

Дана група винаходів відноситься до медичної і харчової біотехнології, може бути використана у виробництві препаратів та харчових продуктів, які коригують мікрофлору травного тракту людей та тварин, у медицині, харчовій і молочної промисловості, сільському господарстві.

Функції нормальної мікрофлори в організмі є життєво важливими: синтезуюча, регуляторна, десенсибілізуюча, дезінтоксикаційна, ферментативна, захисна й імуностимулююча. Останнім часом спостерігається широка розповсюдженість серед населення дисбактеріозів та вторинних імунodefіцитів. При цьому проявляється виражена алергізація організму та активізація хронічних бактеріальних і вірусних інфекцій. Численні епідеміологічні дослідження доводять, що майже 90% населення земної кулі мають порушення якісного та/або кількісного складу мікрофлори в організмі людини. Причинами дисбактеріозів є антибіотикотерапія, гормонотерапія та хіміотерапія, гіповітамінози, неповноцінне і нерациональне харчування, несприятливі соціально-економічні та екологічні умови. Тому виникла необхідність проведення активної профілактики та ефективної корекції порушеної мікробіологічної рівноваги. Одним з найбільш ефективних засобів корекції є пробіотики. Серед пробіотиків важливими є біфідобактерії *Bifidobacterium bifidum* і *Bifidobacterium longum*, а також лактобактерії *Lactobacillus acidophilus* і термофільні стрептококи *Streptococcus thermophilus*, а також бактерійні концентрати і більш складні композиції.

Відомий штам *Bifidobacterium bifidum* B-3300, використовуваний у виробництві бактерійних препаратів, сквашує молоко протягом 18-24 годин, має антагоністичну активність проти *S.sonnei*, *S.flexneri*, *E.coli* (220), *S.aureus*, стійкий до канаміцину, мономіцину, чутливий до антибіотиків пеніцилінового ряду, кефзолу, гентаміцину тощо (див. патент SU 2023396, МПК A23C9/12, 1994р.).

Недоліком цього штаму є недостатньо висока біологічна активність і технологічність.

Відомий штам *Bifidobacterium bifidum* V-4, депонований 5 квітня 1993 року у центральному музеї промислових мікроорганізмів ВНИИгенетика під номером S-1257 (патент Російської Федерації 2108383, МПК<sup>6</sup> C12N1/20, A23C9/12, 1998 рік). Цей штам виділений із умісту кишечника здорової дорослої людини. Морфологічні і культуральні ознаки. Вирощені на гідролізованих молочних середовищах клітини штаму V-4 мають вигляд довгих тонких гранульованих паличок, розташованих у скупченнях, дуже рідко - у вигляді окремих паличок. Довжина клітин складає 3,5-5мкм, товщина 0,3-0,5мкм. Грампозитивні, нерухливі, спор і капсул не утворюють. У щільних живильних середовищах (1,5% агару) утворюють пастоподібні колонії ясно-коричневого кольору у вигляді "гречаних зерен" або дисків до 2,5-3мм у діаметрі. Пігменту не утворюють. У рідких живильних середовищах ріст по висоті живильного середовища 90-95%. Фізіолого-біохімічні ознаки. Непатогенний, безспоривий облігатний анаероб. Каталазу не утворює. Оптимальна температура росту 36,5-38,0°C, максимальна температура становить 41±0,5°C, мінімальна - 25±0,5°C; при 46,5°C не розмножується. Оптимальний початковий рН живильних стерилізованих середовищ 6,8-7,0 одиниць рН. Желатин не розріджує, нітрати не відновлює, індол не утворює. Ферментує лактозу з утворенням оцтової і молочної кислот (газу не утворює). На молочних середовищах утворює більше молочної кислоти, ніж оцтової; на печіночних середовищах утворює, більше оцтової кислоти, ніж молочної. Сквашує молоко при 5%-ній дозі інокуляції (інокулянт готують на гідролізатно-молочних середовищах) за 14-16 год., закислюючи молоко до рН=(4,7±0,1) або до кислотності (75±5)°T. Штам стійкий до 4% NaCl, при 6% NaCl у середовищі ріст знижується на порядок, понад 6% - у 2-4 рази. Стійкий до ристоміцину, кормогризину, канаміцину, неомицину, мономіцину. Чутливий до тетрацикліну, оксацикліну, ампіциліну, пеніциліну. Ферментує глюкозу, галактозу, лактозу, сахарозу; не утилізує арабінозу, ксилозу, рибозу, манозу, фруктозу, мальтозу, рафінозу, сорбіт, інулін, маніт, інозит, трегалозу. Максимальний ріст на живильних середовищах складає (6-9)·10<sup>8</sup> КУО/мл, у молоці - (4-6)·10<sup>8</sup> КУО/мл. Штам *B. bifidum* V-4 антагоністично активний до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів - шигел Зонне, Флекснера, до ентеропатогенних мікроорганізмів.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату є недостатня стійкість до агресивних середовищ шлунково-кишкового тракту.

Для штаму *Bifidobacterium bifidum* 1MB B-7019, що заявляється, за прототип вибрано штам *Bifidobacterium bifidum* 45 депонований у "ВНИИгенетика" під номером ВКПМ Ас-1621 (патент Російської Федерації №2184146, МПК<sup>7</sup> C12N1/20, A23C9/12, A61K35/74, A23L1/03, 2002 рік). Штам виділений з кишечника здорової дорослої людини. Культурально-морфологічні ознаки. Поліморфні грам позитивні палички вигнуті або з роздвоєннями на кінцях, нерухомі, ростуть у рідких живильних середовищах по всьому об'єму, крім зони аеробіозу. Культура штаму пігмент не утворює. На середовищах Блаурока, гідролізатно-молочному, казеїново-гідролізатному і тьогліколевому, логарифмічна фаза росту закінчується за 16-18 годин. Загальна кислотність на середовищі Блаурока за 24 годин не досягає 90-100°T. Оптимальна температура вирощування 37,5-40,5°C. Кращий спосіб нагромадження біомаси - вирощування культури на казеїново-гідролізатному середовищі. Середовище висушування сахарозо-желатинове. У ліофільному вигляді зберігається від 1 року до 7 років. Фізіолого-біохімічні ознаки. Облігатний анаероб. Ферментує целобіозу, лактозу і глюкозу з утворенням оцтової і L+ молочної кислот. Арабінозу, ксилозу, рибозу, маніт, меліцитозу, саліцин не ферментує. Зброджує молоко за 14-16 годин з утворенням стабільного згустку при кислотності 90-110°T. Каталазу не утворює, желатин не розріджує. Антагоністичні властивості. Штам біфідобактерій *B.bifidum* 45 ВКПМ Ас-1621 пригнічує ріст шигел Зонне, Флекснера, ентеропатогенних кишкових паличок, золотистих стафілококів, клебсієл, протеїв та інших умовно патогенних мікроорганізмів. Антибіотикостійкість штаму. Штам *B.bifidum* 45 ВКПМ Ас-1621 стійкий до дії канаміцину, мономіцину, гентаміцину, левоміцитину, кефзолу, стрептоміцину, ампіциліну. Агрезивні властивості біфідобактерій. Агрезивність штаму оцінювалася по середньому показнику адгезії (СПА), який дорівнює 9,8-10. Бактеріоциногенні властивості. Штам біфідобактерій *B.bifidum* 45 ВКПМ Ас-1621 виділяє біфідоцини й утворює зону затримки росту індикаторних культур від 2 до 3,5мм.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату є те, що штам *Bifidobacterium bifidum* 45 ВКПМ Ас-1621 недостатньо стійкий до ушкоджуючих факторів середовищ культивування та шлунково-кишкового тракту, а отже, недостатній його життєздатність і колонізуєчі властивості.

