



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108013** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 00446	(72) Винахідник(и): Янковський Дмитро Станіславович (UA), Широбоков Володимир Павлович (UA), Димент Галина Семенівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.01.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 24.06.2016	(73) Власник(и): ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ ФІРМА "О.Д. ПРОЛІСОК", вул. Ворошилова, 17-а, с. В. Вільшанка, Васильківський р-н, Київська обл., 08671 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 24.06.2016, Бюл.№ 12	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРОБІОТИКА "СИМБІТЕР 300" ДЛЯ ТВАРИН

(57) Реферат:

Спосіб одержання пробіотики для тварин включає використання лактобацил і біфідобактерій, нарощування їх біомаси в живильному середовищі. В складі пробіотики з біфідобактерій використовують види *Bifidobacterium longum* і *Bifidobacterium adolescentis*, з лактобацил - види *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* і *Lactobacillus helveticus*. Додатково використовують молочнокислі стрептококи видів *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* і *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, пропіоновокислі бактерії виду *Propionibacterium freudenreichii* і оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter aceti*. Як живильне середовище використовують стерильну суміш знежиреного молока з 5 %-м водним гелем смектиту у співвідношенні 1:2.

UA 108013 U

Корисна модель належить до біотехнології й може бути використана при одержанні пробіотика для домашніх тварин, птахів і риб (собак, кішок, морських свинок, гризунів, папуг, акваріумних рибок та ін.).

5 Несприятливий екологічний фон, часте застосування у ветеринарії медикаментозних засобів, особливо антибіотиків, зміна раціонів годівлі, неповноцінність кормів за окремими нутрієнтами, стресові впливи й багато інших факторів сприяють порушенню мікробної екології організму, що може послужити пусковим механізмом розвитку у тварин різноманітних інфекційних і соматичних захворювань.

10 Одним з найбільш ефективних і безпечних методів попередження мікроекологічних порушень у домашніх тварин, птахів і риб є застосування пробіотиків, що сприяють підтриманню мікробної й імунної системи організму, поліпшенню травлення, захисту від стресів.

В даний час багато із запропонованих на ветеринарному ринку препаратів і продуктів рекламують як пробіотики. Вони різні за складом, формою виготовлення, фармакологічною спрямованістю дії, показаннями до застосування. Незважаючи на безперервне поповнення 15 ветеринарних засобів пробіотичної серії новими розробками, відчувається дефіцит якісних препаратів. Проблема розширення асортименту і підвищення ефективності пробіотиків для домашніх тварин здобуває все більшу актуальність і перспективність.

Відомо спосіб одержання замороженого повноцінного корму з пробіотичною мікрофлорою для собак, що передбачає змішування сировини, що містить м'ясо, з двоштамовою закваскою 20 біфідобактерій і молочнокислих бактерій, на основі штамів *Bifidobacterium bifidum* №1 і *Lactobacillus plantarum* 38, з'єднаних у співвідношенні 2:1 [патент РФ № 2423518, С12N1/20, А23K1/16, 2011].

Спосіб дозволяє поліпшити якість корму за рахунок збагачення його пробіотичними бактеріями. Однак, обмеження складу препарату сумішшю двох штамів не може забезпечити 25 достатню пробіотичну ефективність кормової суміші.

Відомо також спосіб одержання композицій кормових продуктів для домашніх тварин, що включають пробіотики, який передбачає змішування сировини, що містить крохмаль, з культурами одного або декількох штамів з родів *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, 30 *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* або *Lactobacillus* [патент РФ № 2533024, А21 К1/16, А23 К1/00].

Спосіб відрізняється складністю приготування кормових композицій, але основний його недолік полягає у використанні поряд з корисними бактеріями представників умовно-патогенних мікроорганізмів, здатних призвести до розвитку у тварин інфекційно-запальних ускладнень.

35 Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання пробіотика "Лактобіфадол" для собак і кішок, що передбачає роздільне приготування культур двох штамів лактобацил і біфідобактерій *Lactobacillus acidophilus* ЛГ-1 і *Bifidobacterium adolescentis* В-1, їх змішування й висушування [Суботін В.В. Лактобіфадол (біфацидобактерин) - новий вітчизняний пробіотик для ветеринарії //Матеріали Міжнародної конференції, присвяченої 125-річчю 40 Державної академії ветеринарної медицини ім. М.Е. Баумана. - Казань, 1998. - С160-161 – прототип].

Пробіотик, одержаний відомим способом, складається з фізіологічно цінних бактерій, які не здатні викликати патологічні зміни в організмі тварин. Однак він містить тільки два штами пробіотичних бактерій, що недостатньо для наділення препарату здатністю виявляти 45 ефективний пробіотичний вплив на організм тварини. Використання висушених культур значно здорожує виробництво й приводить до зниження пробіотичної активності, оскільки висушені штами повільно виходять зі стану анабіозу й відновлюють свою життєдіяльність.

