



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **46790** (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 "АПІБАКТ-ФОРТЕ"

1

(21) u200906284  
(22) 17.06.2009  
(24) 11.01.2010  
(46) 11.01.2010, Бюл.№ 1, 2010 р.  
(72) ШИРОБОКОВ ВОЛОДИМИР ПАВЛОВИЧ, ЯН-  
КОВСЬКИЙ ДМИТРО СТАНІСЛАВОВИЧ, ДИМЕНТ  
ГАЛИНА СЕМЕНІВНА  
(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДА-  
ЛЬНІСТЮ ФІРМА "О.Д. ПРОЛІСОК"  
(57) 1. Спосіб одержання пробіотика, що передба-  
чає спільне культивування полівидового мульти-  
симбіозу біфідобактерій видів *Bifidobacterium*  
*bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B.*  
*adolescentis*, лактобацил видів *Lactobacillus*  
*acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L.*  
*gasseri*, *L. fermentum*, молочнокислих стрептококів  
видів *Lactococcus lactis* і *Streptococcus salivarius*  
*ssp. thermophilus*, пропіоновокислих бактерій виду  
*Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii*, ку-  
льтивування клітин, відділення біомаси й дода-  
вання спиртового екстракту прополісу, який **відрі-**  
**зняється** тим, що в складі пробіотика з

2

біфідобактерій використовують штамми  
*Bifidobacterium bifidum* IMB B-7113, *Bifidobacterium*  
*longum* IMB B-7150, *Bifidobacterium adolescentis*  
IMB B-7112, *Bifidobacterium infantis* IMB B-7131,  
*Bifidobacterium breve* IMB B-7132, із пропіоновоки-  
слих бактерій додатково використовують штам  
*Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ B-5723,  
одержану біомасу змішують у співвідношенні 1:1-  
1:2 із протектором-ентеросорбентом, що являє  
собою 5-6 %-вий гель дрібнодисперсного бентоні-  
ту, а спиртовий екстракт прополісу додають із роз-  
рахунку одержання в готовому препараті прополі-  
су в концентрації 30-50 мг/мл.  
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що про-  
біотик виготовляють у вигляді суспензій для рек-  
тального, вагінального або зовнішнього застосу-  
вання, при цьому біомасу змішують із 5-6 %-вим  
гелем дрібнодисперсного бентоніту в співвідно-  
шенні 1:3-1:5, а спиртовий екстракт прополісу до-  
дають із розрахунку одержання в готовому препа-  
раті прополісу в концентрації 40-60 мг/мл.

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

У зв'язку з неухильним поширенням серед на-  
селення розладів у мікробній екологічній системі й  
захворювань, асоційованих з ними, зростаючий  
інтерес викликає розробка нових видів пробіотиків  
- препаратів на основі живої фізіологічної мікроф-  
лори, що сприяють оздоровленню природної сим-  
біотичної мікрофлори організму людини.

В галузі створення бактеріальних препаратів  
пробіотичної дії досить інтенсивно в останні роки  
розвивається напрямок, пов'язаний з конструю-  
ванням стійких мультикомпонентних симбіозів фі-  
зіологічних бактерій як основи пробіотиків. Раціо-  
нальне поєднання в одному препараті позитивних  
властивостей широкого комплексу видів пробіоти-  
чної мікрофлори, об'єднаних за допомогою спеці-

альних методів у багатофункціональні мультисим-  
біози, дозволяє одержати пробіотик із широким  
спектром корисних властивостей і підвищити його  
ефективність.