Біфідобактерії роду *Bifidobacterium longum* знаходять використання у складі бактерійних препаратів лікувально-профілактичного призначення і більш складних композицій. Наприклад, відомий штам *Bifidobacterium longum* Z4 (патент Російської Федерації №2151606, МПК<sup>7</sup> A61K35/74, C12N1/20, 2000 рік). Штам депонований у Центра-

льному музеї промислових мікроорганізмів інституту "ВНИИ генетика" під номером Ас-1571 і характеризується наступними властивостями. Культурально-морфологічні властивості. При культивуванні в стовпчику 0,75%-ного агару Блаурока утворює колонії у вигляді гречаних зерен або дисків розміром до 0,5-1мм у діаметрі протягом 2-х діб. При культивуванні в рідкому середовищі Блаурока в анаеробних умовах утворює рівномірне помутніння через 24 години. На щільному середовищі Блаурока в анаеробних умовах росте у вигляді колоній S-типу, круглі з рівними краями, діаметром 2-3мм, непрозорі, блискучі, пігменту не утворюють; профіль колоній опуклий, легко знімаються петлею з поверхні щільного середовища. У мазках клітини розташовані у формі "китайських ієрогліфів", мають вигляд прямих або розгалужених паличок з U-подібними роздвоєннями на одному або обох кінцях, іноді утворюють стовщення на кінцях. Нерухомі, у мазку розташовуються безладно. Грам позитивні, іноді усередині клітин виявляється зернистість. Спор не утворюють. Фізіологічні властивості. Облігатний анаероб; росте у високому стовпчику агару в пробірці. У пробірках з рідким середовищем і на чашках Петрі з щільним середовищем росте в анаеробних умовах. При культивуванні в рідкому середовищі в анаеробних умовах через 18-20 годин після посіву в 1мл середовища виростає  $5,0 \cdot 10^8$ - $1,0 \cdot 10^9$  живих мікробних клітин. Максимум росту при 37,5°C. Біохімічні ознаки. Синтезує фермент фруктозо-6-фосфатфосфокеталазу. Зброджує глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, ксилізу, арабінозу, мелізітозу, рафінозу. Не зброджує гліцерол, рамнозу, манітол, саліцин, целобіозу, манозу, сорбітол, трегалозу. Не утворює індолу і каталазу, не відновлює нітрати. Кислотоутворення при вирощуванні в середовищі Блаурока через 72 години становить 71,8°Т. Штам *Bifidobacterium longum* Z4 володіє підвищеною адгезивною активністю стосовно піхвових епітеліоцитів, значною антагоністичною активністю і кислотоутворюючою функцією, природною стійкістю до ряду антибіотиків. Штам непатогенний для експериментальних тварин (мишей), а також для людей (у дослідях на добровольцях). Чутливий до антибіотиків: пеніциліну, оксациліну ампіциліну цефазоліну еритроміцину.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату є специфічне призначення штамів для лікування порушень мікробіоценозу піхви.

В якості прототипу для штамів *Bifidobacterium longum* 1MB B-7020, що заявляється, вибрано штам *Bifidobacterium longum* 17х (патент Російської Федерації 2048517, МПК<sup>6</sup> C12N1/20, A23C9/12, A61K35/74, 1995 рік). Штам депонований і зберігається у Всесоюзній колекції культур промислових мікроорганізмів "ВНИИгенетика" під номером B-5813. Штам *Bifidobacterium longum* 17х має наступні морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні характеристики. Рідкі живильні середовища (Блаурока, кукурудзяно-лактозне, гідролізатно-молочне). Дводобова культура - палички прямі і злегка розгалуженої форми з булавоподібними стовщеннями, розміром 0,5х1,0, 3,6-5,2мкм, одиночні, здвоєні, у вигляді ланцюжків. На рідких середовищах, розлитих у пробірки, високим шаром ростуть у вигляді "стовпа" каламуті з зоною анаеробіозу. У молоці клітини паличкоподібні, укорочені, зернисті. При глибинному рості в агаризованому середовищі колонії мають вигляд стовчених гвіздків розміром 1х2, 2х4мм. Клітини грампозитивні, слабо забарвлюються метиленовою синню, по краях клітин, помітні округлі гранули, каталазонегативні, газ не утворюють, протеолітичною активністю не володіють, нітрати, нітрити не відновлюють. Відношення до вуглеводів і спиртів. Засвоює фруктозу, галактозу, глюкозу, рибозу, манозу, лактозу, мальтозу, мелібіозу, сахарозу, трегалозу, арабінозу, ксилізу, інулін, саліцин, слабо сорбіт; не засвоює целобіозу, рамнозу, маніт і дульцит. Відношення до органічних кислот. Продукують молочну, оцтову кислоти. Відношення до продуктів кишкового обміну. Резистентний до вмісту в середовищі 40% жовчі, 0,5% фенолу, 2,5% NaCl. Оптимальна температура росту 37-39°C, не росте при 45°C. Стійкість штаму до антибіотиків. Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/мл: еритроміцин - 0,05; олеандоміцин - 0,1; бензилпеніцилін - 0,4; ампіцилін - 2,0; оксацилін, тетрациклін - 3,0; гентаміцин, метицилін - 10,0; стрептоміцин - 24,0; левоміцитин - 65,0; леворин, ністатин - 2060,0. Антагоністична активність. Відносно патогенних, умовно-патогенних мікроорганізмів, при спільному культивуванні 1:1 *Bifidobacterium longum* 17х, у рідкому середовищі Блаурока, пригнічував ріст через 48 годин, *E. coli* - 100; *Salmonella typhimorium* - 100; *Pr. vulgaris* - 99,75; *Ps. aeruginosa* - 76; *K. pneumoniae* - 94-95. Штам непатогенний. При внесенні *Bifidobacterium longum* 17х у молоко в кількості 5-6% сквашування настає через 14-16 годин, кислотність 85-110°Т, титр біфідобактерій досягає  $5 \cdot 10^9$ - $1 \cdot 10^{10}$ . Штам рекомендується при готуванні біфідобактерійних препаратів і лікувальних кисломолочних продуктів.

Недоліком цього штаму є недостатньо висока біологічна активність і технологічність.

Лактобактерії роду *Lactobacillus acidophilus* знаходять широке використання у різноманітних галузях народного господарства. Так, наприклад, штам *Lactobacillus acidophilus* CNCM 1-1225, зареєстрований у Національній колекції культур мікроорганізмів (CNCM) Пастерівського інституту (патент Російської Федерації №2126446, МПК<sup>6</sup> C12N1/20, A61K35/74, 1999 рік; патент України №26430, МПК<sup>6</sup> C12N1/20, A61K35/74, 1999 рік), запропоновано для лікування діареї. Пропонована культура і композиція на її основі мають більш високу здатність змагального витіснення патогенних бактерій з кишкових клітин, особливо бактерій, відповідальних за діарею.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату, є вузько специфічне призначення штамів.

У патенті Російської Федерації №2103354, МПК<sup>6</sup> C12N1/20, A23C9/123, 1998 рік описано штам молочнокислих бактерій - *Lactobacillus acidophilus*-13 (ВКПМ В) для виготовлення лікувально-дієтичних кисломолочних продуктів. Як стверджують автори, штам здатний до активного заселення слизової травного тракту і товстої кишки, стійкий до дії магнітних полів зберігає активні біохімічні властивості.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату є специфічне призначення штамів.

Лактобактерії роду *Streptococcus thermophilus* знаходять широке використання у різноманітних галузях народного господарства. Так, наприклад, у патенті WO 82/03971, МПК<sup>6</sup> A23C19/032, 05.05.1982 наведено дані про використання *Streptococcus thermophilus* разом з *Lactobacillus bulgaricus* та *Lactobacillus casei* у виробництві сиру, що має низький вміст жиру. У патенті EP 0148299, МПК<sup>6</sup> C12N01/20, 17.07.1985 дано відомості про використання у виробництві йогурту *Streptococcus thermophilus* у складі бактеріальної культури. Використання штаму *Streptococcus thermophilus* CCM у виробництві ферментованих молочних продуктів із вмістом жиру від 0,05 до

30% і максимальною кислотністю 20°Т наведено у патенті WO 93/16600, МПК<sup>6</sup> A23C09/123, 02.09.1993. Суміш *Streptococcus thermophilus* DN-001 147, *Streptococcus thermophilus* DN-001 339, і *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182 запропонована для ферментування молочних харчових продуктів у патенті EP 0794707, МПК<sup>6</sup> A23C09/123, 17.09.1997.

Для штаму *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7026, що заявляється, прототипом вибрано штам *Streptococcus thermophilus* депонований у CNCM (Національній колекції культур мікроорганізмів) Франції під номером 1-1477, (EP 0783566, МПК<sup>6</sup> C12N01/20, 16.07.1997). Штам *Streptococcus thermophilus* 1-1477 запропонований для сквашування молока.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату є недостатня стійкість до агресивних середовищ шлунково-кишкового тракту.

Більшість сучасних бактерійних препаратів (бакпрепаратів) містять у своєму складі декілька штамів. Відомі бакпрепарати лактобактерин, ацилакт, біфідумбактерин, колибактерин, біфікол, біоспорин, споробактерин тощо, які здатні нормалізувати мікрофлору організму (Вороб'єв і др. Дисбактериозы - актуальные проблемы медицины/ Вестник РАМН -1997, №3, с.3-5). Відомий бактеріальний препарат "Біолактин", описаний у патенті України №20506, МПК<sup>6</sup> C12N1/20; A23C9/12, 27.02.98, бюл. №1. "Біолактин", містить бактерії з родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Lactococcus*. Із роду *Bifidobacterium* він містить штами видів: *B.bifidum*, *B.longum*, *B. infantis*, з роду *Lactobacillus* - штами видів: *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*. При готуванні посівного матеріалу попередньо отриманий консорціум молочнокислих бактерій з'єднують з консорціумом біфідобактерій у співвідношенні 1:3.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату є надмірна складність бактеріального концентрату, а отже велика ймовірність браку технологічного процесу виготовлення кінцевого продукту, що використовує значне число штамів.