Задачею корисної моделі є створення способу одержання пробіотика "Симбітер зоо" для домашніх тварин, птахів і риб, в якому шляхом використання багатовидового симбіозу 50 біфідобактерій, лактобацил, молочнокислих стрептококів, пропіоновокислих і оцтовокислих бактерій, а також нарощування біомаси клітин у суміші молока з гелем смектиту (бентоніту) й виключення операції сушіння, забезпечується підвищення активності, розширення спектра пробіотичних властивостей, зниження трудомісткості й підвищення економічної ефективності процесу виробництва пробіотика.

55 Поставлена задача вирішується тим, що в способі одержання пробіотика "Симбітер зоо" для тварин, що передбачає використання біфідобактерій і лактобацил та нарощування їх біомаси в живильному середовищі згідно з корисною моделлю, в складі пробіотика з біфідобактерій використовують види *Bifidobacterium longum* і *Bifidobacterium adolescentis*, з лактобацил - види *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* і *Lactobacillus helveticus*, 60 додатково використовують молочнокислі стрептококи видів *Streptococcus salivarius* subsp.

thermophilus і *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, пропіоновокислі бактерії виду *Propionibacterium freudenreichii* і оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter acetii*, а як живильне середовище (середовище культивування) використовують стерильну суміш знежиреного молока з 5 %-м водним гелем смектиту у співвідношенні 1:2.

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

15 За рахунок уведення до складу пробіотика додаткових видів бактерій фізіологічний комплекс мікробних метаболітів збагачується цінними сполуками, що підсилюють оздоровчий вплив пробіотика на організм. Зокрема, пропіонова кислота, яка синтезується видом *Propionibacterium freudenreichii*, 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 того, пропіоновокислі бактерії є активними продуцентами кобаламінів, мають виражені антимурагенні й антиоксидантні властивості, що також виявляє досить позитивний вплив на організм тварини.

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

25 Молочнокислі стрептококи є джерелом фізіологічних полісахаридів, що стимулюють імунну систему, й протимікробних пептидів, які пригнічують патогенну мікрофлору.

Пропонований спосіб передбачає використання у складі пробіотика гелю смектиту. Сmekтит (бентоніт) - це природний глинистий матеріал, що характеризується високими вологоутримуючими, іонообмінними й адсорбційними властивостями. Його одержують шляхом глибокого очищення природного смектиту від забруднюючих речовин, грубих часток, важких металів і мікроорганізмів.

Гель смектиту має високі адсорбційні властивості щодо вірусів, токсинів, радіонуклідів, важких металів та інших шкідливих сполук, однак він не зв'язує бактеріальні клітини і 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. Сmekтит є цінним джерелом макро- і мікроелементів, що 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 впливати на слизові оболонки органів травного тракту, а навпаки, має обволікаючі властивості й сприяє зміцненню слизового бар'єра. За рахунок здатності нормалізувати кислотно-лужний баланс в організмі тварини, смектит оптимізує перебіг біохімічних процесів. Перелічені особливості гелю смектиту дозволяють використовувати одержаний пропонованим способом комплексний бактеріально-смектитовий препарат протягом тривалого часу, у тому числі у дитинчат тварин, без небезпеки розвитку негативних ефектів. У той же час здатність гелю смектиту активно адсорбувати ентеровіруси дозволяє одержати пробіотик з високою антивірусною активністю, що актуально з урахуванням частої захворюваності свійських тварин, птахів і акваріумних рибок вірусними інфекціями різної локалізації.

50 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 фізіологічної флори й попереджає надлишкову проліферацію аеробних і факультативно-анаеробних умовно-патогенних мікроорганізмів.

55 Використання смектитового пробіотика у дитинчат тварин буде сприяти оптимізації процесу становлення у них фізіологічного біоценозу.

У присутності гелю смектиту значно краще зберігається бактеріальний склад і активність пробіотичної біомаси, підвищується резистентність клітин до несприятливих факторів середовища.

Гель смектиту додають у знежирене молоко, призначене для нарощування біомаси бактеріальних клітин, у співвідношенні 2:1. 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 концентрації життєдіяльних клітин анаеробних бактерій і корисних мінеральних сполук, а також зниження антивірусної активності й резистентності препарату до природних інгібіторів травного тракту. Зміна співвідношення у бік збільшення концентрації гелю смектиту недоцільна, оскільки зайво розбавляє молоко й зменшує концентрацію в середовищі живильних субстратів, що може призвести до зниження інтенсивності росту мікрофлори й подовження процесу культивування.

Спосіб здійснюють таким чином.

Як живильне середовище використовують суміш знежиреного молока й водного гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 % при співвідношенні зазначених компонентів 1:2. Середовище стерилізують і охолоджують до температури культивування.

Для приготування інокулята використовуються мультикомпонентний симбіоз молочнокислих, пропіоновокислих, оцтовокислих і біфідобактерій.

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

Інокульоване молоко ферментують протягом 24-28 годин за температури 34-37 °С. Отриманий симбіоз використовують як посівний матеріал для одержання інокулята. З цією метою знежирене молоко змішують у співвідношенні 1:2 з водним гелем смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Отриману суміш інокують 3-5 % підготовленого симбіозу й витримують за температури 34-37 °С протягом 20-24 годин.

