

Винахід відноситься до біотехнології і може бути використаний у виробництві бактеріальних препаратів із пробіотичними властивостями.

Останніми роками значно підвищився інтерес до пробіотичних властивостей грибкових культур, що представляють собою природні міцні симбіози фізіологічно корисних мікроорганізмів. Серед грибкових культур особливе місце приділяється кефірному грибку, який протягом багатьох років широко використовується у виробництві кисломолочних продуктів.

Відомо спосіб одержання кефірної грибової культури, що передбачає звільнення строми кефірного грибка від поверхневої мікрофлори багаторазовим промиванням дріжджовим культуральним середовищем з наступним культивуванням промитої строми в молоці, ферментованому симбіозом молочнокислих та оцтовокислих бактерій з додаванням в окремих випадках пропіоновокислих бактерій (Авт.свід. СРСР №1821963, А23С9/127, 1990).

Недоліком способу є висока концентрація в препараті живих клітин дріжджів, що можуть сприяти розвитку мікозів у дітей і осіб, що страждають імунною недостатністю.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання препарату молочнокислих культур, що передбачає сквашування знежиреного молока, що містить 16-18% сухих речовин і 0,6-0,8% лимоннокислого натрію, консорціумом молочнокислих культур виду *Lactobacillus acidophilus* з наступним збагаченням препарату біомасою кефірних грибків, протітою при температурі 74-82°C протягом 15-20 хвилин, яку вносять у кількості 100-200мл в 1 літр біомаси (Патент Російської Федерації №2001580, А23С9/12, С12Н1/20, 1993).

Введення до складу бактеріального препарату мікробних полісахаридів, що містяться в кефірному грибку, сприяє підвищенню біологічної активності бактеріального препарату, однак, використання в його складі тільки одного виду фізіологічної мікрофлори обмежує пробіотичну ефективність. У препараті міститься невисока концентрація клітин молочнокислих бактерій, що також негативно позначається на його лікувально-профілактичних властивостях. Крім того, прогрівання біомаси кефірного грибка при високій температурі приводить до інактивації фізіологічно корисних метаболітів грибової мікрофлори, зокрема вітамінів і ферментів.

Завданням винаходу є створення способу одержання бактеріального препарату з пробіотичними властивостями, в якому шляхом використання як бактеріальної основи мультиштамового пробіотичного симбіозу, що містить лактобацили, лактококи, стрептококи, біфідобактерії і пропіоновокислі бактерії, а як середовище культивування містить автолізат суміші кефірних грибків, «чайного» гриба та пивних дріжджів, забезпечується збільшення концентрації пробіотичних клітин і мікробних полісахаридів, а також підвищення біологічної активності препарату.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі одержання бактеріального препарату з пробіотичними властивостями, що передбачає приготування накопичувального поживного середовища, заквашування культурою, що містить молочнокислі бактерії виду *Lactobacillus acidophilus*, сквашування і введення до складу препарату біомаси кефірних грибків, відповідно до винаходу біомасу кефірних грибків попередньо змішують з біомасою «чайного» гриба і пивних дріжджів, отриману суміш піддають автолізу, після чого використовують як накопичувальне поживне середовище, а до складу закваскової культури додатково вводять лактобацили видів *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* і *L. fermentum*, а також лактококи, стрептококи, пропіоновокислі та біфідобактерії. При цьому автоліз грибової біомаси проводять при температурі 40-43°C протягом 3-4 діб, а в складі бактеріального препарату з лактококів використовують штами виду *Lactococcus lactis*, зі стрептококів - *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, з біфідобактерій - *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. brevis*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, з пропіоновокислих бактерій - *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*.

Пропонований спосіб передбачає використання як поживне накопичувальне середовище автолізата суміші кефірних грибків, строми «чайного» гриба і біомаси пивних дріжджів. Оскільки спектр і кількість біологічно активних речовин, що містяться в кефірних грибах, «чайному» грибі і пивних дріжджах різні, їхня концентрація в суміші значно підвищується. Автолізована змішана грибова біомаса містить високу концентрацію бактеріальних полісахаридів, протеїнів, глікопептидів, низькомолекулярних фрагментів білка, вільних амінокислот, вітамінів, компонентів клітинних стінок, мінеральних та інших речовин. Ці компоненти є могутнім стимулятором пробіотичної мікрофлори, а також значно розширюють спектр біотерапевтичних активностей самого мультипробіотичного препарату. Режими автолізу, що використовуються, забезпечують повну інактивацію клітин дріжджів при збереженні близько 10% фізіологічно корисних живих клітин лактобацил та оцтовокислих бактерій, що сприяють більш активному накопиченню клітинної біомаси при одержанні бактеріального препарату.