Для бакконцентрату "Біокор-1" за прототип вибрано за найбільшою кількістю спільних суттєвих ознак бактеріальний концентрат "Старт", (патент України 22655, МПК<sup>6</sup> C12N1/20; A23C23/00, 30.06.98. Бюл. №3). "Старт" містить біфідобактерії і молочнокислі стрептококи, з біфідобактерій він містить штам *Bifidobacterium longum* VKPM S-1514, з молочнокислих стрептококів *Streptococcus thermophilus* - штами ВКПМ В-4463 і ВКПМ В-3161, або штами ВКПМ В-4464 і ВКПМ В-7331, або штами ВКПМ В-7329 і ВКПМ В-7330 при співвідношенні культур (5-8):1:1. При цьому використовувані штами мікроорганізмів по таксономічній приналежності відповідають видовому складу мікрофлори кишечника людини. Спільними ознаками з винаходом, що заявляється є наявність у складі бакконцентрату суміші ліофілізованих культур штамів біфідобактерій та лактобактерій *Bifidobacterium longum* і *Streptococcus thermophilus*.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату є помірні властивості бакконцентрату "Старт".

Крім бакконцентратів, що містять ліофілізовану біомасу біфідобактерій і лактобактерій, для лікування дисбактеріозів використовують більш складні композиції, до складу яких входять носії (різноманітні лікувальні, смакові, харчові добавки та наповнювачі). Так, наприклад, у патенті України № 20509, МПК A61K35/74; C12N1/20, 27.02.98, бюл. №1 наведено дані про таблетовану форму бактерійного препарату, що містить у якості носія (наповнювача) лактозу, крім того таблетки містять полівінілпіролідон, стеаринову кислоту або карбоксиметилцелюлозу. Спільними ознаками з винаходом, що заявляється є наявність бакконцентрату та лактози. Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату є інше призначення таблеток аналога.

За найбільшим числом спільних суттєвих ознак в якості прототипу для біологічно активної добавки "Біокоректин" вибрано композицію, описану у прикладах 3 і 4 патенту України №24636, МПК<sup>6</sup> C12N1/20; A23C9/12, 30.10.98, бюл. №5, що складається з бакконцентрату (ліофілізованої суміші штамів *Bifidobacterium longum* VKPM S-1514, *Streptococcus thermophilus* ВКПМ В-4463 і *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *acidophilus* ВКПМ В-2707) і носія (суха адаптована суміш "Детолакт" чи суміш сахарози, глюкози). Ця композиція також містить ячмінно-солодовий екстракт, аскорбінову кислоту та стеарат кальцію. Спільними ознаками з винаходом, що заявляється є наявність у складі прототипу таких компонентів: бакконцентрату, носія та стеарату кальцію.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату, є помірні властивості композицій за прототипом.

В основу групи винаходів, що заявляється, поставлено задачу віднайти такі штами біфідобактерій і лактобактерій, які зберігаючи ефективність прототипу, знаходилися б у більш стійкій рівновазі, і були б більш адаптованими до умов України, створити з штамів ефективний бакконцентрат сухий "Біокор-1", а також біологічно активну добавку "Біокоректин".

Зазначену задачу вирішує штам *Bifidobacterium bifidum* 1MB B-7019 для виготовлення бактерійних концентратів та харчових продуктів, які коригують мікрофлору травного тракту людей та тварин.

Зазначену задачу вирішує штам *Bifidobacterium longum* 1MB B-7020 для виготовлення бактерійних концентратів та харчових продуктів, які коригують мікрофлору травного тракту людей та тварин.

Зазначену задачу вирішує штам *Lactobacillus acidophilus* 1MB B-7021 для виготовлення бактерійних концентратів та харчових продуктів, які коригують мікрофлору травного тракту людей та тварин.

Зазначену задачу вирішує штам бактерій *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7026 для виготовлення бактерійних концентратів та харчових продуктів, які коригують мікрофлору травного тракту людей та тварин.

Зазначена задача вирішується тим, що бакконцентрат, який містить суміш ліофілізованих культур штамів біфідобактерій та лактобактерій, згідно з винаходом він містить із біфідобактерій штами *Bifidobacterium bifidum* 1MB B-7019 і *Bifidobacterium longum* 1MB B-7020, а в якості лактобактерій містить штами *Lactobacillus acidophilus* 1MB B-7021 і *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7026 при такому співвідношенні, % мас.:

біфідобактерії	40-80
лактобактерії	20-60

Зазначена задача вирішується тим, що біологічно активна добавка, яка містить бакконцентрат і носій, згідно з винаходом, в якості бакконцентрату вона містить бакконцентрат "Біокор-1", який складається із біфідобактерій штамів *Bifidobacterium bifidum* 1MB B-7019 та *Bifidobacterium longum* 1MB B-7020 у кількості  $10^7$ - $10^{12}$  КУО/г і лакто-

бактерій штамів *Lactobacillus acidophilus* 1MB B-7021 та *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7026 у кількості  $10^7$ - $10^{10}$  КУО/г, в якості носія вона містить фруктовий, цитрусовий чи овочевий порошок, або порошок ананасів, чи баштанових культур, або їх суміш, а також цукор молочний і стеарат кальцію при такому співвідношенні компонентів, % мас.:

бакконцентрат	10-25
цукор молочний	20-35
стеарат кальцію	1-2
носій	решта

Згідно з винаходом, біологічно активна добавка додатково містить вітаміни у розрахунку на 1кг продукту:

вітамін С	1,0-20г
вітамін В <sub>1</sub>	15-80мг
вітамін В <sub>6</sub>	15-80мг
вітамін В <sub>12</sub>	1,0-4,0г
вітамін РР	10-20мг
вітамін А	2,0-5,0мг
вітамін D	10-50мг
вітамін Е	5,0-10г

Згідно з винаходом, біологічно активна добавка в якості носія вона містить порошок, вибраний з наступного ряду: порошок яблук, порошок груш, порошок винограду, порошок цитрусових, порошок ананасів, порошок моркви, порошок буряка, порошок часнику, порошок гарбуза, порошок кавуна, порошок дині, порошок капусти, порошок петрушки, порошок кропу, порошок шпинату, порошок топінамбуру.

Згідно з винаходом, біологічно активна добавка в якості носія містить суміш порошків фруктових, овочевих, баштанових та цитрусових культур.

Технічним результатом групи винаходів, що заявляється, є адаптованість властивостей біокорективу до умов України, а також забезпечення концентрування та розмноження у просвіті кишечника бактерій, що входять до складу бакконцентрату.

Далі наведено відомості про штами, що заявляються. Штам *Bifidobacterium bifidum* 1MB B-7019 ідентифікований в науково-методичному центрі "Біокорекція" м.Київ, узвіз Протасів Яр. Штам *Bifidobacterium bifidum* депонований у колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України під номером 1MB B-7019 у 2000р.

Родовід штаму. Штам ізолюваний з кишечного вмісту. Спосіб одержання штаму. Штам культивований в напіврідкому поживному середовищі Блаурока шляхом пересівів з окремих колоній 1-2 рази на тиждень з експозицією в термостаті при  $38 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Клонування проведено двадцятьма пасажами з уокремлених колоній з розведення щільного росту, яке відповідає 1:100млн. Штам виявив антагонізм до поширених умовно-патогенних та патогенних мікробів, має високий рівень адгезії до слизової оболонки кишечника, достатню для виробництва швидкості накопичення біомаси, високі показники кислотності.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму Морфологія. Клітини штаму Грампозитивні поліморфні палички, довжиною 4-5мкм, товщиною біля 0,5мкм, можуть мати біфуркації на одному, або обох кінцях; розташовуються скупченнями по 7 і більше клітин, або поодиноці, парами.

Культуральні властивості. Вимагає анаеробних умов, використання регенерованих середовищ. В лабораторіях добре культивується в стовпчиках напіврідкого середовища Блаурока та інших за умови, що висота стовпчика не нижче 5см. Засівається піпетками місткістю в 1-2мл, з введенням матеріалу до дна пробірки з наступним перемішуванням без барботажу. Через добу при щільному посіві стає помітною смуга прозорої незарослої рідини безпосередньо під меніском. Культура вимагає 1-2 діб вирощування, аби досягти максимальної концентрації. За повного терміну культивування концентрація може сягати 100млн. на мл і більше. Штам швидко утворює смугасті видовжені колонії, які на другу добу грубішають і стають схожі на "ракетні запуски" з характерним розгалуженням в нижній частині. На поверхні агарових середовищ колонії напівпрозорі, округлі, трохи розпливчасті діаметром 2-3мм.

