

Винахід відноситься до біотехнології і може бути використаний у виробництві пробіотиків, збагачених рослинними добавками.

Відомий спосіб одержання засобу для лікування діареї, що передбачає змішування в стерильній ємності 5%-ної закваски лактобактерина і харчового желатину з продуктами рослинного походження, такими як сік плодів граната, сік чорноплідної горобини та відвар шкурок плодів граната (патент Російської Федерації №2070051, А61К35/78, А23Л1/308, 1996).

Недоліком способу є низька концентрація в препараті живих клітин пробіотичної мікрофлори, обмеженої одним видом лактобацил, і невеликий термін зберігання.

Відомо також засіб для стимуляції моторно-евакуаторної функції кишечника в дітей, що містить лактобактерин, лізоцим, екстракт цикорію і сироп шипшини (патент Російської Федерації №2070050, А61К35/78, 35/66, 38/43, 1996).

Недоліком даного засобу є вузький спектр лікувальної дії, що обумовлено обмеженням складу тільки одним видом лактобацил і низькою концентрацією живих бактеріальних клітин.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання активованих форм пробіотика, що передбачає культивування "Лактобактерина сухого" на фітоосновах, що містять відвари лікарських рослин, сахарозу або глюкозу і цистин (Лисенко Г.І., Білко І.П., Нікольська О.І., Теслюк Л.В. Діагностика та лікування дисбактеріозу кишечника в ревматологічних хворих: Методичні рекомендації. - К., 1999. - 22с.).

Недоліком відомого способу є невисока концентрація живих клітин пробіотичних мікроорганізмів, одновидовий бактеріальний склад, недостатня антагоністична активність, зокрема стосовно грибів роду *Candida*, і низький термін зберігання.

Завданням винаходу є створення способу одержання пробіотика, в якому шляхом введення до складу препарату додаткових штамів пробіотичних мікроорганізмів і збагачення відварів лікарських рослин зародками пшениці, забезпечується підвищення антагоністичної активності пробіотика, концентрації живих клітин пробіотичної мікрофлори і збільшення його терміну зберігання. При цьому з пробіотичних мікроорганізмів використовують бактерії родів: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, а також оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter acetii*, а зародки пшениці вводяться у відвари лікарських рослин у кількості 5-10%.

Поставлене завдання вирішується шляхом добору штамів лактобацил, біфідобактерій і пропіоновокислих бактерій з високою пробіотичною активністю, здатних довгостроково зберігати життєздатність і біологічні властивості у відварах лікарських рослин, а також введення до складу фітооснови зародків пшениці.

Пропонований спосіб передбачає введення до складу пробіотика додаткових штамів роду *Lactobacillus*, а також бактерій родів: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* і *Acetobacter*. Розширення видового складу препарату сприяє підвищенню його біологічної активності і збільшенню спектра фізіологічне корисних властивостей. При цьому з лактококів і стрептококів до складу пробіотика відбирають штами, що активно розмножуються у відварах лікарських рослин з утворенням популяцій клітин чисельністю не менш $5,0 \times 10^9$ КУО/мл, що мають високу полісахаридсинтезуючу, адгезивну і антагоністичну здатність. З лактобацил використовують штами, що накопичують у відварах лікарських рослин не менш $1,5 \times 10^9$ життєздатних клітин і, крім того, вони мають полісахаридсинтезуючу, адгезивну здатність й антагонізм відносно патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. З біфідобактерій відбирають штами, що утворюють при розвитку у фітовідварах клітинні популяції чисельністю не менш $1,0 \times 10^9$ КУО/мл, здатні адгезувати на епітеліальних клітинах людини і пригнічувати ріст патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, у тому числі грибів. Використовувані в складі пробіотика пропіоновокислі бактерії відбираються за врожайністю клітин у фітовідварах (не менш $3,0 \times 10^9$ КУО/мл), здатністю синтезувати вітаміни і полісахариди, адгезувати на епітеліальних тканинах людини, пригнічувати ріст патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, у тому числі грибів, активізувати розвиток біфідобактерій, лактобацил, лактококів і стрептококів.

