



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **45164** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61K 35/74 (2009.01)
A23C 9/12
C12N 1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРОБІОТИКА "СИМБІТЕР-ПРЕМІУМ"

1

(21) u200905619
(22) 02.06.2009
(24) 26.10.2009
(46) 26.10.2009, Бюл.№ 20, 2009 р.
(72) ШИРОБОКОВ ВОЛОДИМИР ПАВЛОВИЧ, ЯН-КОВСЬКИЙ ДМИТРО СТАНІСЛАВОВИЧ, ДИМЕНТ ГАЛИНА СЕМЕНІВНА
(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ ФІРМА "О.Д. ПРОЛІСОК"
(57) Спосіб одержання пробіотика, що передбачає культивування в середовищі, що містить водну суспензію зародків пшениці, мультикомпонентного симбіозу, який складається з лактобацил видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*,

2

Lactobacillus brevis, біфідобактерій видів *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis* і *Bifidobacterium breve*, молочнокислих стрептококів видів *Lactococcus lactis* і *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, пропіоновокислих бактерій виду *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, який **відрізняється** тим, що до складу середовища культивування вводять 5-6%-ний гель бентоніту, зародки пшениці використовують у вигляді шроту, при цьому водну суспензію шроту зародків пшениці з концентрацією сухих речовин 10-12% змішують з гелем бентоніту в співвідношенні 1:1-1:2.

Корисна модель відноситься до біотехнології й може бути використана у виробництві пробіотиків.

Неухильний ріст хворих, які страждають різними «хворобами цивілізації», і встановлення важливої ролі індигенної мікрофлори людини в підтриманні гомеостазу, є основними причинами збільшення інтересу вчених і практиків до проблеми збереження й відновлення мікробної екології людини за допомогою препаратів на основі живих клітин фізіологічної мікрофлори - пробіотиків.

Одним з напрямків, що найбільш активно розвиваються в галузі одержання нових видів пробіотиків, є комбінування пробіотичної мікрофлори з добавками, які стимулюють її ріст - пребіотиками. Уже відома величезна кількість препаратів, що складаються з біомаси пробіотичної мікрофлори й добавок пребіотичного характеру, у якості яких найчастіше використовують фруктоолігосахариди або інші вуглеводи, які не ферментуються ензимами травної системи, але активно використовуються облігатною сахаролітичною мікрофлорою товстої кишки як джерело харчування. Однак у більшості випадків використання сучасних комплексних препаратів такого типу, що одержали назву синбіотиків, не приводить до очікуваного біотерапевтичного ефекту.

Однією із причин недостатньої ефективності синбіотиків є використання при їхньому створенні помилкових уявлень про селективність пребіотиків і вибіркове використання їх винятково біфідобактеріями. Унікальна мінливість мікрофлори дозволяє їй швидко здобувати нові властивості при зміні умов росту, зокрема складу середовища культивування. Це особливо стосується спектра вуглеводів, які використовуються у харчуванні мікроорганізмів, оскільки здатність до ферментації даних сполук дуже часто кодується плазмідами, які легко передаються іншим мікроорганізмам. Очевидно із цієї причини твердження про виняткову біфідогенну дію лактулози й інших фруктоолігосахаридів, які широко рекомендують для застосування як ефективний засіб для корекції мікробного балансу товстої кишки в напрямку формування біфідодомінантного складу, стають усе менш переконливими. Так, установлено, що фруктоолігосахариди можуть стимулювати ріст ентерококів, дріжджеподібних грибів, окремих видів ентеробактерій, клостридій, бактероїдів і інших умовно-патогенних мікроорганізмів. У зв'язку із цим варто побоюватися призначати препарати, що містять вуглеводні пребіотики, хворим із синдромом надлишкової мікробної контамінації тонкої кишки, оскільки можливий негативний вплив на мікрофлору товстої кишки.

(19) **UA** (11) **45164** (13) **U**

вний ефект, пов'язаний з різкою стимуляцією кислотоутворюючої флори й поглибленням дисбіотичних розладів. Крім того, мікроорганізми, що перебувають у стані анабіозу, відновлюють свою біологічну активність значно повільніше, ніж відбувається метаболізм пребіотика життєдіяльною мікрофлорою верхніх відділів травного каналу. Тому ростостимулююча добавка не впливає на активність пробіотика, але здатна поглиблювати патологію, обумовлену надлишковою контамінацією тонкої кишки.