Крім того, спосіб передбачає введення до складу бактеріального препарату додаткових видів лактобацил, а також лактококів, стрептококів, пропіоновокислих та біфідобактерій у вигляді міцного симбіозу, що дозволяє розширити спектр пробіотичних активностей препарату.

У таблиці 1 приведені окремі властивості бактеріального препарату, одержаного шляхом культивування багатощтамового симбіозу в накопичувальному поживному середовищі, що одержаний запропонованим і відомим способами. Як впливає з даних таблиці, розроблена біотехнологія дозволяє збільшити на порядок і більш концентрацію живих клітин пробіотичних мікроорганізмів, вміст у препараті мікробних полісахаридів і вітамінів.

Автоліз грибкових культур проводять при температурі 40-43°C протягом 3-4 діб. Даний режим є найбільш оптимальним. При зниженні температури нижче 40°C автоліз сповільнюється і відбувається руйнування біологічно активних компонентів грибкових культур. Підвищення температури понад 43°C приводить до деградації полісахаридів та інактивації ферментів, що беруть участь у процесі автолізу.

Спосіб здійснюють таким чином.

Строми кефірних грибків і «чайного» гриба, звільнені в асептичних умовах від середовища культивування, подрібнюють і змішують у рівних співвідношеннях. Потім до приготовленої суміші додають біомасу пивних дріжджів з розрахунку одержання в готовій суміші 10^7 - 10^8 КУО/г клітин пивних дріжджів. Отриманий у такий спосіб грибовий субстрат витримують при температурі 40-43°C протягом 3-4 діб до повного автолізу клітин дріжджів. Готовий автолізат інокують 3-5% симбіозу лактобацил, лактококів, стрептококів, пропіоновокислих та біфідобактерій і культивують при температурі 34-37°C протягом 10-12 годин.

Винахід пояснюється прикладами.

Приклад 1. Кефірні грибки та «чайний» гриб в асептичних умовах звільняють від культурального середовища, подрібнюють і змішують у співвідношенні 1:1. Пивні дріжджі нарощують на молочній сироватці, що містить 5% сахарози, протягом 24 год. при температурі 25°C, до концентрації клітин у середовищі $5,0 \times 10^8$ КУО/мл. Попередньо отриману суміш подрібнених грибкових тіл змішують у співвідношенні 1:2 з культурою пивних дріжджів.

Приготовлену суміш витримують при температурі 40°C протягом 4 діб для повного автолізу дріжджових клітин. У приготовлений грибовий автолізат вносять 3% інокуляту, що містить культури лактобацил, лактококів, стрептококів, пропіоновокислих і біфідобактерій. Для одержання інокулята в 3л стерильного знежиреного молока вносять наступні кількості культур штамів, %:

<i>L. acidophilus</i> ВКПМ У-5 863	0,1
<i>L. casei</i> ВКПМ У-3960	0,3
<i>L. plantarum</i> ВКПМ У-5494	0,2
<i>L. fermentum</i> ВКПМ У-5798	0,4
<i>L. lactis</i> ВКПМ У-5387	0,2
<i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> ВКПМ У-2405	0,2
<i>B. bifidum</i> ВКПМ У-5797	0,2
<i>B. longum</i> ВКПМ У-4557	0,4
<i>B. breve</i> в/в 21	0,3
<i>B. infantis</i> bin-47	0,3
<i>B. adolescentis</i> ba-18	0,1
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shemami</i> ВКПМ У-4545	0,3

Інокульоване молоко ретельно перемішують і витримують при температурі 34°C протягом 12 год. Приготовлений інокулят вносять у 100л грибового автолізата. У суміші встановлюють рН 7,4 за допомогою 20%-го стерильного розчину гідроокису натрію. Культивування проводять при температурі 34°C протягом 12 годин з підтримкою рН накопичувального середовища на рівні 7,0.

У готовому препараті міститься $5,5 \times 10^{10}$ /г живих клітин біфідобактерій, $1,2 \times 10^{10}$ /г - лактобацил, $2,0 \times 10^9$ /г - лактококів, $1,2 \times 10^9$ /г - стрептококів, $1,1 \times 10^{11}$ /г - пропіоновокислих бактерій, 3,51 % мікробних полісахаридів. Препарат має високу адгезивну та вітаміносинтезуючу здатність, активно пригнічує ріст широкого спектра патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів (табл.1).