Фізіолого-біохімічні властивості. Результати випробувань наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Ферментуюча активність штаму *Bifidobacterium bifidum* 1MB B-7019 до цукрів та інших речовин

Речовина	Утворення кислоти	Речовина	Утворення кислоти
Арабіноза	-	Сорбіт	-
Саліцин	-	Ксилоза (на 2 добу)	+/-
Целобіоза	-	Глюкоза	+
Трегалоза	-	Галактоза	+/-
Меліцитоза	-	Рамноза	-
Рибоза	-	Маніт	-
Інозит	-	Лактоза (на 3 добу)	+
Дульцит	-	10% желатин	не розріджує

Молоко закислює, згусток не утворює.

Штам призначений для використання в складі заквасок, бактерійних концентратів для виготовлення сумішей і препаратів з метою корекції порушень мікробіоценозів і лікування кишкових захворювань людей і свійських тварин.

Продукти, що синтезуються штамом. Штам синтезує кислоти, зокрема оцтову і молочну, чинники мікробного

антагонізму.

Активність і промислові показники штаму. Антагоністична активність штаму. Для визначення антагоністичної активності штаму було застосовано метод його вирощування на агарових платівцях з підшаруванням культури *Serratia marcescens*, як поглиначи кисню. Штам рясно засівався на поверхню агару і через добу перпендикулярно до нього на відстані не більше 1-2мм стрічками засівались штами, що випробовувались. Склад агару для випробування антагоністичної дії відповідав складові казеїно-дріжджово-гідролізатного середовища з доданням агару до 2%. Результати наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Антагоністична активність штаму *Bifidobacterium bifidum* 1MB B-7019

Назва виду і штаму	Відстань пригнічення у мм
<i>E. coli</i> 026 F/41	11
<i>E. coli</i> 0111 "Stoken"	12
<i>E. coli</i> Aberdin	12
<i>S. sonnei</i> 17 (reg.N 100033)	9-10
<i>S. flexneri</i> 2a (reg N 100035)	9-10
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13885	1
<i>S. typhi</i> 562 (свіжовиділений)	9-10
<i>P. mirabilis</i> F 458	13
<i>P. vulgaris</i> U 8	10
<i>P. vulgaris</i> F 295 A	11
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	11

Специфічна активність в кишечнику (рівень адгезії штаму до поверхні слизової оболонки (рівень гістадгезії) експериментальних тварин).

Рівень адгезії (гістадгезії) клітин кишкових мікробів, зокрема біфідобактерій є прямим визначенням їх колонізаційної активності. Випробовували на свіжоекстірпованих кишечниках за методом В. П. Жалко-Титаренко, В.М. Бондаренко, А.В. Григор'єва, Л.Г. Купчинського. Метод складається з 9 окремих процедур: готування мікробної суспензії, передопераційної підготовки тварини, евтаназії, препарування кишечнику, його канюлізації і введення мікробної суспензії, витримання при зниженій температурі, відмиванні, триптичної дезінтеграції і посіву. Результати розраховували за формулою В.Жалко-Титаренко:

$$C_{\max} = \frac{m \cdot V}{l \cdot a},$$

де:  $C_{\max}$  - рівень гістадгезії в кількостях колонісуючих одиниць на кв.мм поверхні слизової,

$m$  - концентрація мікробів в дезінтеграті,

$V$  - об'єм дезінтеграту,

$l$  - довжина експонованого відрізка кишки,

$a$  - ширина відрізка кишки.

Гістадгезійна активність штаму залежить від концентрації біфідобактерій в порожнині кишки -  $K$ , за співвідношенням:

$$C_{\max} = u \cdot K$$

де:  $u$  - коефіцієнт гістадгезії, що обчислюється за результатами досліду за формулою:

$$u = \frac{C_{\max}}{K}$$

Специфічна, колонізаційна (гістадгезійна) активність штаму наведена в таблиці 3.

Таблиця 3

Гістадгезійна активність штаму *Bifidobacterium bifidum* 1MB B-7019

Концентрація біфідобактерій штаму в млн/мл	Рівень гістадгезії в КУО на кв.см слизової	Середнє значення коефіцієнта гістадгезії $u$
0,1	740±37	0,36±0,18
1,0	1542±771	
10,0	30475±1523	
100,0	67933±3396	

Для визначення конкурентноздатності штаму за сайти адгезії в кишечнику обчислено показник конкуренції порівняно з вірулентними шигеллами Флек-снера, що мають  $U=0,03$ . Показник конкуренції:

$$(U_{\text{штаму}})/(U_{\text{шигел}})=0,36:0,03=12.$$

Це означає, що штам перевищує гістадгезивну потужність збудника дизентерії майже у 12 разів.

Репродуктивна активність. Штам досягає максимальної концентрації при репродукції у флаконах з казеїново-

дріжджово-гідролізатним середовищем на третю добу вирощування. Початкова швидкість розмноження при концентраціях 10000-1000000 КУО на мл складає величину  $m=0,2$  за годину. Рівні максимальних концентрацій і відповідно кислотності за Тернером наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Концентрація штаму *Bifidobacterium bifidum* 1MB B-7019 і кислотність розчину протягом відрощування

Кількість годин відрощування	Концентрація КУО на мл	Градуси Тернера
0	38тис.	0
8год. 30хв.	20млн.	45
23	200млн.	75
45	100млн.	135
53	100млн.	146

Довгострокове зберігання штаму. Для довгострокового зберігання штаму необхідно його ліофілізувати за технологією, що використовується при випуску препаратів типу "Біфідумбактерин сухий". Тимчасове продовжене зберігання протягом тижня, до місяця включно припустимо в пробірках з середовищем Блаурока та іншим під шаром вазелінової олії в рефрижераторі з температурою не нижче  $+5^{\circ}\text{C}$ . Для ліофілізації треба мати культуру штаму вирощену в напіврідкому середовищі при  $39^{\circ}\text{C}$  протягом 2-х діб. До взятого об'єму культури додають свіжовиготовлене середовище висушування в кількості 33%. Середовище висушування складається з трьох рівних частин по 50мл: знежиреного молока - "обрату"; розчину 31,5г сахарози у дистильованій воді; розчину 4,5г желатини у дистильованій воді (желатину для набухання витримують у теплій воді 1-2 години). Компоненти нарізно стерилізують в автоклаві 30хв. при  $110^{\circ}\text{C}$ , змішують в теплому стані і додають до культури при  $37-39^{\circ}\text{C}$ . Режим висушування: заморожування під вакуумом до  $-45^{\circ}\text{C}$ , ступінчасте підвищення температури по  $5^{\circ}\text{C}$  на годину до  $+22-+24^{\circ}\text{C}$ , досушування протягом 12 год.

Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму. Штам культивують в напіврідких середовищах за відомими стандартними рецептурами. Основою культивування є ряд пробірок з відповідним середовищем по 9мл, що попередньо бажано регенерувати. Колонія штаму вноситься в першу пробірку ряду, ретельно перемішується насмоктуваннями без барботажу. Матеріал з першої пробірки далі переноситься в наступні по 1мл (серійні десятикратні розведення). Температура культивування  $38\pm0,5^{\circ}\text{C}$ . Для одержання штаму з наданих Депозитарієм флаконів, культура оживлюється регідратуванням шляхом додавання 5мл стерильної дистильованої води, фізіологічного розчину хлориду натрію або поживного середовища. Після цього матеріал серійно розводять по 1мл в рядках з 9 пробірками по 9мл середовища в кожній і термостатують з щоденною перевіркою протягом 4 днів. Генетичні особливості штаму. Штам генетично однорідний. Штам чутливий до деяких антибіотиків: гентаміцину, тетрацикліну, ампіцикліну, карбе-ніциліну, рифампіцину, цефазоліну, мономіцину, канаміцину. Штам резистентний до нітроксоліну, налідіксової кислоти.

Штам *Bifidobacterium longum* 1MB B-7020 депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України 25 жовтня 2000 року. Видова назва культури *Bifidobacterium longum*. Родовід штаму - Штам ізольований з кишечного вмісту. Культивований в напіврідкому поживному середовищі Блаурока шляхом пересівів з окремих колоній 1-2 рази на тиждень з експозицією в термостаті при  $38\pm0,5^{\circ}\text{C}$ . Клонування проведено двадцятьма пасажами з укреплених колоній з розведення щільного росту, яке відповідає 1:100млн. Штам виявив антагонізм до поширених умовно-патогенних та патогенних мікробів, має високий рівень адгезії до слизової оболонки кишечника, достатню для виробництва швидкість накопичення біомаси, високі показники кислотності в градусах Тернера. Штам ідентифіковано в науково-методичному центрі "Біокорекція" м.Київ, узвіз Протасів Яр, 4.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму. Морфологія. Клітини штаму Грампозитивні поліморфні палички, довжиною 2-3,5мкм, товщиною біля 0,5мкм, можуть мати біфуркації на одному, або обох кінцях; розташовуються скупченнями по 7 і більше клітин, або поодиночці, парами.