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

Корисна модель пояснюється прикладами.

Приклад 1. 100 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 10 % змішують з 200 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Середовище стерилізують за температури 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:

Bifidobacterium longum ВКПМ В-4557-4

Bifidobacterium adolescentis 1МВ В-7112-1

Lactobacillus casei ВКПМ В-3960-2

Lactobacillus plantarum ВКПМ В-5494-2

Lactobacillus fermentum 1МВ В-7133-3

Lactobacillus helveticus 1МВ В-7115-2

Lactococcus lactis ВКПМ В-5387-2

Streptococcus salivarius ssp. *thermophilus* ВКПМ В-4304-2

Propionibacterium freudenreichii ssp. *shermanii* ВКПМ В-4544-3

Acetobacter acetii ВКПМ В-5495-1.

Інокульоване молоко ферментують протягом 24 годин за температури 37 °С. Отриманий симбіоз використовують як посівний матеріал для приготування інокуляту. Для цього 5 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 10 % змішують з 10 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Отриману суміш інокують 750 мл підготовленого симбіозу й витримують за температури 37 °С протягом 20 годин.

Інокулят у кількості 15 л вносять в 300 л підготовленого стерильного живильного середовища. Інокульоване середовище ферментують протягом 18 годин для накопичення біомаси з концентрацією клітин 5×10^9 КУО/см³.

Приклад 2. 500 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 12 % змішують з 1000 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Середовище стерилізують за температури 121 °С протягом 35 хвилин і охолоджують до температури 36 °С.

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

Bifidobacterium longum ВКПМ В-4635-3

Bifidobacterium longum 1MB B-7150-2
 Bifidobacterium adolescentis 1MB B-7148-1
 Lactobacillus casei ВКПМ B-4542-2
 Lactobacillus plantarum 1MB B-7116-2
 5 Lactobacillus fermentum ВКПМ B-5798-2
 Lactobacillus helveticus 1MB B-7115-1
 Lactococcus lactis ВКПМ B-5725-2
 Streptococcus salivarius ssp. thermophilus ВКПМ B-4741-2
 Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii ВКПМ B-4545-4
 10 Acetobacter acetii ВКПМ B-5495-2.

Інокульоване молоко ферментують протягом 28 годин за температури 36 °С. Отриманий симбіоз використовують як посівний матеріал при одержанні інокуляту. Для одержання інокуляту 15 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 12 % змішують з 30 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Отриману суміш інокують 1,5 л підготовленого симбіозу й витримують за температури 36 °С протягом 20 годин.

Одержаний інокулят у кількості 45 л вносять у 1500 л підготовленого стерильного живильного середовища. Інокульоване середовище ферментують протягом 24 годин для накопичення біомаси з концентрацією клітин 3×10^9 КУО/см³.

Приклад 3. 300 л знежиреного молока з вмістом сухих речовин 11 % змішують із 600 л гелю смектиту з вмістом сухих речовин 5 %. Середовище стерилізують за температури 121 °С протягом 30 хвилин і охолоджують до температури 34 °С.

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

Bifidobacterium longum 1MB B-7150-5
 25 Bifidobacterium adolescentis 1MB B-7148-1
 Lactobacillus casei ВКПМ B-5724-2
 Lactobacillus casei ВКПМ B-3960-1
 Lactobacillus plantarum 1MB B-7116-2
 Lactobacillus fermentum 1MB B-7133-4
 30 Lactobacillus helveticus 1MB B-7115-2
 Lactococcus lactis ВКПМ B-5218-2
 Streptococcus salivarius ssp. thermophilus ВКПМ B-5388-2
 Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii ВКПМ B-4545-5
 Acetobacter acetii ВКПМ B-5495-1.

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

Одержаний інокулят у кількості 36 л вносять у 900 л підготовленого стерильного живильного середовища. Інокульоване середовище ферментують протягом 26 годин за температури 34 °С для накопичення біомаси з концентрацією клітин 1×10^9 КУО/см³.

Таким чином пропонований спосіб дозволяє одержати ефективний пробіотик, який може бути використаний для профілактики захворюваності домашніх тварин, птахів і риб, у тому числі для оптимізації процесу формування мікробної екосистеми у дитинчат тварин, а також для лікування тварин з інфекційними захворюваннями, інтоксикаціями й для попередження цих патологічних процесів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання пробіотика для тварин, що передбачає використання лактобацил і біфідобактерій, нарощування їх біомаси в живильному середовищі, який **відрізняється** тим, що в складі пробіотика з біфідобактерій використовують види Bifidobacterium longum і Bifidobacterium adolescentis, з лактобацил - види Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, 55 Lactobacillus fermentum і Lactobacillus helveticus, додатково використовують молочнокислі стрептококи видів Streptococcus salivarius subsp. thermophilus і Lactococcus lactis subsp. lactis, пропіоновокислі бактерії виду Propionibacterium freudenreichii і оцтовокислі бактерії виду Acetobacter acetii, а як живильне середовище використовують стерильну суміш знежиреного молока з 5 %-м водним гелем смектиту у співвідношенні 1:2.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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