



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 53301

(13) A

(51) 7 C12N1/00, C12P1/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРОБІОТИКУ З АЕРОКОКІВ

1

2

(21) 2002043334

(22) 22 04 2002

(24) 15 01 2003

(46) 15 01 2003, Бюл. № 1, 2003 р.

(72) Кременчуцький Геннадій Миколайович

(73) Кременчуцький Геннадій Миколайович

(57) 1 Спосіб одержання пробіотику з аерококів, що включає вирощування виробничого штаму культури аерококів на живильному середовищі у пробірках з м'ясо-пептоновим агаром при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$, бактеріоскопічний та бактеріологічний контроль чистоти культури, розлив препарату у ємності, наступну ліофілізацію у вакуум-сушильних апаратах і герметизацію, який **відрізняється** тим, що вирощування проводять в декілька етапів, причому на першому етапі вирощують першу генерацію штаму культури аерококів, переважно *Aerococcus viridans* 167, протягом 18 - 48 годин, на другому етапі вирощують наступну маткову генерацію протягом 18 - 48 годин, на третьому етапі маткову культуру засівають в матраці 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 злив мікробної маси в асептичних умовах додаванням водного розчину стабілізатора

2 Спосіб за п 1, який **відрізняється** тим, що в усіх живильних середовищах перед засівом культур аерококів рН доводять до значення 6,8 - 8,0

Вінахід відноситься до мікробіології, а саме, до способу одержання лікувально-профілактичних бактеріальних препаратів з аерококів

Відомий спосіб одержання біопрепарату для лікування і профілактики захворювань слизових оболонок і шкірних покривів (1), що полягає у вирощуванні культури аерококів на живильному середовищі при наступних умовах

Оптимум температурного росту ($36 \pm 1^\circ\text{C}$) На м'ясо-пептоновому бульйоні штам зростає, утворюючи поверхневу зону. Оптимальний ріст аерококів спостерігається через 24 години при ($36 \pm 1^\circ\text{C}$) на м'ясо-пептоновому агарі

Склад середовища для культивування штаму такий

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|------|
| Агар мікробіологічний ГОСТ 1 7206-84 | 22мл |
| Глюкоза ГОСТ 603 8-79 | 40г |
| Пептон сухий ферментативний для бактеріологічного призначення ГОСТ 13805-76 | 10г |
| Вода дистильована ГОСТ 6709-72 | 1л |

Для приготування середовища дистильовану воду змішують з пептоном та агаром. Суміш витримують 20 - 30 хвилин при кімнатній температурі для набухання агару, і кип'ятять 15 - 20 хвилин до його повного розплавлення. Далі 30%-розчином оцтової кислоти встановлюють рН 3,8. Після го-

динного відстоювання середовище декантують через ватно-марлевий фільтр і додають глюкозу, після чого стерилізують при температурі ($110 \pm 1^\circ\text{C}$) на протязі 30 хвилин

На живильному середовищі виростають колонії діаметром 0,5 - 2,0мм у вигляді плоских безбарвних дисків. По закінченні строку інкубації здійснюють злив мікробної маси у асептичних умовах шляхом додавання водного розчину стабілізатора. Мікробну суспензію збирають у бутель і проводять бактеріоскопічний та бактеріологічний контроль чистоти культури

Препарат розливають по 1 або 2 дози в ампули типу ШП-5-НС-1 або ШП-5-НС-3 по Ост 84-2-485-85 або по 25 - 30 доз у пляшки (ОСТ 10782-85) ємністю 250мл, ліофілізують у вакуум-сушильних апаратах і герметизують. Одна доза (1мл) містить не менш $2 \cdot 10^4$ життєздатних аерококів

Основним недоліком прототипу є мала концентрація клітин аерококів у процесі культивування за рахунок вирощування біомаси аерококів на пептоново-глюкозному агарі, який має низьке значення рН = 3,8 живильного середовища

В основу винаходу поставлено задачу створити спосіб одержання пробіотику з аерококів з підвищеним виходом клітин аерококів

Задача винаходу вирішується тим, що у відо-

(13) A

(11) 53301

(19) UA

тому способі одержання пробіотику з аерококів, що включає вирощування виробничого штаму культури аерококів на живильному середовищі у пробірках з м'ясо-пептоновим агаром при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$, бактеріоскопічний та бактеріологічний контроль чистоти культури, розлив препарату у ємності, наступну ліофілізацію у вакуум - сушильних апаратах і герметизацію, згідно винаходу, вирощування проводять в декілька етапів, причому на першому етапі вирощують першу генерацію штаму культури аерококів, переважно, *Aerococcus viridans* 167, на протязі 18 - 48 годин, на другому етапі вирощують наступну маткову генерацію на протязі 18 - 48 годин, на третьому етапі маткова культуру засівають в матраці з казеїновим агаром, який містить 10мг/мл глюкози, 20 - 50мкг/мл грамуруну, 1 - 5мкг/мл етонію, і на протязі 18 - 48 годин вирощують виробничу культуру, а по закінченні строку інкубації здійснюють змив мікробної маси в асептичних умовах додаванням водного розчину стабілізатора. Дослідницьким шляхом було встановлено, що найбільший вихід клітин культур аерококів відбувається тоді, коли в усіх живильних середовищах перед засівом культур аерококів значення рН становить 6,8 - 8,0.