Культуральні властивості. Вимагає анаеробних умов, використання регенованих середовищ. На збагачених середовищах утворює ледь помітний ріст в аеробних умовах. Добре культивується в стовпчиках напіврідкого середовища Блаурока та інших за умови, що висота стовпчика не нижче 5см. Засівається піпетками місткістю в 1-2мл, з введенням матеріалу до дна пробірки з наступним перемішуванням без барботажу. Через добу при щільному посіві стає помітною смуга прозорої незарослої рідини безпосередньо під меніском. Культура вимагає 1-2 діб вирощування, аби досягти максимальної концентрації. За повний термін культивації концентрація може досягати 100млн/мл і більше. Штам швидко утворює смугасті видовжені колонії, які на другу добу грубішають: стають схожі на "ракетні запуски" з характерним розгалуженням в нижній частині. На поверхні агарових середовищ колонії напівпрозорі, округлі, трохи розпливчасті діаметром 2-3мм. Фізіолого-біохімічні властивості. Результати випробувань наведені в таблиці 5.

Таблиця 5

Ферментуюча активність штаму *Bifidobacterium longum* 1MB B-7020

Речовина	Утворення кислоти	Речовина	Утворення кислоти
Арабіноза	-	Сорбіт	-
Саліцин	-	Ксилоза (на 2 добу)	-
Целобіоза	+	Глюкоза	+
Трегалоза	+	Галактоза	+

Меліцитоза	+	Рамноза	-
Рибоза	+	Маніт	+
Інозит	-	Лактоза(на 3 добу)	+
Дульцит	-	10% желатин	не розріджує

Молоко закислює, утворюючи характерний згусток. За переліком ферментативних ознак штам ідентифікується як варіант *Bifidobacterium longum*.

Галузь використання штаму. Штам призначений для використання в складі заквасок, бактерійних концентратів для виготовлення сумішей і препаратів з метою корекції порушень мікробіоценозів і лікування кишкових захворювань людей і свійських тварин.

Продукт, що синтезується штамом. Штам синтезує кислоти, зокрема оцтову і молочну, чинники мікробного антагонізму.

Антагоністична активність штаму. Для визначення антагоністичної активності штаму було застосовано метод його вирощування на агарових платівцях з підшаруванням культури як поглиначи кисню. Штам рясно засівався на поверхню агару і через добу перпендикулярно до нього на відстані не більше 1-2мм стрічками засівались штамми, що випробовувались. Склад агару для випробування антагоністичної дії відповідав складові казеїно-дріжджово-гідролізатного середовища з доданням агару до 2%. Результати наведені в таблиці 6, в якій подані також назви випробуваних мікробних видів та їх штамів.

Таблиця 6

Антагоністична дія *Bifidobacterium longum* 1MB B-7020

Назва виду і штаму	Відстань пригнічення у мм
<i>E. coli</i> 026 F/41	7
<i>E. coli</i> 0111 "Stoken"	12
<i>E. coli</i> Aberdin	9-10
<i>S. sonnei</i> 17 (reg. N 100033)	9-10
<i>S. flexneri</i> 2a (reg N 100035)	10
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13885	0
<i>S. typhi</i> 562 (свіжовиділений)	6
<i>P. mirabilis</i> F 458	5
<i>P. vulgaris</i> U 8	2
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	12

Специфічна активність в кишечнику рівень адгезії штаму до поверхні слизової оболонки (рівень гістадгезії) експериментальних тварин (білих мишей).

Рівень адгезії (гістадгезії) клітин кишкових мікробів, зокрема біфідобактерій є прямим визначенням їх колонізаційної активності. Випробовується на свіжо екстірпованих кишечниках за методом В.П. Жалко-Титаренко, В.М. Бондаренко, А.В. Григор'єва, Л.Г. Купчинського. Метод складається з 9 окремих процедур: готування мікробної суспензії, передопераційної підготовки тварини, етаназії, препарування кишечника, його канюлізації і введення мікробної суспензії, витримання при зниженій температурі, відмиванні, триптичної дезінтеграції і посіву. Результати розраховуються за формулою В.П. Жалко-Титаренко:

$$C_{\max} = \frac{m \cdot V}{l \cdot a},$$

де:  $C_{\max}$  - рівень гістадгезії в кількостях колонієутворюючих одиниць на кв.мм поверхні слизової,

$m$  - концентрація мікробів в дезінтеграті,

$V$  - об'єм дезінтеграту,

$l$  - довжина експонованого відрізка кишки,

$a$  - ширина відрізка кишки.

Гістадгезійна активність штаму залежить від концентрації біфідобактерій в порожнині кишки -  $K$ , за співвідношенням:

$$C_{\max} = u \cdot K$$

де:  $u$  - коефіцієнт гістадгезії, що обчислюється за результатами дослідів за формулою:

$$u = \frac{C_{\max}}{K}$$

Специфічна, колонізаційна (гістадгезійна) активність штаму наведена в таблиці 7.

Таблиця 7

Гістадгезійна активність штаму *Bifidobacterium longum* 1MB B-7020

Концентрація біфідобактерій штаму в млн./мл	Рівень гістадгезії, в КУО на кв.см слизової	Середнє значення коефіцієнта гіс- тадгезії $u$
--	--	---

0,1	425±21	
1,0	5457±270	
10,0	22980±1200	0,307±0,15
100,0	243210±12110	

Для визначення конкурентноздатності штаму за сайти адгезії в кишечнику обчислено показник конкуренції порівняно з вірулентними шигеллами Флекснера, що мають  $U=0,03$ : показник конкуренції:

$$(U_{\text{штаму}})/(U_{\text{шигел}})=0,307:0,03=10,05$$

Це означає, що штам перевищує гістадгезивну потужність збудника дизентерії майже у 10 разів.

Репродуктивна активність. Штам досягає максимальної концентрації при репродукції у флаконах з казеїново-дріжджово-гідролізатним середовищем на третю добу вирощування. Початкова швидкість розмноження при концентраціях 10000-1000000 КУО на мл складає величину  $m=0,706$  за годину. Рівні максимальних концентрацій і відповідно кислотності за Тернером наведені в таблиці 8.

Таблиця 8

Концентрація штаму *Bifidobacterium longum* 1MB B-7020 і кислотність розчину протягом відрощування

Кількість годин відрощування	Концентрація КУО на мл	Градуси Тернера
0	6млн.	0
3год. 03хв.	50млн.	50,4
5год. 14хв.	170млн.	60,6
16год. 19хв.	500млн.	68,53
21год.	400млн.	74,1
45год.	500млн.	103,1

Довгострокове збереження штаму. Для довгострокового збереження штаму необхідно його ліофілізувати за технологією, що використовується при випуску препаратів типу "Біфідумбактерин сухий". Тимчасове продовжене зберігання протягом тижня, до місяця включно припустимо в пробірках з середовищем Блаурока та інших під шаром вазелінової олії в рефрижераторі з температурою не нижче  $+5^{\circ}\text{C}$ . Для ліофілізації треба мати культуру штаму вирощену в напіврідкому середовищі при  $39^{\circ}\text{C}$  протягом 2-х діб. До взятого об'єму культури додають свіжовиготовлене середовище висушування в кількості 33%. Середовище висушування складається з трьох рівних частин по 50мл: знежиреного молока "обрату"; розчину 31,5г сахарози у дистильованій воді; розчину 4,5г желатини у дистильованій воді (желатину для набухання витримують у теплій воді 1-2 години). Компоненти нарізно стерилізують в автоклаві 30хв. при  $110^{\circ}\text{C}$ , змішують в теплому стані і додають до культури при  $37-39^{\circ}\text{C}$ . Режим висушування: заморожування під вакуумом до  $-45^{\circ}\text{C}$ , ступінчасте підвищення температури по  $5^{\circ}\text{C}$  на годину до  $+22 - +24^{\circ}\text{C}$ , досушування - 12 год.

Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму. Штам культивують в напіврідких середовищах за відомими стандартними рецептурами. Основою культивування є ряд пробірок з відповідним середовищем по 9мл, що попередньо бажано регенерувати. Колонію штаму вносять в першу пробірку ряду, ретельно перемішують насмоктаннями без барботажу. Матеріал з першої пробірки далі переносять в наступні по 1мл (серійні десятикратні розведення). Температура культивування  $38\pm0,5^{\circ}\text{C}$ . Для одержання штаму з наданих Депозитарію флаконів, культуру оживлюють регідратуванням шляхом додавання 5мл стерильної дистильованої води, фізіологічного розчину хлориду натрію або поживного середовища. Після цього матеріал серійно розводять по 1мл в рядах з 9 пробірками по 9мл середовища в кожній і термостатують з щоденною перевіркою протягом 4 днів.

