



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **89050**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 12669**

(22) Дата подання заявки: **30.10.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.04.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.04.2014, Бюл.№ 7**

(72) Винахідник(и):

**Янковський Дмитро Станіславович (UA),
Широбоков Володимир Павлович (UA),
Димент Галина Семенівна (UA)**

(73) Власник(и):

**Янковський Дмитро Станіславович,
вул. Чумака, 6, кв. 4, м. Київ-65, 03065 (UA),
Широбоков Володимир Павлович,
вул. Терещенківська, 13, кв. 30, м. Київ-004,
01004 (UA),
Димент Галина Семенівна,
вул. Лісовська, 18-а, кв. 172, м. Київ-97,
02097 (UA)**

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРОБІОТИКА ДЛЯ ТВАРИН "МУЛЬТИСМЕКТ"

(57) Реферат:

Спосіб одержання пробіотику для тварин передбачає використання біфідобактерій, лактобацил і молочнокислих стрептококів, нарощування їх біомаси в живильному середовищі, що містить молоко. В складі пробіотику з біфідобактерій використовують види *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, з лактобацил - види *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, з молочнокислих стрептококів - види *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, додатково використовують пропіоновокислі бактерії видів *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acidipropionici* і оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter aceti*, а як середовища культивування використовують суміш знежиреного молока з 5 %-м гелем смектиту в співвідношенні 1:1.

UA 89050 U

Корисна модель належить до біотехнології й може бути використана при одержанні пробіотика для тварин.

Одним з найбільш перспективних способів попередження захворюваності сільськогосподарських тварин, підвищення їх продуктивності й поліпшення повноцінності кормів, є використання у тваринництві препаратів пробіотичної дії.

Відомий спосіб одержання пробіотика для телят Біфіцин передбачає культивування штамів *Bifidobacterium longum* B-12, *Lactobacillus plantarum* P-19, *Enterococcus faecium* E-18 і *Bacillus subtilis* B-26 у живильному середовищі при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 14-18 годин (Патент РФ № 2193059, С12N 1/20, А61К 35/74, 1999).

Недоліком способу є використання в складі пробіотика умовно-патогенних бактерій видів *Enterococcus faecium* і *Bacillus subtilis*, які в певних умовах можуть активізуватися в травному тракті тварини й привести до серйозних інфекційних ускладнень.

Відомо також спосіб одержання пробіотика для тварин і птахів, що передбачає культивування штаму *Streptococcus faecium* TE-17 у живильному середовищі, що містить молочну сироватку, глюкозу, дріжджовий автолізат, вітамінну добавку у вигляді водного розчину вітамінів: параамінобензойної кислоти, тіаміну, аскорбінової кислоти, рибофлавіну сумарною концентрацією 0,005-0,06 %, а також ненасичені жирні кислоти - попередники простагландинів у кількості 10^{-5} - 10^{-6} М (патент РФ № 2217493, С12N 1/20, А61К 35/74, С12R1:46).

Спосіб відрізняється складністю приготування пробіотика, але основний його недолік полягає у використанні ентерококів, що є представниками умовно-патогенних бактерій, які характеризуються множинною резистентністю до антибіотиків і широким спектром потенційних патогенних властивостей.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання пробіотика для тварин і птахів, що передбачає культивування біфідобактерій виду *Bifidobacterium thermophilum*, молочнокислих стрептококів виду *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* і ацидофільної палички в живильному середовищі на молочній основі, відокремлення біомаси, змішування її із захисним середовищем і розпилювальне сушіння одержаної суміші, при цьому культивування біфідобактерій у посівній дозі 8-10 % і молочнокислих стрептококів у посівній дозі 0,01-0,1 % здійснюють сумісно при температурі $39-41^\circ\text{C}$, а ацидофільну паличку нарощують окремо й додають до біомаси біфідобактерій і стрептококів у кількості 15 % перед сушінням (Патент РФ № 2018313, А61К 35/66, С12N 1/20, 1994 - прототип).

Пробіотик, одержаний відомим способом, складається з фізіологічно цінних бактерій, які не здатні викликати патологічні зміни в організмі тварин. Однак спосіб відрізняється трудомісткістю, необхідністю роздільного культивування ацидофільної палички з наступним змішуванням її біомаси з біомасою інших бактеріальних компонентів пробіотика. Для культивування мікроорганізмів і одержання їх біомаси використовується досить складне живильне середовище. Розпилювальне сушіння пробіотичних бактерій, що використовується в способі, незважаючи на застосування дорогого захисного середовища, є потужним інгібуючим фактором, що пригнічує життєдіяльність більшої частини бактеріальних клітин. Крім цього пробіотик, одержаний відомим способом, містить тільки два штами пробіотичних бактерій, що недостатньо для надання препарату властивості виявляти ефективний пробіотичний вплив на організм тварини. Молочнокислий стрептокок *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* є активним газоутворювачем, у зв'язку з чим його використання в складі пробіотика для тварин не бажане.