Для того, щоб пребіотик досягнув товстокишечного біотопу, потрібно використати значно більшу кількість даного компоненту, чим його можна увести до складу пробіотичного препарату. Тому добавка, яку містить синбіотик, не здатна значною мірою вплинути на мікробну екологію товстої кишки. Основна функція більшості пребіотиків обмежується підвищенням загального рівня сахаролітичної мікрофлори, включаючи й умовно-патогенні види й збільшенням за рахунок цього кислотності кишкового вмісту, що може сприяти санації товстої кишки. Однак введення цих речовин до складу ліофілізованого пробіотика звичайно не приводить до прогнозованого збільшення ефективності препарату.

Більш доцільним і перспективним шляхом поліпшення якості пробіотиків є пошук і раціональне використання компонентів натурального походження, що виконують роль стимуляторів росту й активності пробіотичної мікрофлори. Раціональне використання таких добавок буде сприяти підвищенню ефективності препарату. Серед природних компонентів даної групи великий інтерес викликають добавки на основі зернових продуктів, які містять цінні біологічно активні сполуки, які чинять сприятливий вплив як на ріст пробіотичних мікроорганізмів, так і на здоров'я людини.

Відомий спосіб одержання харчової добавки передбачає готування суміші пшеничних висівок, моркви й капусти, гомогенізацію, пастеризацію й ферментацію підготовленої суміші культурами видів *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Propionibacterium shermanii*, *Lactobacillus plantarum*, узятими окремо або в суміші в рівних кількостях (Патент Російської Федерації №2136175, А 23 L 1/105, 1/212, 1999).

Недоліком способу є низька концентрація клітин фізіологічно цінної мікрофлори в продукті, його низька збереже здатність і можливість використання тільки як добавки до готових продуктів харчування.

Відомо також спосіб одержання сухого вуглеводного продукту лікувально-профілактичної дії "Лактовіт", що передбачає змішування сахарози, глюкози й бактеріального концентрату, який містить ацидофільну паличку, лактококи й ентерококи, з ячмінно-солодовим екстрактом (Патент України №22774, А 61 К 35/66, А 61 К 47/26, 1998).

Недоліком способу є введення до складу препарату ентерококів, що є умовно-патогенними мікроорганізмами й здатними викликати широкий спектр інфекційних ускладнень в організмі людей, особливо в дітей і осіб з імунodefіцитами. Ліофілізована форма препарату знижує його активність, а

додавання до складу препарату сахарози й глюкози обмежує галузі його застосування, зокрема визначає протипоказання для хворих цукровим діабетом і пацієнтів із сахаридазною недостатністю.

Відомо також спосіб одержання харчового продукту, що передбачає приготування ячмінного борошна, його ферментативний гідроліз, одержання водного екстракту, стерилізацію, охолодження екстракту ячмінного борошна й заквашування його спочатку культурою біфідобактерій виду *B. adolescentis*, або *B. bifidum*, або *B. longum*, культивування їх протягом 3-6 годин, а потім внесення закваски лактобацил виду *Lactobacillus acidophilus* і додаткове культивування протягом 18-21 годин (Патент України №26871, А 23 L 1/105, А 61 К 35/74, 1999).

Недоліком способу є трудомісткість і тривалість процесу готування середовища культивування й обмеження бактеріального складу препарату одним видом лактобацил і одним видом біфідобактерій, що знижує пробіотичну ефективність продукту.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання пробіотика, який передбачає культивування в середовищі, що містить суспензію зародків пшениці, мультикомпонентного симбіозу, який складається з лактобацил видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, біфідобактерій видів *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis* і *Bifidobacterium breve*, молочнокислих стрептококів видів *Lactococcus lactis* і *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, пропионовокислих бактерій виду *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* і оцтовокислих бактерій виду *Acetobacter aceti*, причому суспензія зародків пшениці готується на воді або на знежиреному молоці (Патент України 67422 А, А61К35/74, А23L1/172, 2004 - прототип).