Відомий спосіб одержання бактеріального  
концентрату «Симбітер», що передбачає готуван-  
ня поживного середовища на молочній основі,  
ферментованій сполученням штамів *Streptococcus*  
*thermophilus* ВКПМ B-4741, *Lactococcus lactis*  
*subsp. cremoris* ВКПМ B-4541 і *Acetobacter aceti*  
ВКПМ B-5495, готування й внесення в поживне  
посівне середовище матеріалу, що містить біфідо-  
бактерії видів *Bifidobacterium longum* і  
*Bifidobacterium bifidum*, оцтовокислі бактерії видів  
*Acetobacter aceti* і *Acetobacter pasteurianus*, пропіо-  
новокислі бактерії видів *Propionibacterium*  
*freudenreichii* і *Propionibacterium acidipropionici*,

(13) **U**(11) **46790**(19) **UA**

молочнокислі бактерії при співвідношенні симбіозу молочнокислих і оцтовокислих бактерій із симбіозом біфідобактерій, пропіоновокислих і оцтовокислих бактерій, рівному 1:3 [Патент України № 10367, С12N1/20, А23С9/12, 1998].

Бактеріальний концентрат, одержаний відомим способом, характеризується високим вмістом життєдіяльних клітин пробіотичних бактерій і антагоністичною активністю щодо широкого спектра патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Однак у даному способі використовують обмежену кількість видів біфідобактерій і лактобацил, що не дає можливості підвищення активності концентрату за рахунок пробіотичних властивостей додаткових таксонів лактобацил і біфідобактерій. Крім того, у способі не використана можливість підвищення лікувально-профілактичної ефективності пробіотика за рахунок додаткового введення до його складу біологічно активних продуктів природного походження.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання пробіотика «Апібакт», що передбачає спільне культивування в молочному середовищі багатокomпонентної бактеріальної культури, яка містить біфідобактерії видів *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, молочнокислі стрептококи видів *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, лактобацили видів *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. brevis*, *L. fermentum*, пропіоновокислі бактерії виду *Propionibacterium freudenreichii* і оцтовокислі бактерії виду *Acetobacter acetii*, нарощування біомаси, відділення її від середовища культивування й додавання 0,5-2,5 % спиртового розчину прополісу [Патент України 55913, С12N1/20, А61К35/74, 2003 – прототип].

Спосіб дозволяє одержати пробіотик з антагоністичною активністю за рахунок використання екстракту прополісу й введення до складу препарату штаму з виду *Lactobacillus fermentum* з лізоцимсинтезуючою здатністю. Прополіс широко використовується в медицині як природний антисептик, імуномодулятор і антиоксидант, що відрізняється антибактеріальною, антивірусною й антигрибковою активністю. Однак спосіб не дозволяє підвищити концентрацію в препараті прополісу вище 25мг/мл через його здатність пригнічувати ріст бактеріальної флори, що обмежує можливість подальшого збільшення антагоністичної активності препарату, пробіотик має недостатню резистентність до природних інгібіторів травного тракту, низьку гіпохолестеринемічну й антивірусну здатність.

Завданням корисної моделі є створення способу одержання пробіотика «Апібакт-форте», у якому шляхом введення з біфідобактерій штамів *Bifidobacterium bifidum* IMB B-7113, *Bifidobacterium longum* IMB B-7150, *Bifidobacterium adolescentis* IMB B-7112, *Bifidobacterium infantis* IMB B-7131, *Bifidobacterium breve* IMB B-7132, а із пропіоновокислих бактерій додаткового використання штаму *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ B-5723, змішування біомаси з гелем дрібнодисперсного бентоніту й використання спиртового екстракту прополісу з розрахунку одержання в готовому пре-

параті прополісу в концентрації 30-50 мг/мл, забезпечується підвищення резистентності пробіотика до природних інгібіторів травного тракту, антагоністичної, гіпохолестеринемічної і антивірусної здатностей, збільшення його терміну зберігання.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі одержання пробіотика «Апібакт-форте», що передбачає спільне культивування полівидового мультисимбіоза біфідобактерій видів *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, лактобацил видів *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, молочнокислих стрептококів видів *Lactococcus lactis* і *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, пропіоновокислих бактерій виду *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, культивування клітин, відділення біомаси й додавання спиртового розчину прополісу, відповідно до корисної моделі, у складі пробіотика з біфідобактерій використовують штами *Bifidobacterium bifidum* IMB B-7113, *Bifidobacterium longum* IMB B-7150, *Bifidobacterium adolescentis* IMB B-7112, *Bifidobacterium infantis* IMB B-7131, *Bifidobacterium breve* IMB B-7132, із пропіоновокислих бактерій додатково використовують штаму *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ B-5723, отриману біомасу змішують у співвідношенні 1:1-1:2 із протектором-ентеросорбентом, що представляє собою 5-6 %-ний гель дрібнодисперсного бентоніту, а спиртовий екстракт прополісу додають із розрахунку одержання в готовому препараті прополісу в концентрації 30-50 мг/мл.