Задачею корисної моделі є створення способу одержання пробіотика для тварин "Мультисмет", у якому шляхом використання багатовидового симбіозу біфідобактерій, лактобацил, молочнокислих стрептококів і пропіоновокислих бактерій, а також нарощування біомаси клітин у суміші молока з гелем смектиту й виключення операції сушіння, забезпечується підвищення активності, розширення спектра пробіотичних властивостей, зниження трудомісткості й підвищення економічної ефективності процесу виробництва пробіотику.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі одержання пробіотика для тварин "Мультисмет", що передбачає використання біфідобактерій, лактобацил і молочнокислих стрептококів і нарощування їх біомаси в живильному середовищі, що містить молоко, згідно з корисною моделлю, в складі пробіотика з біфідобактерій використовують види *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, з лактобацил - види *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, з молочнокислих стрептококів - види *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* і *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, додатково використовують пропіоновокислі бактерії видів *Propionibacterium freudenreichii* і *Propionibacterium acidipropionici* і оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter aceti*, а як середовища культивування використовують суміш знежиреного молока з 5 %-м водним гелем смектиту у співвідношенні 1:1.

Пропонований спосіб передбачає використання у складі пробіотика пропіоновокислих бактерій, біфідобактерій, лактобацил, молочнокислих стрептококів і оцтовокислих бактерій видів *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Acetobacter acetii*. До складу препарату відбирають комплекс штамів, які здатні вступати у взаємовигідні симбіотичні відносини й формувати стійкий мутуалістичний симбіоз, в якому пробіотичні властивості окремих мікроорганізмів підсумовуються із проявом синергізму найбільш важливих активностей.

За рахунок додаткового введення до складу пробіотика пропіоновокислих бактерій фізіологічний комплекс метаболітів, синтезованих іншими компонентами симбіозу, доповнюється пропіоновою кислотою, яка виконує в організмі тварини ряд важливих функцій (виявляє антагоністичну дію на широкий спектр патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, у тому числі грибів і вірусів; блокує адгезію клітин патогенів до епітелію; є субстратом глюконеогенезу для епітеліоцитів; нормалізує ліпідний обмін у печінці; регулює мікроциркуляцію). Крім цього пропіоновокислі бактерії є активними продуцентами кобаламінів, мають виражені антимутагенні й антиоксидантні властивості, що також позитивно впливає на організм тварини.

Введення до складу пробіотика оцтовокислих бактерій сприяє оптимізації умов для анаеробних цукролітичних бактерій і збагаченню пробіотика вітамінами групи В.

Пропонований спосіб передбачає використання в складі пробіотика гелю смектиту. Смектит - це природний глинистий матеріал, що має високі вологоутримуючі, іонообмінні та адсорбційні властивості. Його одержують шляхом глибокого очищення природного смектиту (бентоніту) від забруднюючих речовин, грубих часток, важких металів і мікроорганізмів.

Гель смектиту має високі адсорбційні властивості щодо вірусів, токсинів, радіонуклідів, важких металів й інших шкідливих сполук, однак він не зв'язує бактеріальні клітини, тому не здатний порушувати мікробний баланс у біотопах тварини й викликати метаболічні порушення в його організмі. При взаємодії клітин пробіотичних бактерій з гелем смектиту під час нарощування біомаси дрібнодисперсний сорбент зв'язується з поверхневими структурами бактеріальних клітин і покриває їх захисним шаром, захищаючи від впливу інгібуючих факторів.

Смектит є цінним джерелом макро- і мікроелементів, які поліпшують обмінні процеси в організмі тварини. Завдяки здатності активно зв'язувати воду, набухати й формувати гелі, смектит, на відміну від багатьох інших сорбентів, не здатний спричиняти пошкоджуючий вплив на слизові оболонки органів травного тракту, а навпроти, має обволікаючі властивості й сприяє зміцненню слизового бар'єра. За рахунок здатності нормалізувати кислотно-лужний баланс в організмі тварини, смектит оптимізує перебіг біохімічних процесів. Перераховані особливості гелю смектиту дозволяють використовувати одержаний пропонованим способом комплексний бактеріально-смектиновий препарат протягом тривалого часу, у тому числі у новонароджених тварин, без небезпеки розвитку негативних ефектів. В той же час здатність гелю смектиту активно адсорбувати ентеровіруси дозволяє одержати пробіотик з високою антивірусною активністю, що актуально з урахуванням неухильного збільшення частоти захворюваності молодняка сільськогосподарських тварин вірусними ентероколітами.