Генетичні особливості штаму. Штам генетично однорідний. Штам чутливий до деяких антибіотиків: гентаміцину, тетрацикліну, ампіцикліну, карбеніциліну, рифампіцину. Штам резистентний до нітроксоліну, невіграмону, поліміксину, левоміцетину, стрептоміцину, мономіцину.

Штам *Lactobacillus acidophilus* 1MB B-7021 депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України 25 жовтня 2000 року. Видова назва культури *Lactobacillus acidophilus*. Родовід штаму - виділений від здорової дитини 7 років в 199 р. співробітниками науково-медичного центру "Біокорекція", м.Київ, узвіз Протасів Яр, 4.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму. Морфологія. Клітини штаму Грампозитивні правильної форми палички, розмірами  $(1,4-1,5)\times(3,0-6,0)\mu\text{м}$  (іноді нитчасті), розташовуються по 1-2 або короткими ланцюжками. Спор не містять, не рухливі. Не виявлено мезодіамінопічелінової кислоти в клітинних стінках. Колонії - білуваті з нерівними краями, непрозорі, шорсткуваті, розмірами 1-2мм.

Культуральні властивості. Потребує для росту багатих складних поживних середовищ. Оптимальне рН для росту 5,5-6,2, оптимальна температура  $+40\pm2^{\circ}\text{C}$ , ріст відсутній при  $15^{\circ}\text{C}$ . Факультативний анаероб.

Фізіолого-біохімічні властивості. Не синтезує каталази, індолу,  $\text{H}_2\text{S}$ , цитохромів (бензидиновий тест негативний), не розріджує желатини, не відновлює нітрати до нітритів. Росте при 40%-ій концентрації жовчі в середовищі, росте у молоці з утворенням згустку та відновлює молоко з лакмусом чи метиленою синькою. Зброджує вуглеводи до молочної кислоти, не утворює  $\text{CO}_2$  із глюкози. Зброджує: фруктозу, галактозу, глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, маннозу, саліцин. Не зброджує: рамнозу, рибозу, трегалозу, ксилозу, арабінозу, сорбіт, маніт, глюконат, гліцерин. Галузь використання штаму. Штам призначений для використання в складі заквасок та бактерійних концентратів, для приготування препаратів та харчових продуктів, які коригують мікрофлору травного тракту людей та тварин. Продукт, що синтезується штамом. Штам синтезує молочну кислоту, яка являється чинником мікробного антагонізму. Антагоністична активність штаму. Для визначення антагоністичної активності штаму було застосовано метод його вирощування на пластинах молочного агару та "Лактоагару" при відсутності кисню в екзикаторі.

Антагоністична дія *Lactobacillus acidophilus* 1MB B-7021

Назва виду і штаму	Відстань пригнічення в мм
<i>Escherichia coli</i> 026 F41	8
<i>E. coli</i> 0111 Stoken	13
<i>E. coli</i> Aberdin	10-12
<i>Shigella sonnei</i> 17 (reg. 100033)	9-10
<i>S. flexneri</i> 2a (reg. 100035)	10
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13885	3
<i>Salmonella typhi</i> 562 (свіжовиділений)	6
<i>Proteus mirabilis</i> F 458	6
<i>P. vulgaris</i> U 8	3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	12

Спосіб, умови та склад середовища для культивування та зберігання штаму. Для довгострокового зберігання штаму необхідно його ліофілізувати за технологією, що використовується при випуску препаратів типу "Біфідум-бактерин сухий". Тимчасове продовжене зберігання протягом 1-3 тижнів, до місяця включно, припустимо в пробірках з молочним агаром та під шаром вазелінової олії в рефрижераторі з температурою не нижче +5°C. Для ліофілізації вирощують культуру в напіврідкому середовищі при 39-40°C протягом двох діб. До культури додавають 33% свіжовиготовленого захисного середовища для висушування такого складу:

знежиреного молока (обрату) 50мл  
 31,5%-ого розчину сахарози на дистильованій воді 50мл  
 4,5%-ого розчину желатини на дистильованій воді (попередньо дають желатині набухнути в теплій воді 1-2 години) 50мл

Компоненти нарізно стерилізують в автоклаві 30хв. при 110°C і змішують перед використанням. Режим висушування: заморожування до -45°C, висушування під вакуумом від -45°C протягом 10-12 годин з підвищенням температури по 5°C на годину до +22 - +24°C і досушування при цій температурі 6-12 годин. Штам культивують на комерційному середовищі "Лактоагар" (Росія), агарі з молоком, гідролізатно-молочному або кукурудзяно-лактозному середовищі.

Молочний агар. 2% агару та 20% знежиреного молока (відновлене комерційне сухе молоко з кислотністю 16-18°Т в кількості 100г на 900мл дистильованої води). Стерилізують окремо агар та молоко при (121±1)°C 10хв. При використанні до розплавленого агару додають 20% знежиреного молока, старанно перемішують та розливають в чашки Петрі.

Гідролізатно-молочне середовище. Гідролізоване молоко розбавляють питною водою 1:1. В невеликій кількості розведеного гідролізату розплавляють агар із розрахунку (2,5±0,5)г на 1куб.дм приготовленого середовища. До залишку гідролізату додають 20г пептону, 3,5г хлористого натрію, суміш нагрівають до 80±2°C, після чого змішують з розплавленим агаром. Виставивши рН7,5±0,1, кип'ятять 15хв., відстоюють, фільтрують, доливають гарячою дистильованою водою до заданого об'єму та додають 10,0г лактози, 0,15г солянокислого цистеїну. Середовище розливають в пробірки по 10,0куб.см та стерилізують парою при 112±1°C протягом 30хв. в розігрітому автоклаві рН готового середовища 7,1±0,2.

Кукурудзяно-лактозне середовище. В невеликій кількості дистильованої води плавлять агар із розрахунку (2,5±0,5)г на 1куб.дм приготовленого середовища. До залишку дистильованої води додають (10±1)г пептону, (40±1) г чи куб.см водного розчину кукурудзяного екстракту, розбавленого 1:6, (6±0,5)г натрію лимоннокислого тризаміщеного, (0,12±0,02)г магнію сірчанокислого, (2±0,1)г калію фосфорнокислого двозаміщеного. Суміш нагрівають до (80±2)°C, після чого з'єднують з розплавленим агаром, додають (10±0,5)г лактози, (0,15±0,05)г солянокислого цистеїну або (0,5±0,1)г аскорбінової кислоти. рН готового середовища 7,0±0,2. Для одержання штаму з наданих Депозитарію флаконів, культуру оживляють регідратуванням сухого матеріалу шляхом додавання 5мл стерильної дистильованої води, фізіологічного розчину хлориду натрію або рідкого поживного середовища. Після цього суспензію серійно розводять по 1мл в рядах з 9 пробірками по 9мл середовища в кожній і термостатують з щоденною перевіркою протягом 4 днів. Можна серійні розведення сухої біомаси засівати на молочний агар або "Лактоагар" в чашки Петрі і термостатувати.

Особливості штаму. Штам генетично однорідний. Штам чутливий до деяких антибіотиків: ампіцикліну, цефалотину, мономіцину, пеніциліну, кліндаміцину, канаміцину, гентаміцину, резистентний до нітроксоліну, 5-НОК, невіграмону.

Штам *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7026 депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України 18 червня 2001 року.

Видова назва мікроорганізму: *Streptococcus thermophilus*. Родовід штаму - ізолюваний із кисломолочних продуктів. Штам ідентифікований в лабораторії "Біокорекція", м.Київ.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості. Факультативний анаероб. Вимагає для росту багатих середовищ з вуглеводами та органічними джерелами азоту (пептон, гідролізат казеїну). При вирощуванні на поверхні живильних агаризованих середовищ (МРС) утворюють білуваті круглі блискучі колонії діаметром 0,5-1,0мм. Глибинні колонії у вигляді білих дисків діаметром до 1мм. У бульйоні утворюють однорідну муть та аморф-

ний осад. Коковидні грампозитивні клітини 0,8-1,0мкм, іноді до 1,2мкм діаметром, розміщуються попарно, групами і ланцюжками (останні превалюють при рості у рідкому та напіврідкому середовищі). Нерухомі, спор не утворюють. Желатин не розріджують, утворюють аміак із аргініну. Не містять каталази. Молоко сквашують, лакмус у молоці відновлюють, не відновлюють молоко з 0,1% метиленової синьки. Не ростуть при 40% жовчі, при 6,5% NaCl, при pH9,6, при +10, +15 °C. Ростуть при 2,5% NaCl, при 45°C та слабо при 50°C. Хороший ріст в зоні 25-45°C, оптимум 40°C. Оптимальне для росту значення pH6,0-6,5. Виживають у рідкому середовищі при pH7,0 після прогріву при 60°C протягом 30хв. Зброджують вуглеводи до лактату без продукування вуглекислого газу. Зброджують: глюкозу, лактозу (здатність до зброджування лактози може втрачатися при культивуванні), фруктозу, сахарозу; не зброджують маніт, гліцерин.