Крім того, пробіотик можна виготовляти у вигляді суспензій для ректального, вагінального або зовнішнього застосування, при цьому біомасу змішують із 5-6 %-ним гелем бентоніту в співвідношенні 1:3-1:5, а спиртовий екстракт прополісу додають із розрахунку одержання в готовому препараті прополісу в концентрації 40-60 мг/мл.

Пропонований спосіб передбачає використання в складі пробіотика з біфідобактерій штамів: *Bifidobacterium bifidum* IMB B-7113, *Bifidobacterium longum* IMB B-7150, *Bifidobacterium adolescentis* IMB B-7112, *Bifidobacterium infantis* IMB B-7131 і *Bifidobacterium breve* IMB B-7132, а із пропіоновокислих бактерій - додатково штаму *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ B-5723. Властивості штамів представлені в таблиці 1.

Штами біфідо- і пропіоновокислих бактерій, які використовують у складі пробіотика, ізолювані із кишечника здорових людей. За допомогою спеціальних селективних методів підвищена резистентність ізолюваних штамів до природних інгібіторів травного тракту (шлункового соку, жовчі, фенолу, хлористого натрію, травних ферментів, лізоциму). За рахунок здатності до синтезу лізоциму, коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) і високої щільності клітинних популяцій, що формуються, штами активно пригнічують ріст широкого спектра патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Завдяки цим властивостям, використані бактерії здатні зберігати життєздатність при транзиті через проксимальні ділянки травного тракту, досягати в активному стані біотопу товстої кишки й реалізувати свій пробіотичний потенціал.

Крім того, додатково уведено до складу пробіотика штами біфідобактерій і пропіоновокислих бактерій відрізняються здатністю знижувати в середовищі культивування вміст холестерину. Причому, проведені дослідження встановили, що синтез лізоциму й гіпохолестеринемічна здатність значно підсилюються в консорціумі цих мікроорганізмів, а також проявляють синергізм у мультикомпонентному симбіозі з лактобацилами й молочнокислими стрептококами (табл. 2).

Використання в складі пробіотика нових штамів біфідобактерій і пропіоновокислих бактерій дозволяють підвищити його резистентність до природних інгібіторів травного тракту, антагоністичну активність щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, здатність знижувати вміст холестерину.

Пропонований спосіб передбачає також змішування отриманої після культивування клітин багатовидового симбіозу в поживному середовищі біомаси з 5-6 %-ним гелем бентоніту. Бентоніт - це природний глинистий матеріал, що відноситься до класу алюмосилікатів і має високі вологоутримуючі, іонообмінні й адсорбційні властивості. Ці властивості бентоніту стали 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 із використанням ентеросорбентів передбачають іммобілізацію пробіотичних клітин на поверхні часточок різних сорбентів [Патент РФ № 2017486, МПК 6 А61К31/00, 1994; Патент РФ № 2164801, А61К35/74, А23С9/12, С12Н1/08, 2001]. Оскільки у відомих способах використовуються сорбенти у вигляді досить великих часточок (до 100-500 мкм), 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 сорбенту гелю бентоніту не вимагає проведення операції щодо іммобілізації бактеріальних клітин, при якій губиться значна частина клітин (до 50 % від вихідної кількості).

У пропонованому способі як сорбент використовуютьгель бентоніту, що являє собою натрієву форму 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, холестерину, токсинів, радіонуклідів, важких металів і інших шкідливих сполук, однак не зв'язує бактеріальні клітини, тому не зда-

тний порушувати мікробний баланс у біотопах і викликати метаболічні порушення.

