, ( $M \pm \sigma$ )	7,54 $\pm$ 0,12	12,8 $\pm$ 0,38*
Концентрація білка, мг/мл, ( $M \pm \sigma$ )	8,13 $\pm$ 0,13	13,97 $\pm$ 0,11*
Рівень pH, ( $M \pm \sigma$ )	5,96 $\pm$ 0,07	4,55 $\pm$ 0,12*
<i>L. reuteri</i>		
Концентрація бактеріальних клітин, Ig КУО/мл, ( $M \pm \sigma$ )	7,64 $\pm$ 0,11	13,3 $\pm$ 0,5*
Концентрація білка, мг/мл, ( $M \pm \sigma$ )	7,10 $\pm$ 0,12	13,62 $\pm$ 0,15*
Рівень pH, ( $M \pm \sigma$ )	5,78 $\pm$ 0,09	4,5 $\pm$ 0,13*

Примітка:

\* різниця достовірна в порівнянні з контролем,  $P=0,05$ 

Протимікробні властивості дериватів бактерій пробіотичних штамів (клітинних структур та продуктів метаболізму), отриманих запропонованим методом, вивчали на тест-штамах культур: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 та циркулюючих штамів *Staphylococcus epidermidis* № 558, *Corynebacterium xerosis* № 41.

Суспензію тест-штаму з оптичною густиною 1,0 за шкалою МакФарланда вносили у співвідношенні 1:9 у фільтрати, що містять біологічно активні деривати бактерій пробіотичних

штамів (кріодезінтеграт містить клітинні структури; кінцевий продукт - клітинні структури та продукти метаболізму бактерій). Контролем служили суспензії тест-штамів у цукровому бульйоні та фізіологічному розчині натрію хлориду. Експозиція тест-штаму у досліджуваному фільтраті при температурі 37 °С становила 2; 24 та 48 годин. Із рідкого середовища здійснювали висів на відповідне тверде поживне середовище (в залежності від виду тест-культури) (табл. 3).

Таблица 3

Протимікробні властивості фільтратів,  
що містять деривати бактерій пробіотичних штамів, по відношенню до тест-культур

Тест-культури	Час експозиції, год.	Фільтрати, що містять деривати бактерій				Цукровий бульйон	Фізіологічний розчин
		Кріодезінтеграт (містить клітинні структури)		Кінцевий продукт (містить клітинні структури та метаболіти)			
		B. bifidum	L. reuteri	B. bifidum	L. reuteri		
Staphylococcus epidermidis	2	□	□	□	□	+	+
	24	□	□	□	□	+	+
	48	□	□	□	□	+	+
Staphylococcus aureus	2	+	+	+	+	+	+
	24	□	□	□	□	+	+
	48	□	□	□	□	+	+
Pseudomonas aeruginosa	2	+	+	+	+	+	+
	24	□	□	□	□	+	+
	48	□	□	□	□	+	+
Corynebacterium xerosis	2	□	□	□	□	+	+
	24	□	□	□	□	+	+
	48	□	□	□	□	+	+

Примітка:

+ наявний ріст культури, протимікробний ефект відсутній;

- відсутній ріст культури, протимікробний ефект наявний.

Таким чином, приведені дані свідчать, що деривати бактерій пробіотичних штамів, отримані запропонованим способом, мають виражені протимікробні властивості по відношенню до досліджених умовно-патогенних грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів.

Джерела інформації:

1. Плоскірєва А.А. Место метаболитных пробиотиков в практике клинициста /А.А. Плоскірєва, А.В. Горелов //Русский медицинский журнал. - 2014. - Т. 22, № 3. - С. 232-236.
2. Молохова Е.И. Разработки отечественных метаболитных пробиотиков и их стандартизация /Е.И. Молохова, Ю.В. Сорокина //Сибирский медицинский журнал (г. Томск). - 2011. - Т. 26, № 1. - С. 29-33.
3. Черно Н. Получение биологически активных компонентов клеточных стенок поливидовой бактериальной закваски ферментативным способом /Н. Черно, А. Капустян, А. Черная //Стан і перспективи харчової науки та промисловості: тези доповідей Міжнародної науково-технічної конференції, 8-9 жовтня 2015 р., Тернопіль, Україна, С. 129-130.
4. Мікрофлора людини і тварин та її функції. //Медична та мікробна екологія та функціональне харчування / - Москва, 1998. - С. 110-142.
5. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation /[L. Topisirovic, M. Kojic, D. Fira та ін.]. //Int J Food Microbiol. - 2006. - Vol. 112, № 3. - С. 230-235.
6. Cotter P. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics /P. Cotter, R. Ross, C. Hill //Nat. Rev. Microbiol. - 2013. - V.11. - P. 95-105.
7. Козлов И.Г., Андропова Т.М. Лекарственные воздействия через рецепторы врожденного иммунитета /И.Г. Козлов, Т.М. Андропова //Аллергология и иммунология. - 2013. - Том 14, № 4. - С. 254-259.