Спеціально проведені дослідження установили, що в багатовидовому симбіозі відібраних штамів значно підсилюються їхні пробіотичні активності і врожайність клітин у відварах лікарських рослин. Ця особливість ще яскравіше виявляється в присутності оцтовокислих бактерій, які використовуються у складі пробіотика.

До складу пробіотика вводять 5-10% зародків пшениці. Це дозволяє збагатити пробіотик незамінними амінокислотами, поліненасиченими жирними кислотами, антиоксидантами. Крім того, додавання зародків пшениці у відвари лікарських рослин у 10-50 разів збільшує врожайність клітин пробіотичної мікрофлори.

Концентрація зародків пшениці 5-10% є найбільш оптимальною. Зменшення концентрації нижче 5% приводить до збідніння пробіотика фізіологічно корисними компонентами і зниження концентрації активних бактеріальних клітин. Збільшення концентрації зародків пшениці вище 10% недоцільно, оскільки не приводить до подальшого збільшення концентрації клітин.

Спосіб здійснюють таким чином.

Зародки пшениці змішують з відварами лікарських рослин з розрахунку одержання в суміші лікувальної концентрації фітоекстракту і 5-10% зародків пшениці, суміш витримують протягом 1-2 годин при кімнатній температурі, потім стерилізують при температурі 121°C протягом 10-15 хвилин і охолоджують до температури $37-40^\circ\text{C}$. У підготовлене середовище вносять 3-5% симбіозу пробіотичних бактерій і витримують при температурі $35-37^\circ\text{C}$ протягом 10-14 годин. Готовий пробіотик має густу, в'язку консистенцію, кисло-молочний смак із присмаком використаної лікарської рослини, містить $(1,5-3,0) \times 10^{11}$ біологічно активних клітин пробіотичної мікрофлори.

Винахід пояснюється прикладами.

Приклад 1. Одержання пробіотика з використанням відвару ромашки аптечної.

Готують 2%-й відвар ромашки у воді, настоюють 2 години і фільтрують. У 100л отриманого фітоекстракту додають 5кг сухих зародків пшениці, перемішують, витримують 1 годину при кімнатній температурі, стерилізують при температурі 121°C протягом 10 хвилин і охолоджують до температури 37°C . У підготовлене фітосередовище вносять 3% інокулята симбіозу пробіотичної мікрофлори.

Для одержання симбіозу в стерильне знежирене молоко вносять культури наступних штамів у кількостях, %:

<i>Lactobacillus acidophilus</i> ВКПМ В-2846	0,1
<i>Lactobacillus casei</i> ВКПМ В-5724	0,1
<i>Lactobacillus plantarum</i> ВКПМ В-6496	0,1
<i>Lactobacillus helveticus</i> ВКПМ В-3967	0,1
<i>Lactobacillus fermentum</i> ВКПМ В-5798	0,3
<i>Lactobacillus brevis</i> ВКМ 1309	0,2
<i>Lactobacillus delbmeckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	
ВКПМВ-3964	0,1
<i>Lactococcus lactis</i> ВКПМ В-3961	0,1
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	
ВКПМ В-2406	0,1
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	
ВКПМ В-5388	0,1
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ВКПМ В-5798	0,2
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ВКПМ В-5799	0,1
<i>Bifidobacterium longum</i> ВКПМ В-4557	0,3
<i>Bifidobacterium breve</i> в/в-34	0,2
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 146/ав	0,1
<i>Bifidobacterium infantis</i> 14/56	0,2
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> ВКПМ В-4545	0,3
<i>Propionibacterium acidipropionici</i> ВКПМ В-5800	0,2
<i>Acetobacter aceti</i> ВКПМ В-2021	0,1

Інокульоване молоко витримують при температурі 36°C протягом 16 годин. Потім роблять ще три пересівання в стерильне знежирене молоко з періодичністю 2 доби. Для приготування інокулята в 3л фітосередовища вносять 100мл багатоштамового пробіотичного симбіозу. Суміш витримують 15 годин при температурі 37°C, після чого додають в основну масу фітосередовища. Культивування проводять при температурі 37°C протягом 14 годин. У готовому пробіотику міститься $2,7 \times 10^{11}$ живих клітин пробіотичної мікрофлори. Характеристика препарату приведена в таблиці.