При змішуванні гелю бентоніту з біомасою пробіотичних бактерій дрібнодисперсний сорбент зв'язується з поверхневими структурами бактеріальних клітин 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 використання пробіотика, до складу якого входить дрібнодисперсний бентоніт, сприяє оптимізації умов для успішної проліферації в біотопах людини фізіологічної анаеробної бактеріальної флори.

Наведені особливості гелю бентоніту дозволяють застосовувати одержаний пропонованим способом комплексний препарат тривалими курсами 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, який одержують спеціальним способом, значно краще зберігається бактеріальний склад і активність пробіотичної біомаси, підвищується резистентність клітин до шлункового соку й жовчі, збільшуються гіпохолестеринемічна й антиентеровірусна активності (табл. 3).

Результати досліджень свідчать, що антагоністична активність пробіотика, концентрація життєдіяльних бактеріальних клітин, гіпохолестеринемічна й антивірусна активності, резистентність до жовчі й шлункового соку, а також термін зберігання препарату помітно збільшуються при комплексному використанні спеціального штамового складу пробіотичного симбіозу, а також гелю бентоніту й прополісу в пропонованих концентраціях.

Пропонований спосіб передбачає використання 5-6 %-го гелю бентоніту. Зниження концентрації бентоніту менш 5 % призводить до зменшення протекторної дії гелю бентоніту щодо клітин пробіотичної мікрофлори й адсорбції холестерину й вірусів. Збільшення концентрації бентоніту в суспензії понад 6 % недоцільно, оскільки не сприяє помітному збільшенню захисних властивостей щодо мікрофлори пробіотика, гіпохолестеринеміч-

ної і антиентероїрусної активності, але приводить до зайвого ущільнення консистенції препарату.

При одержанні пробіотики для перорального застосування клітинну біомасу змішують із 5-6 %-ним гелем бентоніту в співвідношенні 1:1-1:2. Дане співвідношення є найбільш оптимальним.

Зміна співвідношення у бік зменшення частки гелю бентоніту приводить до скорочення терміну зберігання пробіотики, зниження резистентності до природних інгібіторів травного тракту й гіпохлестеринемічної активності. Збільшення кількості гелю бентоніту недоцільно, оскільки не сприяє поліпшенню пробіотичних властивостей і збільшенню терміну зберігання, але призводить до зниження концентрації клітин у пробіотику і його активності.

При одержанні пробіотиків для ректального, інтравагінального й зовнішнього застосування клітинну біомасу змішують із 5-6 %-ним гелем бентоніту в співвідношенні 1:3-1:5. Збільшення концентрації гелю бентоніту сприяє більш ефективній санації товстокишкового й вагінального біотопів або уражених ділянок шкіри й більш швидкому відновленню норми.

За рахунок зв'язування флавоноїдів гелем бентоніту збільшується резистентність до них бактеріальних клітин, що дозволяє збільшити концентрацію прополісу в препараті для перорального застосування до 30-50 мг/мл. Дана концентрація прополісу забезпечує синергізм позитивних властивостей прополісу, гелю бентоніту й мікрофлори й не чинить інгібуючого впливу на життєдіяльність бактеріальних клітин. Зменшення концентрації прополісу нижче 30 мг/мл знижує антагоністичну активність пробіотики щодо патогенних і умовно-патогенних бактерій і грибів. Підвищення концентрації прополісу понад 50 мг/мл недоцільно, оскільки перевищує фізіологічну дозу для використання *per os*.

При готуванні суспензій для ректального, вагінального й зовнішнього застосування спиртовий екстракт прополісу додають із розрахунку одержання в готовому препараті прополісу в концентрації 40-60 мг/мл з метою збільшення його антимікробної активності.

Спосіб здійснюють таким чином.

Як середовище культивування використовують молоко із вмістом сухих речовин 5-6 %, у яке додають 10 % молока, гідролізованого панкреатином, або 5 % гідролізату казеїну й 1-2 % натрію лимоннокислого тризаміщеного. Середовище стерилізують, охолоджують до температури культивування, інокують пробіотичним симбіозом і ферментують для накопичення біомаси, яку відокремлюють від культуральної рідини центрифугуванням.

