

Винахід відноситься до біотехнології і може застосовуватися для одержання бактеріального препарату і продуктів з його використанням, які призначаються для профілактики шлунково-кишкових інфекцій молодняка великої рогатої худоби.

Відомо спосіб приготування бактеріального концентрату "Лактоцидін" для виробництва кормового продукту "Ацидокорм", який передбачає культивування ацидофільної палички, відібраної за антагоністичною активністю щодо збудників кишкових інфекцій молодняка сільськогосподарських тварин (ТУ 10.16 УССР 4 - 86). Однак до складу мікрофлори цього бактеріального концентрату залучено тільки один вид мікроорганізмів *Lactobacillus acidophilus*, що обмежує лікувально-профілактичні властивості концентрату.

Відомо також спосіб приготування пропіоновоацидофільної бульйонної культури (ПАБК) для профілактики шлунково-кишкових інфекцій молодняка сільськогосподарських тварин (ТУ 46 - 794 - 72).

Недоліком цієї культури є низька концентрація бактеріальних клітин - в межах десятків-сотень мільйонів в 1 мл. Даний спосіб також не передбачає відбір культур за антагоністичною активністю щодо збудників шлунково-кишкових захворювань молодняка тварин, хоча встановлено, що серед ацидофільних бактерій поряд з високоактивними штамми є штами, яким не властива висока антагоністична активність. Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання сухого бактеріального препарату біфідобактерій і молочнокислих бактерій "Біфілакт А", який використовується для виробництва лікувально-профілактичних кормових засобів (ТУ 491016 - 85). Згідно з цим способом в живильне середовище, яке готується на основі ферментного гідролізату знежиреного молока і яке містить стимулятори росту, вносять інокулат культури біфідобактерій та ацидофільної палички. Накопичення бактеріальної маси здійснюють при температурі 36 - 38°C протягом 14 - 16 годин. Потім біомасу відокремлюють від культуральної рідини, змішують з захисним середовищем, заморожують і висушують. Спосіб дозволяє одержати бакконцентрат, який містить в 1 г $1 \cdot 10^9$ життєздатних клітин біфідобактерій і $5 \cdot 10^7$ ацидофільних паличок.

Недоліком відомого способу є низький вміст клітин мікроорганізмів в 1 г концентрату, крім того, спосіб не передбачає відбору штамів за властивостями, що забезпечують біологічну активність препарату в цілому.

Основним завданням винаходу, що пропонується, є розробка способу одержання бактеріального концентрату, в якому шляхом зміни технологічних параметрів та складу мікрофлори забезпечується підвищення концентрації клітин бактерій та біологічної активності концентрату, завдяки чому кінцевий продукт має лікувально-профілактичні властивості.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі, який заявляється, при одержанні бактеріального концентрату передбачається цілеспрямований відбір мікроорганізмів за їх біологічною активністю, складання ефективної композиції з числа найбільш активних штамів і удосконалення технології накопичення біомаси.

Особливістю запропонованого способу є використання як посівний матеріал трьох різних видів мікроорганізмів, які відповідають нормальній мікрофлорі кишечника великої рогатої худоби, а саме біфідобактерій, пропіоновокислих і молочнокислих бактерій. При цьому з біфідобактерій використано штам *B. animalis* 135, з пропіоновокислих - *P. freudenreichii* ssp. *schermanii* H-110, а з лактобактерій - *L. acidophilus* 38 и 20у. Ці мікроорганізми відібрані за величиною антагоністичної активності щодо збудників кишкових інфекцій молодняка великої рогатої худоби, адгезивної і вітамінсинтезуючої здатності. Відбір найбільш активних штамів за вищевказаними критеріями зумовлює підвищення біологічної активності бактеріального концентрату.

Основні фізіолого-біохімічні властивості штамів, що використовуються для приготування бакконцентрату Біфідін, наведено в табл.1.

Відібрані штами відрізняються один від одного за своїми температурними оптимумами і активністю. Вони стійкі до високих концентрацій жовчі, фенолу і хлориду натрію. Штами пропіоновокислих і біфідобактерій характеризуються досить високими індексами адгезивності - 2,7 і 2,8 відповідно. Комплекс цих властивостей забезпечує колонізацію кишківника і проживлення в ньому. Крім того, штам *P. schermanii* H-110 має здатність до синтезу вітаміну B₁₂, який є життєво важливим для тварини.

Всі штами активно затримують розвиток патогенних серотипів кишкової палички, протеїв, сальмонел і стафілококів. Завдяки цьому бактеріальний концентрат і продукт, що виготовляється з його використанням, пригнічує розвиток небажаної мікрофлори та нормалізує мікробний ценоз травної системи великої рогатої худоби (табл.2).