Винахід пояснюється схемою /див. фіг./, на якій зображено етапи одержання пробіотику з аерококів.

На перших 2-х етапах одержується маткова культура.

На першому етапі вирощується перша генерація *Aerococcus viridans* 167 в пробірках з м'ясо-пептоновим агаром при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на протязі 18 - 48 годин.

На другому етапі з неї вирощується маткова генерація штаму культури аерококів, переважно, *Aerococcus viridans* 167, в пробірках з м'ясо-пептоновим агаром при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на протязі 18 - 48 годин.

На третьому етапі маткова культура засівається в матраці з казеїновим агаром, який містить 10мг/мл глюкози, 20 - 50мкг/мл грамуруну, 1 - 5мкг/мл етонію, і вирощується при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на протязі 18 - 48 годин. По закінченні строку інкубації здійснюють змив мікробної маси в асептичних умовах шляхом додавання водного розчину стабілізатора. Мікробну суспензію збирають у бутель і проводять бактеріоскопічний та бактеріологічний контроль чистоти культури.

Препарат розливають по 1 або 2 дози в ампули типу ШП-5-НС-1 або ШП-5-НС-3 по Ост 64-2-485-85 або по 25 - 30 доз у пляшки (ОСТ 10782-85) ємністю 250мл, ліофілізують у вакуум-сушильних апаратах і герметизують. Одна доза (1мл) містить не менш $2 \cdot 10^8$ життєздатних аерококів. А-бактерін являє собою висушені ліофільно живі вегетативні клітини бактерій, стабілізатор - желатин і сахарозу, сухі компоненти живильного середовища і біологічно активні речовини, що продукуються штамом, - антиоксидантні ферменти, амінокислоти, лізоцим, антибіотики, екзополісахариди, лектатооксидазу.

Препарат розчинюється протягом двох хвилин при періодичному потрушуванні пляшки або ампули після додавання розчинника (кип'ячена або дистильована вода, 0,9%-розчин хлориду натрію).

із розрахунку 1мл розчинника на одну ампулу препарату, 5мл розчинника на одну пляшку ємністю 10мл, 50мл розчинника на одну пляшку ємністю 50мл. При розчиненні утворюється непрозора гомогенна суспензія, після чого визначається концентрація клітин у 1мл суспензії.

В найкращому варіанті здійснення в усіх живильних середовищах перед засівом культур штамів рН доводять до 6,8 - 8,0.

Приклад 1

На першому етапі вирощували першу генерацію *Aerococcus viridans* 167 в пробірках з м'ясо-пептоновим агаром при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$ на протязі 18 годин.

На другому етапі вирощували маткову генерацію *Aerococcus viridans* 167 в пробірках з м'ясо-пептоновим агаром при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$ на протязі 30 годин.

На третьому етапі маткову культуру 2-ї генерації *Aerococcus viridans* 167 засівали в матраці з казеїновим агаром, який містив 10мг/мл глюкози, 20 - 50мкг/мл грамуруну, 1 - 5мкг/мл етонію, і вирощували при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$ на протязі 30 годин.

Значення рН в усіх середовищах перед засівом *Aerococcus viridans* 167 доводили до 6,8.

По закінченні строку інкубації змивали мікробну масу в асептичних умовах шляхом додавання водного розчину стабілізатора.

Мікробну суспензію збирали у бутель і проводили бактеріоскопічний та бактеріологічний контроль чистоти культури.

Препарат розливали по 1 або 2 дози в ампули типу ШП-5-НС-1, ліофілізували у вакуум - сушильних апаратах і герметизували.

Приклад 2

На першому етапі вирощували першу генерацію *Aerococcus viridans* 167 в пробірках з м'ясо-пептоновим агаром при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на протязі 24 годин.

На другому етапі вирощували маткову генерацію *Aerococcus viridans* 167 в пробірках з м'ясо-пептоновим агаром при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на протязі 24 годин.

На третьому етапі маткову культуру 2-ї генерації *Aerococcus viridans* 167 засівали в матраці з казеїновим агаром, який містив 10мг/мл глюкози, 20 - 50мкг/мл грамуруну, 1 - 5мкг/мл етонію і вирощували при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на протязі 24 годин.