Введення зародків пшениці до складу пробіотика дозволяє поліпшити умови для розвитку клітин пробіотичної мікрофлори за рахунок збагачення середовища ростостимулюючими й захисними факторами при одночасному доповненні складу препарату фізіологічно корисними компонентами, а використання в якості пробіотичної основи мультикомпонентного симбіозу фізіологічних бактерій сприяє розширенню спектра корисних властивостей препарату. Однак використання зародків пшениці у вигляді пластівців вимагає проведення додаткової операції для їхнього здрібнювання, що передбачає наявність додаткового устаткування й ускладнює виробництво пробіотика. Облігатний анаеробіоз пробіотичних бактерій, що використовуються, викликає необхідність застосування аеробних штамів виду *Acetobacter aceti* для поглинання кисню. Крім того, пробіотик має недостатньо високу резистентність до природних інгібіторів травного тракту, низьку гіпохолестеринемічну і антивірусну активність, а також низький термін зберігання. Висока концентрація в пробіотику вуглеводів, що зброджуються, - більше 7%, переважно сахарози, а при використанні молока - додатково й лактози, обмежує строк зберігання препарату

за рахунок швидкого збільшення вмісту кислоти й загибелі клітин. Пробиотик з високою концентрацією сахарози й лактози протипоказаний хворим з дисахаридною недостатністю, що часто розвивається на тлі порушеної мікробної екології травного тракту, а також хворим цукровим діабетом.

Завданням корисної моделі є створення способу одержання пробіотика, у якому шляхом використання суміші водної суспензії шроту зародків пшениці й гелю бентоніту як середовища для культивування клітин пробіотичного симбіозу, забезпечується підвищення строку зберігання пробіотика, концентрації життєдіяльних бактеріальних клітин, гіпохолестеринемічної і антивірусної активності, резистентності до жовчі й шлункового соку, а також розширення галузі застосування в медицині.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі одержання пробіотика, що передбачає культивування в середовищі, яке містить водну суспензію зародків пшениці, мультикомпонентного симбіозу, що складається з лактобацил видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, біфідобактерій видів *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis* і *Bifidobacterium breve*, молочнокислих стрептококів видів *Lactococcus lactis* і *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* і пропіоновокислих бактерій виду *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, згідно з корисною моделлю до складу середовища культивування вводять 5-6%-й гель бентоніту, зародки пшениці використовують у вигляді водної суспензії шроту з концентрацією сухих речовин 10-12%, при цьому водну суспензію шроту зародків пшениці змішують з гелем бентоніту у співвідношенні 1:1-1:2.

Пропонований спосіб передбачає введення до складу пробіотика шроту зародків пшениці.

Завдяки вмісту в шроті зародків пшениці до 30% рослинного білка, а також вуглеводів, поліненасичених жирних кислот, незамінних амінокислот, мінеральних компонентів і антиоксидантів, за рахунок його використання пробіотик збагачується даними цінними сполуками. Крім того, як показали спеціально проведені дослідження, зародки пшениці виявилися потужним стимулятором росту популяцій сахаролітичних анаеробних бактерій. При цьому пробіотичні бактерії всіх досліджуваних родів (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* і *Propionibacterium*) однаковою мірою активізуються зародками пшениці (Таблиця 1).

У присутності зародків пшениці помітно підвищується вуглеводферментуюча здатність мультисимбіоза, що виражається в збільшенні концентрації коротколанцюгових жирних кислот, які виконують в організмі людини широкий спектр фізіологічно цінних функцій (Таблиця 2).

Водна суспензія шроту зародків пшениці використовується як один з базових компонентів середовища культивування. Проведені дослідження встановили, що оптимальна концентрація шроту зародків пшениці при готуванні його водної суспензії становить 10-12%. Подальше збільшення концентрації понад 12% не приводить до помітних

змін концентрації клітин і ферментативної активності пробіотичної флори. Зменшення ж концентрації зародків пшениці нижче 10% приводить до зниження біомаси клітин і її біологічної активності.

Відповідно до пропонованого способу до складу пробіотика вводиться гель бентоніту, що становить другий базовий компонент середовища культивування.

Бентоніт - це природний глинистий матеріал, що відноситься до класу алюмосилікатів і характеризується високими іонообмінними, вологотримуючими й адсорбційними властивостями. Ці властивості бентоніту послужили підставою для використання його як основи для мазей, а також у косметології, бальнеології й інших галузях. Він відноситься до природних глин і йому властиві всі позитивні ефекти, об'єднані в поняття «глинотерапія».