Як показали спеціально проведені дослідження, гель смектиту має високі протекторні властивості щодо біомаси багатовидового симбіозу, що є бактеріальною основою пробіотика. Зв'язуючи кисень і його токсичні похідні, гель смектиту оптимізує умови для розвитку облигатно анаеробної пробіотичної флори, у першу чергу біфідобактерій. Враховуючи підвищену концентрацію в біотопах травного тракту новонароджених тварин кисню, що приводить до надлишкової проліферації аеробних і факультативно-анаеробних умовно-патогенних мікроорганізмів, використання смектинового пробіотика буде сприяти оптимізації процесу становлення у тварин фізіологічного анаеробного біоценозу.

В присутності гелю смектиту значно краще зберігається бактеріальний склад і активність пробіотичної біомаси, підвищується резистентність клітин до шлункового соку й жовчі.

Гель смектиту додають у знежирене молоко, призначене для нарощування біомаси бактеріальних клітин, у співвідношенні 1:1. Дане співвідношення є оптимальним для одержання пробіотика з високою концентрацією бактеріальних клітин і широким спектром фізіологічно цінних властивостей. Зміна співвідношення у бік зменшення кількості гелю смектиту приводить до зниження в пробіотику концентрації життєдіяльних клітин анаеробних бактерій і корисних мінеральних сполук, а також зниженню антивірусної активності й резистентності препарату до природних інгібіторів травного тракту. Зміна співвідношення у бік збільшення концентрації гелю смектиту недоцільна, оскільки надмірно розводить молоко й зменшує концентрацію в

середовищі живильних субстратів, що може привести до зниження інтенсивності росту мікрофлори й подовження процесу культивування.

Спосіб здійснюють таким чином.

5 Як середовища культивування використовують знежирене молоко, у яке додають водний гель смектиту з вмістом сухих речовин 5 % у співвідношенні 1:1. Середовище стерилізують і охолоджують до температури культивування.

Для готування інокуляту використовують мультикомпонентний симбіоз молочнокислих, пропіоновокислих, оцтовокислих і біфідобактерій.

10 Для створення симбіозу штами бактерій видів *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Acetobacter aceti*, відібраних за фізіологічно цінними властивостями, з'єднують у стерильному знежиреному молоці в оптимальних співвідношеннях, що сприяють формуванню стійкого мультисимбіозу.

15 Інокульоване молоко ферментують протягом 24-28 годин при температурі 34-37 °С. Одержаний симбіоз використовують як посівний матеріал для одержання інокуляту. З цією метою знежирене молоко змішують у рівних співвідношеннях з водним гелем смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Одержану суміш інокують 3-5 % підготовленого симбіозу й витримують при температурі 34-37 °С протягом 20-24 годин.

20 Одержаний інокулят у кількості 5-8 % вносять у підготовлене стерильне живильне середовище. Інокульоване середовище ферментують протягом 18-24 годин при температурі 34-37 °С для накопичення біомаси щільністю клітин $(1-5) \times 10^9$ КУО/см³.

Корисна модель пояснюється прикладами.

25 Приклад 1. 100 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 10 % змішують із 100 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Середовище стерилізують при температурі 121 °С протягом 25 хвилин і охолоджують до температури 37 °С.

Для створення симбіозу культури нижчеперелічених штамів з'єднують у стерильному знежиреному молоці з вмістом сухих речовин 10 % у наступних співвідношеннях:

30 *Bifidobacterium bifidum* ВКПМ В-5799-3;
Bifidobacterium longum ВКПМ В-4557-4;
Bifidobacterium adolescentis ІМВ В-7112-1;
Lactobacillus casei ВКПМ В-3960-2;
Lactobacillus plantarum ВКПМ В-5494-2;
Lactococcus lactis ВКПМ В-5387-2;
35 *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* ВКПМ В-4304-2;
Propionibacterium freudenreichii ssp. *shermanii* ВКПМ В-4544-3;
Propionibacterium acidipropionici ВКПМ В-5723-3;
Acetobacter aceti ВКПМ В-5495-1.