Для стимуляції розвитку молочнокислих бактерій спосіб, що заявляється, передбачає збагачення живильного середовища нативним казеїном. З цієї метою в готове живильне середовище вносять 1% стерильного знежиреного молока. Це забезпечує збільшення кількості біомаси і чисельності мікроорганізмів в сухому бакконцентраті. Крім того, відмінною особливістю способу, що пропонується, є те, що для підвищення ефективності накопичення числа біфідобактерій, їх культують разом з пропіоновокислими бактеріями протягом 6 - 7 годин, після чого вносять лактобактерії. При цьому накопичення біомаси проводять з періодичною або безперервною нейтралізацією культуральної рідини. В результаті отримують бактеріальний концентрат, який містить в 1 г не менше $1 \cdot 10^{10}$ життєздатних клітин біфідобактерій, $1 \cdot 10^8$ молочнокислих і $1 \cdot 10^8$ пропіоновокислих бактерій. Це в 10 разів більше, ніж у бактеріальному концентраті, який одержано згідно з відомим способом. Порівняльна характеристика відомого і запропонованого бакконцентратів наведена в табл.3.

Спосіб здійснюється таким чином.

Для приготування живильного середовища відновлене сухе знежирене молоко гідролізують протосубтіліном. Потім додають буферні солі і стимулятори росту. Середовище стерилізують, охолоджують до температури 37°C і встановлюють рН 6,8 - 7,0. В готове середовище вносять 1% стерильного знежиреного молока і посівний матеріал: 5% культури *Bifidobacterium animalis* 135 и 2% *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *schermanii* H-110. Накопичення бактеріальної маси здійснюють при

температурі $37 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 6 - 7 годин, після чого вносять по 0,5% кожної з культур *Lactobacillus acidophilus* 38 і *Lactobacillus acidophilus* 20у та витримують при вищевказаній температурі ще протягом 7 ± 1 годин. Після закінчення процесу накопичення біомасу відокремлюють від культуральної рідини і змішують з захисним середовищем, яке містить 10% сахарози і 5% натрію лимоннокислого. Одержану таким чином суспензію заморожують при температурі мінус 35 - 40°C, і висушують у сублімаційній сушильці. Суху біомасу подрібнюють, розфасовують у стерильну тару і закупорюють.

Приклад 1. Одержання бактеріального концентрату.

У 70л водопровідної води розчиняють 2100г сухого знежиреного молока, встановлюють рН 6,8, суміш нагрівають до 55°C, вносять 12г протосубтіліну активністю 70од. і витримують у цих умовах 2,5 години. Після гідролізу в середовище вносять 350г лактози, 350г тризаміщеного лимоннокислого натрію, 1,4л кукурудзяного екстракту, 3,5г сірчанокислого заліза. В середовищі встановлюють рН 7,4 шляхом додавання 30% розчину гідрооксиду натрію і стерилізують при температурі 121°C протягом 30 хвилин. Активна кислотність середовища після стерилізації - 6,8од. рН. Середовище охолоджують до 37°C, вносять 0,7л знежиреного молока, 3,5л біфідобактерій *B.animalis* 135 і 1,4л пропіоновокислих бактерій *P.schermanii* P-110 і культивують при 37°C протягом 6 годин. Після цього вносять 0,35л *L.acidophilus* 38 і 0,35л *L.acidophilus* 27у та витримують ще 8 годин для остаточного накопичення біомаси. В процесі культивування проводять розкислення культуральної рідини 25% водним розчином аміаку до рН 6,6 - 7,0. В кінці росту культуральну рідину охолоджують до 12°C, нейтралізують до рН 6,8 і центрифугують. Одержану біомасу змішують у співвідношенні 1 : (1 - 2) з захисним середовищем такого складу (в г/л): сахарози 10; натрію лимоннокислого тризаміщеного 5; води - до 1л. Суспензію клітин у захисному середовищі розливають у кювети з висотою шару рідини 6мм, заморожують і висушують у сублімаційній сушильці. В 1г сухого бакконцентрату, який одержано згідно з запропонованим способом, міститься не менше $1 \cdot 10^{10}$ життєздатних клітин біфідобактерій, $1 \cdot 10^8$ - пропіоновокислих бактерій і $1 \cdot 10^8$ ацидофільних паличок. Концентрат має високу активність - сквашує молоко за 6 годин і пригнічує розвиток патогенних серотипів *E.coli* при сумісному культивуванні в 1 - 2 розведеннях.

Приклад 2. Спосіб здійснюють аналогічно прикладу 1 за винятком того, що ацидофільні бактерії вносять після 9 годин культивування біфідобактерій та пропіоновокислих бактерій. Одержаний концентрат містить $1 \cdot 10^{10}$ біфідобактерій, $1 \cdot 10^8$ пропіоновокислих бактерій і $1 \cdot 10^6$ ацидофільних паличок. Він малоактивний і сквашує молоко за 10 годин.