Відомі способи одержання пробіотиків з використанням ентеросорбентів передбачають іммобілізацію пробіотичних клітин на поверхні часточок різних сорбентів (Патент РФ №2017486, МПК 6 А 61 К 31/00, 1994р.; Патент РФ №2164801, А 61 К 35/74, А 23 С 9/12, С 12 N 1/08, 2001). Оскільки у відомих способах використовуються сорбенти у вигляді досить великих часточок (до 100-500мкм), курси застосування таких препаратів не можуть бути тривалими, оскільки при тривалому застосуванні можливі побічні явища (запори, діарея, зниження в організмі рівня вітамінів, гормонів, деяких мікроелементів, корисних мікроорганізмів та ін. за рахунок їхнього зв'язування сорбентом), що може викликати серйозні метаболічні порушення. Застосування таких сорбентів, особливо активованого вугілля, протипоказано при ерозивно-виразкових ураженнях слизової оболонки стравоходу, шлунка, кишечника, а також при шлунково-кишкових кровотечах.

Використання як сорбента гелю бентоніту не вимагає проведення операції по іммобілізації бактеріальних клітин, при якій губиться значна частина клітин (до 50% від вихідної кількості).

У пропонованому способі як сорбент використовують гель бентоніту, що є натрієвою формою дрібнодисперсної фракції бентоніту, яку одержують із сухого природного бентоніту шляхом використання спеціальних методів диспергування й глибокого очищення від забруднюючих речовин і грубих часток. Він має високі адсорбційні властивості щодо вірусів, токсинів, радіонуклідів, важких металів і інших шкідливих сполук, однак не зв'язує бактеріальні клітини, тому не здатний порушувати мікробний баланс у біотопах і викликати метаболічні порушення.

При введенні гелю бентоніту до складу живильного середовища дрібнодисперсний сорбент зв'язується з поверхневими структурами бактеріальних клітин, що культивуються у даному середовищі, і покриває їх захисним шаром, захищаючи від впливу інгібуючих факторів: шлункової кислоти, жовчі, лізоциму, ферментів, токсичних радикалів кисню й ін. Бентоніт є цінним джерелом макро- і мікроелементів. Завдяки здатності активно зв'язувати воду, набухати й формувати гелі, бентоніт, на відміну від багатьох інших сорбентів, не здатний

впливати на стінку кишки, а навпроти, має обволікаючі властивості й сприяє зміцненню слизового бар'єра. За рахунок здатності нормалізувати кислотно-лужний баланс в організмі, бентоніт оптимізує перебіг біохімічних процесів. Пероральне застосування пробіотика, до складу якого входить дрібнодисперсний бентоніт, сприятиме оптимізації умов для успішної проліферації в біотопах людини фізіологічної анаеробної бактеріальної флори.

Перелічені особливості гелю бентоніту дозволяють використовувати комплексний препарат, одержаний пропонованим способом, тривалими курсами, у тому числі при лікуванні дітей раннього віку, без небезпеки розвитку негативних ефектів пробіотично-сорбційної терапії. У той же час виявлена в експериментах здатність гелю бентоніту активно адсорбувати ентеровіруси й зв'язувати холестерин дозволяє одержати пробіотик з високою антивірусною й гіпохолестеринемічною активністю, що актуально з урахуванням неухильного збільшення частоти захворюваності дітей і дорослих вірусними ентероколітами й збільшення числа хворих із серцево-судинною патологією, асоційованою з гіперхолестеринемією.

Як показали спеціально проведені дослідження, гель бентоніту має високі протекторні властивості щодо біомаси багатовидового симбіозу, що є бактеріальною основою пробіотика. У присутності гелю бентоніту, одержаного спеціальним способом, значно краще зберігається бактеріальний склад і активність пробіотичної біомаси, підвищується резистентність клітин до шлункового соку й жовчі (Таблиця 3).

Результати досліджень підтверджують, що строк зберігання пробіотика, концентрація життєдіяльних бактеріальних клітин, гіпохолестеринемічна й антивірусна активності, резистентність до жовчі й шлункового соку помітно збільшуються при комплексному використанні в складі середовища для культивування клітин пробіотичного симбіозу суспензії шроту зародків пшениці й гелю бентоніту.

Пропонований спосіб передбачає використання гелю бентоніту з концентрацією сухих речовин 5-6%. Зниження концентрації бентоніту в гелі менш 5% зменшує ефективність пробіотика за рахунок зниження в ньому концентрації життєдіяльних клітин анаеробних бактерій, а також зниження антивірусної й гіпохолестеринемічної активності й резистентності пробіотика до природних інгібіторів травного тракту. Збільшення концентрації бентоніту в гелі вище 6% недоцільно, оскільки не впливає на ефективність пробіотика, але ускладнює технологію одержання гелю.