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

Для створення симбіозу культури нижчеперелічених штамів з'єднують у наступних співвідношеннях:

<i>Bifidobacterium bifidum</i> IMB B-7113 -	6
<i>Bifidobacterium longum</i> IMB B-7150 -	6
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> IMB	4

B-7112 -	
<i>Bifidobacterium infantis</i> IMB B-7131 -	6
<i>Bifidobacterium breve</i> IMB B-7132 -	6
<i>Lactobacillus fermentum</i> IMB B-7133 -	4
<i>Lactobacillus salivarius</i> IMB B-7134 -	2
<i>Lactobacillus helveticus</i> IMB B-7115 -	2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ВКПМ B-5863-	1
<i>Lactobacillus casei</i> ВКПМ B-5724 -	5
<i>Lactobacillus brevis</i> IMB B-7114 -	4
<i>Lactobacillus plantarum</i> IMB B-7116 -	6
<i>Lactobacillus gasseri</i> IMB B-7135 -	3
<i>Lactococcus lactis</i> ВКПМ B-5725 -	1
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp.	
<i>thermophilus</i> ВКПМ B-5388 -	2
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp.	
<i>shermanii</i> ВКПМ B-4544 -	7
<i>P. acidipropionici</i> ВКПМ B-5723 -	6.

Одержаний комплекс штамів вносять у стерильне знежирене молоко із вмістом сухих речовин 10 %. Інокульоване молоко ферментують протягом 15-18 годин при температурі 36-37°C. Спеціально проведеними дослідженнями встановлено, що при з'єднанні штамів у зазначених співвідношеннях вони формують стійкий мультикомпонентний симбіоз. Отриманий симбіоз використовують як посівний матеріал при одержанні інокуляту.

Для одержання гелю дрібнодисперсного бентоніту сухий бентоніт диспергують у воді з додаванням вуглекислого натрію, багаторазово центрифугують для відділення забруднюючих речовин і грубих часток бентоніту, внаслідок чого одержують дрібнодисперсну фракцію бентоніту, яку суспендують у бідистильованій воді до одержання 5-6 %-ної суспензії гелеподібної консистенції, а потім стерилізують.

Біомасу клітин, відділену від культуральної рідини, змішують у співвідношенні 1:1-1:2 з 5-6 %-ним гелем бентоніту й спиртовим екстрактом прополісу із розрахунку одержання в готовому препараті прополісу в концентрації 30-50 мг/мл.

Корисна модель пояснюється прикладами.

Приклад 1. Спосіб одержання пробіотики «Апібакт-форте» у вигляді рідкого бактеріального концентрату для перорального застосування.

Для приготування інокуляту до 25 л стерильного знежиреного молока із 10 % сухих речовин вносять 1,25 л культури мультикомпонентного симбіозу молочнокислих, пропіоновокислих і біфідобактерій наступного штамового складу:

<i>Bifidobacterium bifidum</i> IMB B-7113 -	6
<i>Bifidobacterium longum</i> IMB B-7150 -	6
<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 fermentum</i> IMB B-7133 -	4
<i>Lactobacillus salivarius</i> IMB B-7134 -	2
<i>Lactobacillus helveticus</i> IMB B-7115 -	2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ВКПМ	
B -5863-	1
<i>Lactobacillus casei</i> ВКПМ B-5724 -	5
<i>Lactobacillus brevis</i> IMB B-7114 -	4
<i>Lactobacillus plantarum</i> IMB B-7116 -	6
<i>Lactobacillus gasseri</i> IMB B-7135 -	3
<i>Lactococcus lactis</i> ВКПМ B-5725 -	1

Streptococcus salivarius ssp. thermophilus ВКПМ В-5388 -	2
Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii ВКПМ В-4544 -	7
P. acidipropionici ВКПМ В-5723 -	6.

Інокульоване молоко ферментують протягом 18 годин при температурі 36°C. Готовий інокулят має густу в'язку консистенцію; титруєма кислотність 95°Т, рН 4,4, концентрація живих клітин -  $1,3 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>.