Галузь використання штаму. Штам найбільш ймовірно використовувати у харчовій промисловості.

Продукт, що синтезується штамом. Продукується комплекс біологічно активних речовин, зокрема молочна кислота, антибіотикоподібні речовини. Активність штаму. Сквашує стерильне знежирене молоко (обрат) через 4-6 годин культивування при температурі 40°C. Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму. Штам культивують при 37-40°C протягом 24-48 годин на поверхні агаризованих або в рідких середовищах. Використовуються середовища МРС, МПА або МПБ з 1% глюкози, стерильне знежирене молоко, відновлене 10% знежирене молоко. Культуру пересівають раз у місяць. Склад середовища МРС (г/л):

пептон	10
м'ясна вода	100
дріжджовий автолізат	100
екстракт печінки	100
глюкоза	20
оцтовокислий натрій	5
калію гідрофосфат	2
магнію сульфат	0,2
марганцю сульфат	0,05
твін 80	1
дистильована вода	до 10001
pH=6,6	

Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму. Культуру вирощують при оптимальних умовах у 10% відновленому молоці, стерильному знежиреному молоці, напіврідких середовищах (див. вище) з 0,7г/л агару. Зберігають при +4°C протягом місяця. Клітини можна сублимаційно висушувати після заморожування до -35°C і зберігати протягом 3-5 років. Для ліофілізації культуру вирощують протягом 24 годин на стерильному знежиреному молоці і змішують у співвідношенні 1:1 з захисним середовищем. Захисне середовище при ліофілізації у %:

20%-ного водного розчину сахарози	10
30%-ного водного розчин лимоннокислого натрію	10
розчин желатози (1 частину желатози розчиняють у 6 частинах дистильованої води)	30

Відомості про патогенність (для людини, тварин чи рослин). Штам непатогенний для теплокровних тварин. Не досліджували аутокотрофісність, резистентність до антибіотиків, фагів тощо.

Далі винахід, що заявляється, підтверджується прикладами конкретної реалізації для бакконцентрату сухого "Біокор-1" і біологічно активної добавки "Біокоректин". Приклад 1. Для виготовлення бакконцентрату сухого "Біокор-1" брали:

штам *Bifidobacterium bifidum* 1MB B-7019,  
штам *Bifidobacterium longum* 1MB B-7020,  
штам *Lactobacillus acidophilus* 1MB B-7021,  
штам *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7026,  
печінкове середовище (Блаурока) для культивації біфідобактерій,  
питна вода за ГОСТ 2874,  
магній сірчаноокислий 7-водний за ГОСТ 4523,  
натрію гідроксид за ГОСТ 4328,  
натрій лимоннокислий за ГОСТ 22280,  
молоко знежирене сухе за ГОСТ 10970,  
молоко знежирене кислотністю не більше 19°T, одержане з молока за ДСТУ 3662.

Для накопичення біомаси мікроорганізмів виготовляли середовище культивування, основою якого є відновлене знежирене молоко, білки якого гідролізовані протосубтиліном з додаванням лактози, лимоннокислого натрію, сірчаноокислого заліза та стимуляторів росту. У підготовлене поживне середовище вносили посівний матеріал, який готували таким чином. Для виготовлення посівного матеріалу (інокуляту) біфідобактерій 5% добової культури, що була вирощена у середовищі Блаурока, додають у виготовлене середовище культивування для накопичення біомаси. Культивування здійснювали протягом 36год. при температурі 35±1°C. Посівна доза біфідобактерій у ферментер становила 7%. Інокулят молочнокислих бактерій *Streptococcus thermophilus* готували на стерилізованому знежиреному молоці з посівною дозою 1% при температурі 37±1°C протягом 16год. Посівна доза термофільного стрептокока в ферментер становила 3%. Інокулят *Lactobacillus acidophilus* готували на стерилізованому знежиреному молоці з посівною дозою 0,7% при температурі 38±1°C протягом 16год. Посівна доза *Lactobacillus acidophilus* у ферментер становила 2%. Накопичену біомасу мікроорганізмів відокремлювали від культурального середовища на суперцентрифугі, зважували та змішують зі стерильним водним розчином захисного середовища, що містить 5% сухого знежиреного молока, 8% сахарози, 4,5% натрію лимоннокислого. Одержану таким чином суспензію заморожували в морозильній шафі при температурі мінус (35±5)°C і висушували в

сублімаційній сушарці. Одержали бакконцентрат "Біокор-1", що мав такі властивості. Сипучий порошок світло-коричневого кольору. Смак і запах - знеособлені, без сторонніх присмаків та запахів. Масова частка води - 5%. Тривалість сквашування молока (при внесенні 1г на 1л) при 37°C становила 4год. Співвідношення кількості біфідобактерій та лактобактерій, у %:

біфідобактерії	40
лактобактерії	60

Приклад 2. Бакконцентрат "Біокор-1" готували так, як описано у прикладі 1, за винятком того, що дещо змінювали співвідношення інокулятив біфідобактерій та лактобактерій. Одержали сухий бакконцентрат із таким співвідношенням кількості біфідобактерій та лактобактерій, у %:

біфідобактерії	80
лактобактерії	20

Бакконцентрат мав кремовий колір, масова частка води - 4,9%. Тривалість сквашування молока при додаванні до 1 літра молока 1г бакконцентрату становила 5 годин при 37°C.

Приклад 3. Бакконцентрат "Біокор-1" готували так, як описано у прикладі 1, за винятком того, що дещо змінювали співвідношення інокулятив біфідобактерій та лактобактерій. Одержали сухий бакконцентрат із таким співвідношенням кількості біфідобактерій та лактобактерій, у %:

біфідобактерії	60
лактобактерії	40

Сухий бакконцентрат "Біокор-1" - сипучий порошок кремового кольору без сторонніх присмаків та запахів. Масова частка води - 4,8%. Тривалість сквашування молока - 15год.

Бакконцентрат "Біокор-1" застосовують в харчовій промисловості для виготовлення профілактичних молочно-кислих продуктів і біологічно активних добавок.

Крім того, бактеріальний концентрат "Біокор-1" має високу біологічну активність, сприяє активній колонізації штамів біфідобактерій та лактобактерій у травній системі людини, проявляє високий рівень антагоністичної активності до небажаної мікрофлори слизових оболонок. "Біокор-1" є лікувально-профілактичним продуктом, нормалізує мікрофлору слизових оболонок, відновлює функції кишкового тракту, активізує синтез вітамінно-ферментних комплексів, підвищує імунітет, сприяє зникненню алергічних проявів на шкірі.

За даними клінічних досліджень терапевтична дія у хворих з загостреннями патології та дисбіозами лікуванні наступала на 2-4 день у 50% випадків, на 4-6 день ще у 30% випадків, що складало разом 80%. Для хворих з хронічними захворюваннями кишечника терапевтична дія проявлялась на 6-12 день у 80% хворих. Бакконцентрат "Біокор-1" рекомендовано використовувати в рідкому або ліофілізованому стані, як закуску для приготування домашнього та промислового лікувально-профілактичного кисломолочного продукту, коктейлів тощо.

Біологічно активну добавку "Біокоректин" (далі біокоректин) виготовляли використовуючи наступну сировину та матеріали: бакконцентрат "Біокор-1", описаний у прикладах 1-3, а також порошок яблук, порошок груш, порошок винограду, порошок цитрусових, порошок ананасів, порошок моркви, порошок буряка, порошок часнику, порошок гарбуза, порошок кавуна, порошок дині, порошок капусти, порошок петрушки, порошок кропу, порошок шпинату, порошок топінамбуру, цукор молочний, вітаміни С, В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, РР, А, D, Е, кальцію стеарат, капсули желатинові тверді.

Приклад 4. Для виготовлення біокоректину брали у розрахунок на 1кг готового продукту:

бакконцентрат "Біокор-1"	120г;
цукор молочний	265г;
стеарат кальцію	15г;
носій (порошок яблук)	600г;

Складові частини композиції змішували до утворення однорідного порошку. Далі одержаний порошок біокоректину після перевірки властивостей відправляли на фасування або для спорядження желатинових капсул, пакування, маркування та зберігання готової продукції.