Гель бентоніту змішують із водною суспензією шроту зародків пшениці в співвідношенні 1:1-1:2. Дане співвідношення є оптимальним для одержання пробіотика з високою концентрацією бактеріальних клітин, мінімальною концентрацією цукрів, що зброджуються, і широким спектром фізіологічно цінних властивостей. При розведенні суспензії шроту зародків пшениці у 2-3 рази гелем бентоніту відбувається відповідне зниження в ньому концентрації сахарози. Ця кількість цукру практично повністю ферментується сахаролітичними анаеробами з утворенням коротколанцюго-

вих жирних кислот (переважно молочної, оцтової й пропіонової). Пробіотик, одержаний запропонованим способом, може без обмежень використовуватися при лікуванні пацієнтів з дисахаридною недостатністю й хворих цукровим діабетом без небезпеки розвитку побічних реакцій. Зміна співвідношення у бік зменшення кількості гелю бентоніту приводить до зниження в препараті концентрації життєдіяльних клітин анаеробних бактерій, а також антивірусної й гіпохолестеринемічної активності, резистентності його до природних інгібіторів травного тракту, а також підвищує в препараті вміст сахарози, що може привести до побічних явищ при лікуванні хворих цукровим діабетом і пацієнтів з дисахаридною недостатністю. Зміна співвідношення у бік збільшення концентрації гелю бентоніту недоцільна, оскільки зайво розбавляє середовище й знижує концентрацію в ньому біологічно цінних сполук зародків пшениці, що може привести до зниження інтенсивності росту мікрофлори й подовження процесу культивування.

Спосіб здійснюють таким чином.

Для приготування поживного середовища шрот зародків пшениці змішують із водою з розрахунку одержання суспензії 10-12%-ої концентрації. Отриману суспензію змішують у співвідношенні 1:1-1:2 з 5-6%-м гелем бентоніту, стерилізують при температурі 121°C протягом 15-25 хвилин і охолоджують до температури 35-38°C. Підготовлене середовище інокують 3-5% культури симбіозу лактобацил, лактококів, біфідобактерій, стрептококів, пропіоновокислих бактерій.

Для створення мультикомпонентного симбіозу відібрані за пробіотичними властивостями штами нижчеперелічених видів з'єднують у наступних співвідношеннях:

<i>Bifidobacterium bifidum</i> -	4-5
<i>Bifidobacterium longum</i> -	6-7
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> -	3-4
<i>Bifidobacterium infantis</i> -	5-6
<i>Bifidobacterium breve</i> -	5-6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> -	0,5-1
<i>Lactobacillus casei</i> -	5-6
<i>Lactobacillus fermentum</i> -	4-5
<i>Lactobacillus plantarum</i> -	3-4
<i>Lactobacillus brevis</i> -	4-5
<i>Lactococcus lactis</i> -	1-2
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> -	1-2
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> -	6-7.

Отриманий комплекс штамів вносять у середовище на основі суспензії зародків пшениці й гелю бентоніту. Інокульоване молоко ферментують протягом 24-28 годин при температурі 35-37°C. Спеціально проведеними дослідженнями встановлено, що при з'єднанні штамів у зазначених співвідношеннях вони формують стійкий мультикомпонентний симбіоз. Отриманий симбіоз використовують як посівний матеріал для одержання інокуляту.

Після інокуляції середовище витримують при температурі 35-38°C протягом 20-24 годин.

Корисна модель пояснюється прикладами.

Приклад 1. 12кг сухого шроту зародків пшениці суспендують у 10л води, потім доводять об'єм водою до 100л. Приготовлену суспензію змішують із 100л 5%-го гелю бентоніту. Суміш стерилізують при температурі 121°C протягом 15 хвилин і охолоджують до 38°C. У підготовлені 200л середовища вносять 10кг інокуляту, приготовленого на основі симбіозу пробіотичних мікроорганізмів.