Для приготування середовища культивування 25 кг сухого знежиреного молока розчиняють в 100 л водопровідної води. До розчиненого молока доливають воду (до 500 л) з розрахунку одержання відновленого молока із вмістом сухих речовин 5 %. Відновлене молоко стерилізують при температурі 121°C із витримкою протягом 25 хвилин. Охолоджують до температури 37°C і вносять 5 % інокулята. Одночасно з інокулятом уводять 10 % стерильного панкреатичного гідролізата молока й 1 % натрію лимоннокислого тризаміщеного (у вигляді стерильного 50 %-го розчину). Процес культивування проводять протягом 22 годин при температурі 37°C і рН 6,5. Концентрація життєдіяльних клітин наприкінці культивування становить  $1,3 \times 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>. Клітинну біомасу відокремлюють центрифугуванням і змішують її в співвідношенні 1:1 з 5 %-ною суспензією гелю бентоніту й спиртовим екстрактом прополісу із розрахунку одержання в готовому препараті прополісу в концентрації 30 мг/мл.

Для одержання гелю дрібнодисперсного бентоніту сухий бентоніт диспергують у воді з додаванням вуглекислого натрію, багаторазово центрифугують для відділення забруднюючих речовин і грубих часток бентоніту, внаслідок чого одержують дрібнодисперсну фракцію бентоніту, яку суспендують у бідистильованій воді до одержання 5 %-ної суспензії гелеподібної консистенції, а потім стерилізують.

Характеристика одержаного пробіотику наведена в табл. 4.

Приклад 2. Одержання пробіотику «Апібакт-форте» у вигляді рідкого бактеріального концентрату для перорального застосування.

Спосіб здійснюють відповідно до прикладу 1 за винятком того, що біомасу пробіотичних клітин змішують із 6 %-ною суспензією гелю бентоніту в співвідношенні 1:2 і спиртовий екстракт прополісу додають з розрахунку одержання в готовому препараті прополісу в концентрації 50 мг/мл.

Характеристика одержаного пробіотику наведена в табл. 4.

Приклад 3. Одержання пробіотику «Апібакт-форте» у вигляді рідкого бактеріального концентрату для перорального застосування.

Спосіб здійснюють відповідно до прикладу 1 за винятком того, що біомасу пробіотичних клітин змішують із 5,5 %-ною суспензією гелю бентоніту в

співвідношенні 1:1,5 і спиртовим екстрактом прополісу з розрахунку одержання в готовому препараті прополісу в концентрації 40 мг/мл. Характеристика одержаного пробіотику наведена в табл. 4.

Приклад 4. Одержання пробіотику «Апібакт-форте» у формі суспензії для ректального застосування.

Біомасу пробіотичних бактерій, одержану відповідно до прикладу 1, змішують із 6 %-ним гелем бентоніту в співвідношенні 1:5 і спиртовим екстрактом прополісу з розрахунку одержання в готовому препараті прополісу в концентрації 40 мг/мл.

Характеристика одержаного пробіотику наведена в табл. 5.

Приклад 5. Одержання пробіотику «Апібакт-форте» у вигляді суспензії для вагінального застосування.

Спосіб здійснюють відповідно до прикладу 4 за винятком того, що біомасу змішують зі стерильним 5 %-ним гелем бентоніту в співвідношенні 1:4, у суспензії встановлюють рН 5,0-5,5, а спиртовий екстракт прополісу додають із розрахунку одержання в готовому препараті прополісу в концентрації 50 мг/мл.

Характеристика одержаного пробіотику наведена в табл. 5.

Приклад 6. Одержання пробіотику «Апібакт-форте» у формі суспензії для зовнішнього застосування.

Спосіб здійснюють відповідно до прикладу 4 за винятком того, що клітинну біомасу змішують зі стерильним 5,5 %-м гелем бентоніту в співвідношенні 1:3 і спиртовим екстрактом прополісу з розрахунку одержання в готовому препараті прополісу в концентрації 60 мг/мл.

Характеристика одержаного пробіотику представлена в табл. 5.