8. Ливийская Е.П. Дезинтеграция лактобацилл и энтерококков для получения фрагментов клеточных стенок /Е.П. Ливийская, Н.К. Коваленко, И.Л. Гармашева //Мікробіологічний журнал. - 2011. - Т. 73, № 3. - С. 26-32.
9. Шапхаев Э.Г., Цыранов В.Ж., Чибунина Е.И. Дезинтеграция микробных клеток: Учебное пособие. - Улан-Удэ: ВГСТУ, 2001. - 96 с.
10. Кулакова Ю.В. Разработка поликомпонентного метаболитного пробиотика для наружного применения на основе лактобацилл [Текст]: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06, 03.02.03 /Ю.В. Кулакова; Моск. НИИ эпидемиологии и микробиологии. - Москва, 2013. - 26 с.
11. Пат. 2224018 RU, МПК C12N 1/20, A61K 35/74, C12N 1/20, C12R 1/25, C12N 1/20, A61K 35/74, C12N 1/20, C12R 1/25. Способ получения биологического стимулятора [Электронный ресурс] / Несчислаев В.А., Чистохина Л.П. (RU); заявник і патентовласник ФГУП "НПО по медицинским иммунологическим препаратам "Микроген" (RU). - № 2001131538/13; заявл. 21.11.2001; опубл. 20.02.2004. - Режим доступа: [www.fips.ru](http://www.fips.ru).
12. Способ получения экзометаболитов бифидобактерий с высокой антимикробной активностью /[Т.Х. Тимохина, А.А. Марков, Я.И. Паромова та ін.] //Медицинская наука и образование Урала. - 2016. - № 2. - С. 152-154.
13. Пат. 2284119 RU, МПК A23C 9/13 A23C 9/133. Кисломолочный напиток [Электронный ресурс] /Хачатрян А.П., Хачатрян А.А., Лунева Н.М. (RU); заявник і патентовласник Хачатрян Ашот Папикович (RU), Хачатрян Артем Ашотович (RU). - заявл. 18.08.2005; опубл. 27.09.2006. - Режим доступа: <http://www.fips.ru>.
14. Пат. 2088211 RU, МПК A61K 7/42. Способ получения косметического средства для ухода за кожей [Электронный ресурс] /Децина А.Н.; Кислых В.И. (RU); заявитель и патентообладатель: Научно-производственное объединение "Вектор"; Товарищество с ограниченной ответственностью "Биокосметическая фабрика" (RU). - заявл. 02.08.1994; опубл. 27.08.1997. - Режим доступа: <http://www.fips.ru>.
15. ДСТУ 7355: 2013 Молоко, молочні продукти та закваски. Метод визначення кількості біфідобактерій.
16. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent /H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. Randall R [et al.] /J Biol Chem. - 1951. - № 193. - P. 265-275.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб одержання біологічно активних дериватів бактерій пробіотичних штамів у вигляді суміші клітинних структур та продуктів метаболізму бактерій, який **відрізняється** тим, що проводять дезінтеграцію бактеріальних клітин шляхом 10-кратного циклічного заморожування-відтавання та здійснюють культивування пробіотичного мікроорганізму у дезінтеграції власних клітин.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що цикл заморожування-відтавання проводять у наступному режимі: заморожування у камері низькотемпературного холодильника при температурі -23 °С та швидкості охолодження 0,6-1 °С/хв, а відтавання на водяній бані при 37 °С.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що мікробну суспензію пробіотика вносять у дезінтеграції власних клітин у співвідношенні 1:9 і культивують при температурі 37 °С протягом трьох діб.

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

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