Значення рН в усіх середовищах перед засівом *Aerococcus viridans* 167 становило 7,4. По закінченні строку інкубації здійснювали змив мікробної маси в асептичних умовах шляхом додавання водного розчину стабілізатора. Мікробну суспензію збирали у бутель і проводили бактеріоскопічний та бактеріологічний контроль чистоти культури.

Препарат розливали по 5 - 30 доз у пляшки (ОСТ 10782-85) ємністю 10 - 250мл, ліофілізували у вакуум-сушильних апаратах і герметизували.

Приклад 3

На першому етапі вирощували першу генерацію *Aerococcus viridans* 167 в пробірках з м'ясо-пептоновим агаром при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на протязі 48 годин.

На другому етапі вирощували маткову генерацію *Aerococcus viridans* 167 в пробірках з м'ясо-

пептоновим агаром при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на протязі 48 годин

На третьому етапі маткову культуру 2-ї генерації *Aerococcus viridans* 167 засівали в матраці з казеїновим агаром, який містив 10мг/мл глюкози, 20 - 50мкг/мл грамурину, 1 - 5мкг/мл етонію, і вирощували при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на протязі 48 годин

Значення рН в усіх середовищах перед засівом *Aerococcus viridans* 167 становило 8,0. По закінченні строку інкубації здійснювали змив мікробної маси в асептичних умовах шляхом додавання водного розчину стабілізатора. Мікробну суспензію збирали у бутель і проводили бактеріоскопічний та бактеріологічний контроль чистоти культури

Препарат розливали по 1 або 2 дози в ампули ШП-5-НС-3 по Ост 64-2-485-85, ліофілізували у вакуум-сушильних апаратах і герметизували

Кожна доза (1мл) отриманого препарату /незалежно від прикладу здійснення/ містить не менш $2 \cdot 10^8$ життєздатних аерококів. А-бактерін являє собою висушені ліофільно живі вегетативні клітини бактерій, стабілізатор - желатин і сахарозу, сухі компоненти живильного середовища і біологічно активні речовини, що продукуються штамом, - антиоксидантні ферменти, амінокислоти, лізоцим, антибіотики, екзополісахариди, лектатооксидазу

Препарат розчинюється протягом двох хвилин при періодичному потрушуванні пляшки або ампули після додавання розчинника (кип'ячена або дистильована вода, 0,9%-розчин хлориду натрію) із розрахунку 1мл розчинника на одну ампулу пре-

парату, 5мл розчинника на одну пляшку ємністю 10мл, 50мл розчинника на одну пляшку ємністю 50мл. При розчиненні утворюється непрозора гомогенна суспензія, після чого визначається концентрація клітин в 1мл суспензії

У таблиці наведено дані о накопиченні клітин *Aerococcus viridans* 167 при різних значеннях рН живильних середовищ в 1мл суспензії А-бактерину

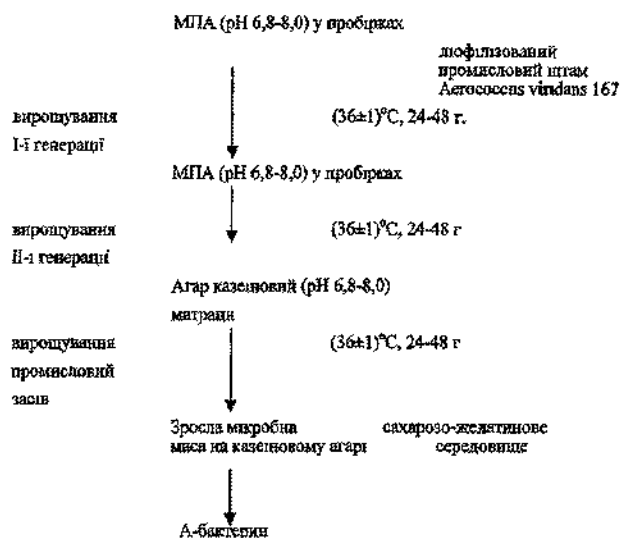
Таблиця

Накопичення клітин *Aerococcus viridans* 167 при різних значеннях рН середовища в 1мл суспензії А-бактерину

| Назва штаму | Кількість клітин <i>Aerococcus viridans</i> 167 на 1мл суспензії А-бактерину при різних значеннях рН середовища | | | |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------|------------------|
| | 3,8 | 6,8 | 7,4 | 8,0 |
| <i>Aerococcus viridans</i> 167 | $2 \cdot 10^4$ | $2 \cdot 10^8$ | $3,2 \cdot 10^8$ | $2,2 \cdot 10^8$ |

Джерела інформації

1. Біопрепарат для лікування і профілактики захворювань слизових оболонок і шкірних покривів №98126882 від 15.12.2000р. Надруковано "Промислова власність. Офіційний бюлетень" №7, 2000р.



Фіг.