У таблиці 4 представлена порівняльна характеристика пробіотиків для перорального застосування, одержаних відомим і пропонованим способами. Як свідчать наведені дані, пропонований спосіб у порівнянні з відомим дозволяє поліпшити якість пробіотику за рахунок підвищення антагоністичної активності, стійкості до природних інгібіторів травного тракту, гіпохолестеринемічної і антивірусної здатності, а також підвищити його термін зберігання.

У таблиці 5 представлена характеристика пробіотиків у формі суспензій для ректального, інтравагінального й зовнішнього застосування. Пробиотики характеризуються високою концентрацією життєдіяльних клітин фізіологічних бактерій і їхніх метаболітів, що доповнюють пробіотичний ефект (КЛЖК, лізоцим, екзополісахариди).

Таким чином, пропонований спосіб дозволяє одержувати ефективні пробіотики для перорального, ректального, вагінального й зовнішнього застосування.

Таблиця 1

Характеристика штамів біфідобактерій і пропіоновокислих бактерій,  
які використовуються у складі пробіотики

Показники	Характеристика штамів					
	B. bifidum IMB B-7113	B. longum IMB B-7150	B. adolescentis IMB B-7112	B. infantis IMB B-7131	B. breve IMB B-7132	P. acidipropionici ВКПМ B-5723
Концентрація клітин че- рез 24 години культиву- вання, не менше, КУО/см <sup>3</sup>	5,0×10 <sup>8</sup>	1,0×10 <sup>9</sup>	7,0×10 <sup>8</sup>	1,0×10 <sup>8</sup>	1,0×10 <sup>8</sup>	3,0×10 <sup>9</sup>
Синтез КЛЖК: молочна оцтова пропіонова	0,41±0,08 0,88±0,05 -	0,32±0,02 0,69±0,04 -	0,53±0,05 1,17±0,09 -	0,37±0,08 0,66±0,08 -	0,29±0,08 0,60±0,08 -	0,09±0,01 0,68±0,03 1,21±0,07
Синтез екзо- полісахаридів, %	0-0,1	0-0,3	0-0,5	0	0	2,2-2,5
Резистентність до шлун- кового соку, % клітин, що вижили, після 2-годинної витримки	58,5±4,12	60,8±2,97	53,6±3,71	49,2±3,68	54,9±2,25	66,1±6,27
Резистентність до жовчі, збереження життєздатно- сті в середовищі з 30 % жовчі, %	52,1±4,23	50,8±5,43	49,3±5,07	49,1±4,25	53,5±4,06	59,0±4,88
Резистентність до фено- лу, збереження життєзда- тності в середовищі з 0,4 % фенолу, %	61,7±7,23	69,8±2,98	66,5±7,04	59,8±5,37	60,4±3,09	62,7±7,31
Резистентність до хлори- стого натрію, збереження життєздатності в середо- вищі з 4 % хлористого натрію, %	95,4±3,08	98,1±1,50	92,9±6,53	77,5±5,60	86,5±5,21	95,8±3,75
Антагоністична активність (зона затримки росту па- тогенних і умовно- патогенних мікроорганізмів), мм:						
S. aureus 209	8	4	5	4	10	12
P. mirabilis 403	14	-	6	-	6	8
P. vulgaris 52	7	8	9	7	16	11
K. pneumoniae 5055	10	9	10	-	8	6
C. albicans lb	12	8	11	8	12	14
S. sonnei 115	9	6	-	-	-	-
E. coli 055	-	-	8	4	8	5
E. coli 0111	7	-	6	-	12	11
P. aeruginosa 9027	15	11	10	6	18	7
E. cloacae 16	-	-	8	11	10	9
C. freundii 39	-	6	-	10	6	12
S. typhimurium 156	10	-	-	10	6	11
Y. enterocolitica 15	11	8	12	12	10	14
M. morganii 76	8	6	10	6	10	15
E. aerogenes 312	-	14	13	-	8	-
E. faecalis 15	9	18	12	-	11	8
S. epidermidis 37	-	16	11	12	9	11