Приклад 3. Клінічна апробація бакконцентрату, який одержано за прикладом 1.

Клінічна апробація бакконцентрату проводилася на базі колгоспу "Україна" Тернопільського району Тернопільської області, агрофірми "Волинь" і радгоспу ім. Котовського Кременецького району Тернопільської області. Кількість піддослідних новонароджених телят дорівнювала 232 голови, з котрих у контрольну групу було залучено 65, в дослідну - 167. Дослідна група телят, у свою чергу, підрозділялася ще на 3 підгрупи згідно зі схемою застосування препарату: до першого випоювання молозива (11 голів), після першого випоювання молозива (119 голів) і після другого та третього випоювання молозива (37 голів).

1г бактеріального концентрату ресуспендували в 100 - 150мл стерильного ізотонічного розчину і призначали одноразово новонародженим телятам згідно з наведеною вище схемою.

Дослідження показали, що у телят всіх дослідних підгруп шлунково-кишкові захворювання виникали значно рідше, ніж у контрольній групі (табл.5). Якщо вони і спостерігалися, то проходили значно легше і швидше виліковувалися - навіть без традиційного лікування. Летальних випадків у дослідній групі не спостерігалось, в той час коли в контрольній групі, незважаючи на лікування, загинуло 12% телят. Слід відмітити, що чим скоріше застосовувався бакконцентрат після народження телят, тим його профілактична ефективність була вищою.

На основі одержаних результатів прийшли до висновку, що бакконцентрат "Біфідін" може використовуватись як ефективний засіб для профілактики шлунково-кишкових захворювань у новонароджених телят.

Таким чином, спосіб, що заявляється дозволяє одержати бакконцентрат, який містить більш високу чисельність життєздатних клітин бактерій, а також підвищити біологічну активність препарату, завдяки чому він застосовується як ефективний профілактичний засіб для попередження шлунково-кишкових захворювань молодня великої рогатої худоби.

Таблиця 1

Основні фізіолого-біохімічні властивості штамів бактерій,
які залучено до складу бакконцентрату Біфідін

Показник	B. animalis 135	P. schermanii H-110	L. acidophilus	
			20y	38c
Оптимальна температура росту, °C	40	30	37	37
Активність, час сквашування молока 5% культури, години	24	48	4-5	4-5
Розвиток у присутності:				
40% жовчі	+	+	+	+
2% NaCl	+	+	+	+
0,4% фенолу	+	-	+	+
Границя кислотоутворення, °T	124	138	265	280
Індекс адгезивності	2,8	2,8	0,8	0,9
Синтез вітаміну B ₁₂ в молочній сироватці с 2% дріжджового ав- толізату за 2 доби, мкг/л	-	200	-	-

Таблиця 2

Антигоністична активність штамів бактерій, які залучено до складу
бакконцентрату Біфідін *in vitro* (зони пригнічення росту тест-культур, мм)*

Тест-культура	B. animalis 135	P. schermanii H-110	L. acidophilus	
			20y	38c
Escherichia coli	30±5	>30	29±1	>30
Proteus vulgaris	>30	26±4	27±4	>30
Salmonella typhimurium	20±6	18±5	20±6	29±1
Staphylococcus aureus	22±6	17±4	19±4	23±6

*Метод радіальних штрихів, середовище MPC, ріст в атмосфері CO₂ протягом 72 годин.

Таблиця 3

Порівняльна характеристика бакконцентратів, які одержано за відомим та заявленим способами

Показники	Бакконцентрат	
	відомий	заявлений
Видовий склад мікрофлори	Біфідобактерії, ацидофільна паличка	Біфідобактерії, ацидофільна паличка, пропіоновокислі бактерії
Число життєздатних клітин в 1 г бакконцентрату, КУО:		
Біфідобактерій	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^{10}$
Лактобактерій	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$
Пропіоновокислих бактерій	-	$1 \cdot 10^8$
Активність бакконцентрату при внесенні 0,5 г в 1 л молока, години	12	8
Антагоністична активність щодо E. Coli метод сумісного культивування	-	$10^{-2}-10^{-3}$

Таблиця 4

Результати випробовування бакконцентрату Біфідін на новонароджених телятах

Схема прийому бакконцентрату	Кількість телят						
	Всього	що захворіли		що загинули		Що вижили	
		Число	%	Число	%	Число	%
До першого випоювання молозива	11	2	18	-	-	11	100
Після першого випоювання молозива	119	12	11	-	-	119	100
Після другого та третього випоювання молозива	37	10	27	-	-	37	100
Контроль (без бакконцентрату)	65	51	78	8	12	57	88