Для одержання симбіозу в поживне середовище на основі суспензії зародків пшениці й гелю бентоніту вносять культури наступних штамів у співвідношеннях:

<i>Bifidobacterium bifidum</i> IMB B-7113 -	4
<i>Bifidobacterium longum</i> IMB B-7150 -	6
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IMB B-7148 -	3
<i>Bifidobacterium infantis</i> IMB B-7147 -	5
<i>Bifidobacterium breve</i> IMB B-7132 -	5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ВКПМ B-5863 -	0,5
<i>Lactobacillus casei</i> ВКПМ B-5724 -	5
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1MB B-7133 -	4
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1MB B-7116 -	3
<i>Lactobacillus brevis</i> 1MB B-7114 -	4
<i>Lactococcus lactis</i> ВКПМ B-5725 -	1
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> ВКПМ B-5388 -	1
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> ВКПМ B-4544 -	6.

Інокульоване середовище витримують при температурі 35°C протягом 28 годин, потім здійснюють ще 3 пересівання в середовище ідентичного складу з періодичністю 2 доби.

Для приготування інокуляту до 10л стерильного середовища на основі 12%-ої водної суспензії шроту зародків пшениці з додаванням 5%-ного гелю бентоніту у співвідношенні 1:1 вносять 0,5л багатостамового симбіозу. Суміш перемішують і витримують при температурі 35°C протягом 20 годин.

Отриманий інокулят змішують із основною масою приготовленого середовища культивування й витримують при температурі 38°C протягом 20 годин.

Характеристика одержаного пробіотика представлена в Таблиці 4.

Приклад 2. 5кг сухого шроту зародків пшениці суспендують у 15л води, потім доводять об'єм водою до 50л. Приготовлену суспензію змішують із 100л 6%-го гелю бентоніту. Суміш стерилізують при температурі 121°C протягом 25 хвилин і охолоджують до температури 35°C. У підготовлене середовище (150л) вносять 6кг інокуляту, приготовленого на основі симбіозу пробіотичних мікроорганізмів.

Для одержання симбіозу в поживне середовище на основі суспензії зародків пшениці й гелю бентоніту вносять культури наступних штамів у співвідношенні:

<i>Bifidobacterium bifidum</i> ВКПМ B-5799 -	5
<i>Bifidobacterium longum</i> ВКПМ B-4557 -	7
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IMB B-7112 -	4
<i>Bifidobacterium infantis</i> IMB B-7131 -	6
<i>Bifidobacterium breve</i> IMB B-7132 -	6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ВКПМ B-5254 -	1
<i>Lactobacillus casei</i> ВКПМ B-3960 -	6
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1MB B-7133 -	5

<i>Lactobacillus plantarum</i> ВКПМ B-5494 -	4
<i>Lactobacillus brevis</i> IMB B-7114 -	5
<i>Lactococcus lactis</i> ВКПМ B-4543 -	2
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> ВКПМ B-4304 -	2
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> ВКПМ B-4544 -	7.

Інокульоване середовище витримують при температурі 35°C протягом 24 годин, потім здійснюють ще 3 пересівання в середовище ідентичного складу з періодичністю 2 доби.

Для приготування інокуляту до 6л стерильного середовища на основі 10%-ої водної суспензії шроту зародків пшениці з додаванням 6%-ного гелю бентоніту в співвідношенні 1:2 вносять 0,24л багатостамового симбіозу. Суміш перемішують і витримують при температурі 35°C протягом 24 годин.

Отриманий інокулят змішують із основною масою приготовленого середовища культивування й витримують при температурі 35°C протягом 24год.

Характеристика одержаного пробіотика представлена в Таблиці 4.

Приклад 3. 11кг сухого шроту зародків пшениці суспендують у 20л води, потім доводять об'єм водою до 100л. Приготовлену суспензію змішують із 150л 5,5%-го гелю бентоніту. Суміш стерилізують при температурі 121°C протягом 20 хвилин і охолоджують до температури 36°C. У підготовлені 250л середовища вносять 7,5кг інокуляту, приготовленого на основі симбіозу пробіотичних мікроорганізмів.

Для одержання симбіозу в поживне середовище на основі суспензії зародків пшениці й гелю бентоніту вносять культури наступних штамів у співвідношеннях:

<i>Bifidobacterium bifidum</i> IMB B-7113 -	4
<i>Bifidobacterium longum</i> ВКПМ B-4635 -	5
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IMB B-7148 -	2
<i>Bifidobacterium infantis</i> IMB B-7147 -	5
<i>Bifidobacterium breve</i> IMB B-7149 -	5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ВКПМ B-5863 -	1
<i>Lactobacillus casei</i> ВКПМ B-5724 -	6
<i>Lactobacillus fermentum</i> IMB B-7133 -	4
<i>Lactobacillus plantarum</i> IMB B-7116 -	4
<i>Lactobacillus brevis</i> IMB B-7114 -	4
<i>Lactococcus lactis</i> ВКПМ B-5387 -	1
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> ВКПМ B-4741 -	2
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> ВКПМ B-4544 -	6.