40 Інокульоване молоко ферментують протягом 24 годин при температурі 37 °С. Одержаний симбіоз використовують як посівний матеріал для приготування інокуляту. Для цього 5 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 10 % змішують з 5 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Одержану суміш інокують 500 мл підготовленого симбіозу й витримують при температурі 37 °С протягом 20 годин.

45 Інокулят у кількості 10 л вносять в 200 л підготовленого стерильного живильного середовища. Інокульоване середовище ферментують протягом 18 годин для накопичення біомаси щільністю клітин 5×10^9 КУО/см³.

Приклад 2. 500 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 12 % змішують із 500 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Середовище стерилізують при температурі 121 °С протягом 35 хвилин і охолоджують до температури 36 °С.

50 Для створення симбіозу культури нижчеперелічених штамів з'єднують у стерильному знежиреному молоці з вмістом сухих речовин 12 % у наступних співвідношеннях:

Bifidobacterium bifidum ІМВ В-7113-3;
Bifidobacterium longum ВКПМ В-4635-3;
Bifidobacterium longum ІМВ В-7150-2;
55 *Bifidobacterium adolescentis* ІМВ В-7148-1;
Lactobacillus casei ВКПМ В-4542-2;
Lactobacillus plantarum ІМВ В-7116-2;
Lactococcus lactis ВКПМ В-5725-2;
Streptococcus salivarius ssp. *thermophilus* ВКПМ В-4741-2;
60 *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* ВКПМ В-4545-4;

Propionibacterium acidipropionici ВКПМ В-5800-3;
Acetobacter acetii ВКПМ В-5495-2.

Інокульоване молоко ферментують протягом 28 годин при температурі 36 °С. Отриманий симбіоз використовують як посівний матеріал для одержання інокуляту. Для одержання інокуляту 15 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 12 % змішують з 15 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Одержану суміш інокують 900 мл підготовленого симбіозу й витримують при температурі 36 °С протягом 20 годин.

Одержаний інокулят у кількості 30 л вносять в 1000 л підготовленого стерильного живильного середовища. Інокульоване середовище ферментують протягом 24 годин для накопичення біомаси щільністю клітин 3×10^9 КУО/см³.

Приклад 3. 300 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 11 % змішують з 300 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Середовище стерилізують при температурі 121 °С протягом 30 хвилин і охолоджують до температури 34 °С.

Для створення симбіозу культури нижчеперелічених штамів з'єднують у стерильному знежиреному молоці із вмістом сухих речовин 11 % у наступних співвідношеннях:

Bifidobacterium bifidum IMB В-7113-3;
Bifidobacterium longum IMB В-7150-5;
Bifidobacterium adolescentis IMB В-7148-1;
Lactobacillus casei ВКПМ В-5724-2;
Lactobacillus casei ВКПМ В-3960-1;
Lactobacillus plantarum IMB В-7116-2;
Lactococcus lactis ВКПМ В-5218-2;
Streptococcus salivarius ssp. *thermophilus* ВКПМ В-5388-2;
Propionibacterium freudenreichii ssp. *shermanii* ВКПМ В-4545-5;
Propionibacterium acidipropionici ВКПМ В-5800-3;
Acetobacter acetii ВКПМ В-5495-1.

Інокульоване молоко ферментують протягом 26 годин при температурі 34 °С. Одержаний симбіоз використовують як посівний матеріал для одержання інокуляту. Для одержання інокуляту 12 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 11 % змішують із 12 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Одержану суміш інокують 1 л підготовленого симбіозу й витримують при температурі 34 °С протягом 24 годин.

Одержаний інокулят у кількості 24 л вносять в 600 л підготовленого стерильного живильного середовища. Інокульоване середовище ферментують протягом 26 годин при температурі 34 °С для накопичення біомаси клітин мікроорганізмів 1×10^9 КУО/см³.

Таким чином, пропонується спосіб дозволяє одержувати ефективний пробіотик, який може бути використаний у тваринництві, у тому числі для оптимізації процесу формування мікробної екосистеми у молодняка тварин, а також для лікування тварин з інфекційними захворюваннями, інтоксикаціями та для попередження цих патологічних процесів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання пробіотика для тварин, що передбачає використання біфідобактерій, лактобацил і молочнокислих стрептококів, нарощування їх біомаси в живильному середовищі, що містить молоко, який **відрізняється** тим, що в складі пробіотика з біфідобактерій використовують види *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, з лактобацил - види *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, з молочнокислих стрептококів - види *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, додатково використовують пропіоновокислі бактерії видів *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acidipropionici* і оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter acetii*, а як середовища культивування використовують суміш знежиреного молока з 5 %-м гелем смектиту в співвідношенні 1:1.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601