Приклад 2. Кефірні грибки та «чайний» гриб в асептичних умовах звільняють від культурального середовища, подрібнюють і змішують у співвідношенні 1:1. Пивні дріжджі нарощують на молочній сироватці, що містить 5% сахарози, протягом 48 год. при температурі 27°C, до концентрації клітин у середовищі $7,4 \times 10^8$ КУО/мл. Попередньо отриману суміш подрібнених грибових тіл змішують у співвідношенні 1:1 з культурою пивних дріжджів. Приготовлену суміш витримують при температурі 43°C протягом 3 діб до повного автолізу дріжджових клітин. У приготовлений грибовий автолізат вносять 5% інокулята, що містить культури лактобацил, лактококів, стрептококів, пропіоновокислих та біфідобактерій. Для одержання інокулята від стерильного знежиреного молока вносять наступні кількості культур штамів, %:

<i>L. acidophilus</i> ВКПМ У-5254	0,1
<i>L. acidophilus</i> ВКПМ У-5863	0,1
<i>L. casei</i> ВКПМ У-4542	0,3
<i>L. plantarum</i> ВКПМ У-6496	0,2
<i>L. fermentum</i> ВКПМ У-5798	0,4
<i>L. lactis</i> ВКПМ У-4305	0,2
<i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> ВКПМ У-3386	0,2
<i>B. bifidum</i> ВКПМ У-5799	0,2
<i>B. longum</i> ВКПМ У-4635	0,4
<i>B. breve</i> в/в 34	0,3
<i>B. infantis</i> 18bin	0,3
<i>B. adolescentis</i> ba-18	0,1
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shemami</i> ВКПМ У-4544	0,3

Інокульоване молоко ретельно перемішують і витримують при температурі 36°C протягом 10 год. Приготовлений інокулят вносять у 20л грибового автолізата. У суміші встановлюють рН 7,2 за допомогою 20%-го стерильного розчину гідроокису натрію. Культивування проводять при температурі 34°C протягом 10 годин з підтримкою рН накопичувального середовища на рівні 6,8.

Готовий бакпрепарат містить в одному грамі $3,7 \times 10^{10}$ активних клітин біфідобактерій, $1,0 \times 10^{10}$ - лактобацил, $1,8 \times 10^9$ - лактококів, $1,1 \times 10^9$ - стрептококів, $1,3 \times 10^{11}$ - пропіоновокислих бактерій, 3,47 % мікробних полісахаридів. Препарат має високу адгезивну, вітаміносинтезуючу та антагоністичну активність (табл.).

Використання пропонованого способу дозволяє одержувати бактеріальні препарати з підвищеними пробіотичними активностями, обумовленими значним збільшенням концентрації живих клітин фізіологічно активної мікрофлори і її метаболітів, зокрема полісахаридів, вітамінів, антимікробних компонентів.

Таблиця 1

Властивості бактеріального препарату, одержаного з використанням накопичувального середовища, приготовленого на основі автолізата грибових культур і на основі молока.

Показники	Бакпрепарат на основі автолізата грибових культур (приклад 1,2)	Бакпрепарат на основі молока з вмістом 16-18% сухих речовин і 0,6-0,8 % цитрату натрію (за прототипом)
Концентрація клітин, ІгКЮ/г:		
<i>Bifidobacterium</i>	9,6±0,32	8,5±0,46
<i>Lactobacillus</i>	9,2±0,41	8,2±0,33

Lactococcus	8,9±0,28	8,0±0,19
Streptococcus	8,4±0,30	7,8±0,18
Propionibacterium	10,1±0,50	9,1±0,36
Концентрація полісахаридів, %	3,35±0,24	2,07±0,87
Концентрація вітамінів, мкг/кг:		
B ₁	1050±48,8	810±35,6
B ₂	1240±32,6	784±29,9
B ₁₂	1110±39,4	859±47,0
Термін зберігання без зміни властивостей, міс.	3,5±0,5	2,5±0,5
Індекс адгезивності, %	7,8±0,33	5,4±0,21
Антагоністична активність (зона інгібування росту тест-культур), мм:		
E. coli 0111	8,0±0,2	5,5±0,5
S. aureus 209	9,2±0,3	6,1±0,2
P. mirabilis 403	6,6±0,1	4,8±0,4
P. vulgaris 52	7,0±0,3	4,4±0,3
K. pneumoniae 5055	6,5±0,2	5,0±0,3
C. albicans 1b	6,6±0,3	4,7±0,1
S. sonnei 115	5,9±0,1	4,1±0,4
P. aeruginosa 9027	6,7±0,2	3,9±0,2
E. cloacae 16	7,4±0,3	4,7±0,5
C. freundii 22 fr	6,9±0,4	4,5±0,2
S. typhimurium 7st	8,0±0,3	5,0±0,1