Біокоректин - високодистерсний порошок, однорідний по всій масі з приємним смаком і запахом, властивими порошку яблук, без сторонніх присмаків та запахів. У 100г біокоректину міститься 0,4г білків, 9,8г вуглеводів енергетична цінність 45ккал. За мікробіологічними показниками біокоректин відповідає таким вимогам: загальна кількість життєздатних мікроорганізмів становить не менше 1-10 КУО/г (відсутність бактерій групи кишкових паличок (колі форми) та патогенних мікроорганізмів в т.ч. бактерій роду Сальмонела, *St. aureus*, *B. cereus*).

Приклади 5-8. Біокоректин виготовляли так, як описано у прикладі 4, за винятком того, що змінювали співвідношення компонентів. Склад одержаного біокоректину наведено у прикладах 5-8 таблиці 10. Органолептичні та мікробіологічні показники були практично такими ж, як і для прикладу 4.

Приклади 9-11. Біокоректин виготовляли так, як описано у прикладі 4, за винятком того, що до складу композиції додатково вводили вітаміни. Склад біокоректину з доданими вітамінами наведено у прикладах 9-11 таблиці 10.

Приклади 12-28. Біокоректин виготовляли так, як описано у прикладі 4, за винятком того, що в якості носія брали порошок, вибраний з наступного ряду: порошок яблук, порошок груш, порошок винограду, порошок цитрусових, порошок ананасів, порошок моркви, порошок буряка, порошок часнику, порошок гарбуза, порошок кавуна, порошок дині, порошок капусти, порошок петрушки, порошок кропу, порошок шпинату, порошок топінамбуру. Указані носії підвищують гістадезійну активність штамів, що входять до складу біокоректину, а також розширюють асортимент органолептичних та лікувальних властивостей біокоректину. У прикладах 12-28 таблиці 11 наведено деякі особливості властивостей біокоректину з різними носіями, що мав такий склад, % мас.:

бакконцентрат "Біокор-1"	12
цукор молочний	26,5
стеарат кальцію	1,5
носій	60

Отже біокоректин є джерелом чистих культур симбіотичних біфідобактерій у кількості  $1 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^{12}$  КУО/г, лактобактерій в кількості  $1 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^{12}$  КУО/г, а також вітамінів, мінеральних речовин природного походження.

Таблиця 10

Кількісний склад біокоректину

№ прикладу	Вміст штамів у бакконцентраті "Біокор-1", КУО/г		Вміст компонентів у біокоректині, % мас.				Додатковий вміст вітамінів у біокоректині, з розрахунку на 1кг продукту							
	Bifidobacterium bifidum 1MB B-7019 i	Lactobacillus acidophilus 1MB B-7021 i	бак концентрат "Біокор-1"	цукор молочний	стеарат кальцію	носії	вітамін С, г	вітамін В <sub>1</sub> , г	вітамін В <sub>6</sub> , г	вітамін В <sub>12</sub> , г	вітамін РР, г	вітамін А, г	вітамін D, г	вітамін Е, г
4	$10^6$	$10^6$	12	26,5	1,5	60								
5	$10^{12}$	$10^9$	10	35	1	54								
6	$10^6$	$10^7$	25	20	2	53								
7	$10^7$	$10^{12}$	20	30	1	49								
8	$10^7$	$10^9$	15	20	2	63								
9	$10^6$	$10^6$	12	26,5	1,5	60	1	80	15	1	20	2	10	5
10	$10^6$	$10^6$	12	26,5	1,5	60	10	50	18	2	15	5	30	10
11	$10^6$	$10^6$	12	26,5	1,5	60	20	15	55	4	10	4	50	7

Таблиця 11

Властивості біокоректину з різними носіями

№ прикл	Носій	Деякі особливості властивостей біокоректину з носієм
12	порошок яблук	містить пектини, органічні кислоти, флавоноїди, вітаміни, органічні сполуки заліза та фосфору, дубильні речовини, катехіни, використовують при дискінезії жовчних шляхів, при спастичному коліті, при авітамінозах
13	порошок груш	містить дубильні, та пектинові речовини, каротин, вітаміни, мінеральні солі, в'язучий засіб
14	порошок винограду	загальнозміцнююча, сечогінна, послаблююча та жовчогінна дія на організм
15	порошок цитрусових	поліпшує травлення при гіпосекреторних гастритах, слабкому жовчовиділенні, схильності до спастичних запорів, проявляє загальнозміцнюючі властивості
16	порошок ананасів	містить білки, вуглеводи, вітаміни, ферменти, у тому числі фермент бромелайн, що має унікальні властивості прискорювати розщеплення жирів в організмі
17	порошок моркви	містить β-каротин та інші каротиноїди, вітаміни, пектинові речовини, макро- та мікроелементи, цінний лікувальний засіб при авітамінозах, як допоміжний засіб при кон'юнктивітах, кератитах тощо
18	порошок буряка	стимулює гемопоез, стимулює шлункову секрецію і перистальтику кишечника, сприяє виведенню холестерину, проявляє протипухлинні властивості, ефективний при спастичних колітах, атеросклерозі, тиреотоксикозі, аритміях, гіпертонічній хворобі, захворюваннях печінки, атонії кишечника
19	порошок часнику	стимулює виділення шлункового соку і жовчі, посилює перистальтику кишків, сприяє розвитку нормальної кишкової флори, розширює кровоносні судини, знижує кров'яний тиск
20	порошок гарбуза	містить цукри, органічні кислоти, вітаміни, мінеральні речовини, проявляє сечогінну, жовчогінну та послаблюючу дію
21	порошок кавуна	містить цукри, органічні кислоти, пектинові речовини, вітаміни, сечогінний та жовчогінний засіб
22	порошок дині	містить пектинові речовини, вітаміни, мінеральні солі, має помірно послаблюючі, сечогінні та жовчогінні властивості
23	порошок капусти	містить білки, цукри, органічні кислоти, мінеральні речовини, вітаміни, у тому числі так званий вітамін U, який дає добрий терапевтичний ефект при виразковій хворобі шлунка та дванадцятипалої кишки, при ентеритах, колітах тощо
24	порошок петрушки	містить флавоноїди, вітаміни, білки, збуджує апетит, поліпшує травлення, пригнічує процеси бродіння у кишечнику, сприяє виділенню молока у матерів-годувальниць
25	порошок кропу	містить флавоноїди, вітаміни, мінеральні речовини, проявляє багатогранний позитивний вплив на організм
26	порошок шпинату	посилює перистальтику кишків, виявляє легку проносну дію, має капіляророзміцнюючі, протисклеротичні та протизапальні властивості, також використовують як засіб, що створює лікувальний фон, і для потенціювання дії лікарських засобів при ряді захворювань
27	порошок топінамбуру	містить вуглеводи у вигляді полімерів (фруктоолігосахаридів), які не розщеплюються у шлунковому соку тому, що там відсутній фермент інгуліназа; у результаті цього фруктоолігосахариди доходять до кишечника, де відбувається

		їх ферментація біфідобактеріями, що інтенсивно при цьому розмножуються і витісняють з кишечника патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми
28	суміш порошків фруктових, овочевих, баштанових та цитрусових культур	застосовують в лікувально-профілактичному і дієтичному харчуванні, має загальнозміцнюючі і адаптогенні властивості, сприяє нормалізації мікрофлори кишечника людини, забезпечує ефективність в лікувально-профілактичному харчуванні при наявності хвороб шлунково-кишкового тракту, що пов'язано з дисбактеріозом; при захворюванні шлунку та дванадцятипалої кишки, печінки, порушеннях обміну речовин; при лікуванні кишкових інфекцій (шігельоз, сальмонельоз, стафілококовий ентероколіт та інші), інфекцій органів уrogenіталій та органів верхніх дихальних шляхів; після радіо опромінювань, перенесення гострих інфекцій, харчових отруєнь, імунодефіцитів, тривалого застосування антибіотиків та хіміотерапевтичних препаратів

Біокоректин має загальнозміцнюючі і адаптогенні властивості, сприяє нормалізації мікрофлори кишечника людини шляхом пригнічення патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів та збільшення кількості молочнокислої мікрофлори. Клінічні дослідження, які були проведені у лікарнях міста Києва, дозволяють рекомендувати біокоректин з високим ефектом у профілактичному та дієтичному харчуванні при:

- застосуванні антибіотиків та хіміотерапевтичних препаратів;
- променевої терапії;
- хворобах шлунково-кишкового тракту, що пов'язані з дисбактеріозом;
- харчових алергозах;
- кишкових інфекцій;
- вторинних імунодефіцитів.

Біокоректин рекомендується вживати по 2-3 капсули дорослим, дітям по 1-2 капсули на добу за 30 хвилин до приймання їжі протягом 1-2 місяців. Спосіб застосування, який запропоновано авторами, пройшов клінічні випробування і не викликає заперечень.

Біологічно активна добавка "Біокоректин" дозволена до використання МОЗ України.