Інокульоване середовище витримують при температурі 36°C протягом 26 годин, потім здійснюють ще 3 пересівання в середовище ідентичного складу з періодичністю 2 доби.

Для приготування інокуляту в 7,5л стерильного середовища на основі 11%-ої водної суспензії шроту зародків пшениці з додаванням 5,5%-ного гелю бентоніту в співвідношенні 1,0:1,5 вносять 0,3л мультикомпонентного симбіозу. Суміш перемішують і витримують при температурі 36°C протягом 23 годин.

Одержаний інокулят змішують із основною масою приготовленого середовища культивування й

витримують при температурі 36°C протягом 22 годин.

Характеристика одержаного пробіотика представлена в Таблиці 4.

У Таблицях 1 і 2 представлені дані, що характеризують вплив різних концентрацій шроту зародків пшениці на ріст клітин пробіотичних бактерій і синтез ними коротколанцюгових жирних кислот, які є основним продуктом метаболізму сахаролітичних анаеробів і виконують широкий спектр фізіологічних функцій в організмі людини. Як свідчать наведені дані, одержаний продукт має потужний стимулюючий вплив на ріст популяцій і ферментативну активність всіх груп пробіотичних бактерій, що використовуються у пропонованому способі. Максимальний ступінь стимулювання спостерігається при вмісті в середовищі 10-12% шроту зародків пшениці.

У Таблиці 3 представлені дані, що характеризують розвиток клітин і синтез коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) мультикомпонентним симбіозом пробіотичних бактерій у середовищі на основі суспензії шроту зародків пшениці й гелю бен-

тоніту. Наведені дані свідчать про те, що введення до складу середовища культивування гелю бентоніту в пропонованій концентрації оптимізує умови для розвитку пробіотичної мікрофлори і її ферментативної діяльності.

У Таблиці 4 показаний вплив різних співвідношень суспензії шроту зародків пшениці й гелю бентоніту на окремі властивості пробіотика. Як видно із представлених даних, пропоноване співвідношення компонентів поживного середовища сприяє істотному підвищенню резистентності пробіотика до шлункового соку й жовчі, значно збільшує кількість клітин, що виживають при зберіганні, а також збільшує ступінь адсорбції ентеровірусів і гіпохлестеринемічну активність пробіотика.

У Таблиці 5 представлена порівняльна характеристика пробіотиків, одержаних пропонованим і відомим способами. Пропонований спосіб дозволяє одержати пробіотик, який відрізняється від прототипу більш широким складом фізіологічно корисних мікроорганізмів, збільшеною концентрацією біологічно активних клітин і підвищеною пробіотичною активністю.

Таблиця 1

Вплив шроту зародків пшениці на розвиток клітин пробіотичних бактерій
(концентрація клітин після 24-годинного культивування, ІgKYO/см³)

Концентрація шроту зародків пшениці в середовищі, %	Рід бактерій				
	Lactobacillus	Lactococcus	Bifidobacterium	Propionibacterium	Streptococcus
3	6,9±0,51	6,6±0,49	6,0±0,58	6,3±0,66	6,2±0,33
5	7,5±0,34	6,9±0,81	7,7±0,39	8,4±0,59	6,5±0,59
6	7,9±0,56	7,0±0,66	8,9±0,48	9,4±0,46	6,9±0,77
8	8,3±0,88	7,8±0,54	9,2±0,64	9,8±0,51	7,6±0,78
10	9,1±1,01	8,4±0,73	9,7±0,58	10,3±0,79	8,8±0,53
12	9,4±0,84	8,5±0,80	9,9±0,67	10,4±0,80	8,1±0,96
15	9,1±0,69	8,6±0,92	9,8±0,70	10,4±0,57	8,0±0,98

Таблиця 2

Вплив шроту зародків пшениці на синтез
коротколанцюгових жирних кислот мультикомпонентним симбіозом