Приклад 2. Одержання пробіотика з використанням відвару листа подорожника.

Готують 1%-й відвар листа подорожника, настоюють 3 години і фільтрують. 50л отриманого водного екстракту змішують з 5кг сухих зародків пшениці, суміш витримують 2 години при кімнатній температурі і стерилізують при температурі 121°C протягом 15 хвилин. У стерильне фітосередовище, охолоджене до температури 35°C вносять 2,5л інокулята, приготовленого на основі симбіозу пробіотичної мікрофлори, що одержують відповідно до прикладу 1. Інокульовану суміш витримують при температурі 35°C протягом 12 годин. У готовому пробіотику міститься $1,9 \times 10^{11}$ живих клітин пробіотичної мікрофлори. Характеристика препарату приведена в таблиці.

Приклад 3. Одержання пробіотика з використанням відвару жовчогінного збору.

Готують 2%-й відвар жовчогінного збору, настоюють 2 години і фільтрують. 10л отриманого відвару змішують з 700г сухих зародків пшениці, суміш витримують 1,5 годин при кімнатній температурі і стерилізують при температурі 121°C протягом 12 хвилин. В охолоджене до температури 36°C середовище вносять 400 мл інокулята, отриманого відповідно до прикладу 1. Інокульоване фітосередовище витримують при температурі 36°C протягом 10 годин. У готовому пробіотику міститься $2,3 \times 10^{11}$ живих клітин пробіотичної мікрофлори. Характеристика препарату приведена в таблиці.

Пропонований спосіб дозволяє одержати пробіотик, що має високу біологічну активність за рахунок уведення до складу препарату широкого видового спектра пробіотичних бактерій, забезпечення високої концентрації клітин фізіологічно активної мікрофлори і раціонального доповнення пробіотичних властивостей цілющих мікроорганізмів лікувально-пробіотичними властивостями лікарських рослин і зародків пшениці.

Таблиця

Характеристика пробіотиків, отриманих пропонуванням і відомим способами

Показники	Прототип	Приклад 1	Приклад 2	Приклад 3
1	2	3	4	5
Концентрація живих бактеріальних клітин, КУО/г	$1,5 \times 10^7$ - $1,0 \times 10^9$	$2,7 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^{11}$
Антагоністична активність (зона пригнічення росту тест-культур), мм				
<i>S. aureus</i> 209	0-3,3	8,9	7,1	11,6
<i>P. mirabilis</i> 403	2,5-3,4	7,7	11,0	10,4
<i>P. vulgaris</i> 52	0-1,8	7,8	8,6	6,6
<i>K. pneumonia</i> 5055	0-2,6	8,5	5,7	7,9
<i>C. albicans</i> 1b	0	9,6	11,3	10,1
<i>C. tropicalis</i> ct-37	0	10,2	9,1	11,2
<i>S. sonnei</i> 115	0-2,7	5,5	8,6	11,5

E.coli 0111	2,2-3,8	9,0	9,2	8,6
P. aeruginosa 9027	3,0-5,7	5,7	10,5	9,3
E. cloaceae 16	0-2,2	9,4	8,8	10,0
C. freundii 22fr	0-3,0	11,3	9,6	10,9
Y. enterocolitica 16	0	6,9	9,0	8,6
S. typhimurium 7st	0	7,5	10,1	11,3
Синтез кислот, %:				
молочна	1,2-1,8	1,5	1,7	1,6
оцтова	0	1,8	2,0	2,1
пропіонова	0	0,9	1,0	1,2
Індекс адгезивності	1,6-3,4	8,0	7,9	8,5
Концентрація бактеріальних полісахаридів, %	0	2,2	2,6	2,5
Термін зберігання при температурі 4-6°C, діб	2-5	60	60	60
Синтез вітамінів, мкг/кг:				
B ₁	0-50	480	510	770
B ₂	0	1670	1640	1360
B ₁₂	0	960	930	900