Концентрація шроту зародків пшениці в середовищі, %	Концентрація кислоти в середовищі, %		
	молочна	оцтова	пропіонова
3	0,42±0,09	0,38±0,05	0,32±0,10
5	0,54±0,12	0,49±0,09	0,39±0,07
6	0,61±0,06	0,58±0,08	0,41 ±0,09
8	0,86±0,08	0,66±0,03	0,55±0,04
10	1,02±0,09	0,73±0,11	0,62±0,05
12	1,08±0,09	0,71±0,07	0,66±0,08
15	1,10±0,11	0,69±0,09	0,64±0,13

Таблиця 3

Розвиток клітин і синтез коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) мультикомпонентним симбіозом пробіотичних бактерій у середовищі на основі суспензії шроту зародків пшениці й гелю бентоніту

Показники	Співвідношення 10-12%-ої суспензії шроту зародків пшениці й 5-6%-го гелю бентоніту			
	1:0	1:1	1:2	1:3
Концентрація клітин після 24-годинного культивування в середовищі, IgKYO/cm ³ :				
Lactobacillus	9,4±1,01	10,8±0,93	10,9±0,71	8,0±0,94
Lactococcus	8,5±0,73	9,6±0,57	9,6±0,82	7,2±0,29
Bifidobacterium	9,7±0,58	11,1±1,03	11,0±0,88	7,9±0,74
Propionibacterium	10,3±0,80	10,8±1,13	10,7±0,48	8,8±1,23
Streptococcus	8,1±0,96	9,1±0,60	9,0±0,53	7,5±0,55
Синтез КЛЖК, %:				
молочна кислота	1,08±0,09	1,21±0,07	1,20±0,10	0,65±0,04
оцтова кислота	0,71±0,07	0,80±0,05	0,81±0,09	0,61±0,05
пропіонова кислота	0,66±0,08	0,77±0,11	0,78±0,10	0,50±0,08

Таблиця 4

Вплив співвідношення суспензії шроту зародків пшениці й гелю бентоніту на окремі властивості пробіотика

Показники	Співвідношення 10-12%-ої суспензії шроту зародків пшениці й 5-6%-го гелю бентоніту			
	1:0	1:1	1:2	1:3
Резистентність до шлункового соку, % клітин, що вижили, після 2-годинної витримки	55,8±6,2	71,1±5,5	71,4±4,7	73,0±5,3
Резистентність до жовчі, збереження життєздатності в середовищі з 30 % жовчі, %	42,4±3,9	69,9±3,3	72,0±4,5	72,8±5,1
Зниження концентрації холестерину, %	33,5±5,1	71,2±6,4	73,0±5,5	73,3±7,3
Зниження концентрації клітин через 3 міс. зберігання, %	43,9±5,5	21,7±3,3	23,2±4,1	20,5±2,3
Ступінь адсорбції вірусних часток, %	5,8±0,5	99,8±0,2	99,9±0,1	99,9±0,1

Таблиця 5

Порівняльна характеристика пробіотиків, одержаних пропонованим і відомим способом

Показники	Характеристика мультисимбіоза	
	Прототип	Пропонований спосіб
Склад середовища культивування	Суспензія зародків пшениці	Суспензія шроту зародків пшениці + гель бентоніту
Концентрація клітин, IgKYO/cm ³ :		
Bifidobacterium	9,7±0,66	11,3±0,34
Lactobacillus	9,4±0,26	10,8±0,41
Lactococcus	8,5±0,40	9,6±0,47
Propionibacterium	10,3±0,29	10,8±0,28
Синтез полісахаридів, %	2,56±0,52	2,99±0,38
Синтез органічних кислот, %:		
молочна	1,06±0,19	1,02±0,23
оцтова	0,73±0,11	0,98±0,15
пропіонова	0,66±0,15	0,73±0,10

Продовження таблиці 5

Накопичення біомаси клітин симбіозу, г/л	12,6±0,77	15,4±1,05
Зниження концентрації холестерину в середовищі культивування, %	34,1±4,2	73,8±5,9
Ступінь адсорбції вірусних часток, %	5,8±0,3	99,5±0,5
Зниження концентрації клітин через 3 міс зберігання, %:		
Bifidobacterium	44,7±4,3	20,8±3,9
Lactobacillus	51,0±5,0	23,2±1,7
Propionibacterium	39,8±3,9	19,7±2,3
Lactococcus	61,1±7,8	28,2±4,4
Збереження життєздатності в шлунково-му соку (рН 2,0), % клітин, що вижили, після 2-годинної витримки	54,5±5,1	71,4±6,3
Збереження життєздатності в середовищі з 30% жовчі, %	42,5±5,2	72,6±4,8