Таблиця 2

Синтез лізоциму й гіпохолестеринемічна активність штамів біфідобактерій і пропіоновокислих бактерій, їхнього консорціуму й мультикомпонентного симбіозу

Мікроорганізми	Синтез лізоциму, зона лізису тест-культури ( <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698), мм	Зниження концентрації холестерину в середовищі культивування, %
<i>B. bifidum</i> IMB B-7113	4,0±0,4	37,8±5,1
<i>B. longum</i> IMB B-7150	3,2±0,1	30,7±9,5
<i>B. adolescentis</i> IMB B-7112	3,8±0,2	33,4±8,7
<i>B. infantis</i> IMB B-7131	2,4±0,3	38,0±6,5
<i>B. breve</i> IMB B-7132	2,0±0,1	22,9±3,1
<i>P. acidipropionici</i> ВКПМ B-5723	5,2±0,5	42,3±5,5
Консорціум біфідобактерій і пропіоновокислих бактерій	9,3±0,7	47,1±5,9
Мультикомпонентний симбіоз	14,2±0,8	52,6±5,1

Таблиця 3

Вплив гелю бентоніту на пробіотичні властивості біомаси

Показники	Співвідношення біомаси з 5-6 %-м гелем бентоніту				
	1:0	1:1	1:1,5	1:2	1:3
Резистентність до шлункового соку, % клітин, що вижили після 2-годинної витримки	66,1±6,27	78,1±7,22	79,8±9,01	79,9±6,54	79,8±6,97
Резистентність до жовчі, збереження життєздатності в середовищі з 30 % жовчі, %	61,1±4,97	78,5±8,31	79,2±5,58	79,8±7,19	79,7±6,92
Зниження концентрації холестерину, %	52,8±5,23	73,4±8,33	73,9±8,51	74,2±9,03	74,4±6,73
Зниження концентрації клітин через 3 міс зберігання, %	40,6±4,2	20,5±2,8	20,1±3,4	20,5±2,9	20,4±3,2
Ступінь адсорбції вірусних часток, %	5±0,5	99,9±0,1	99,9±0,1	99,9±0,1	99,9±0,1

Таблиця 4

Порівняльна характеристика пробіотиків для перорального застосування, одержаних відомим і пропонованим способами

Показники	Характеристика пробіотиків			
	За прототипом	За прикладом 1	За прикладом 2	За прикладом 3
1	2	3	4	5
Кількість живих клітин пробіотичної мікрофлори, КУО/см <sup>3</sup>				
<i>Bifidobacterium</i>	1,0×10 <sup>12</sup>	1,2×10 <sup>12</sup>	1,3×10 <sup>12</sup>	2,0×10 <sup>12</sup>
<i>Lactobacillus</i>	1,2×10 <sup>12</sup>	4,7×10 <sup>12</sup>	4,5×10 <sup>12</sup>	4,4×10 <sup>12</sup>
<i>Propionibacterium</i>	4,0×10 <sup>11</sup>	5,2×10 <sup>11</sup>	5,5×10 <sup>11</sup>	5,2×10 <sup>11</sup>
<i>Lactococcus</i>	1,0×10 <sup>12</sup>	3,2×10 <sup>12</sup>	2,7×10 <sup>12</sup>	2,8×10 <sup>12</sup>
Збереження життєздатності в шлунковому соку (pH 2,0), % клітин, що вижили, після 2-годинної витримки	54,5±5,1	71,4±6,3	72,0±4,8	70,7±6,6
Збереження життєздатності в середовищі з 30 % жовчі, %	42,5±5,2	72,6±4,8	73,9±5,7	71,3±4,9
Зниження концентрації холестерину в середовищі культивування, %	34,1±4,2	73,8±5,9	72,5±7,1	73,0±8,3
Ступінь адсорбції вірусних часток, %	5±0,3	99,5±0,5	99,8±0,2	99,8±0,2
Лізоцимсинтезуюча активність, зона лізису тест-культури, мм	10,5±0,3	13,9±0,5	13,8±0,6	13,5±0,9

Продовження таблиці 4				
1	2	3	4	5
Концентрація КЛЖК, %:				
молочна	0,79±0,20	1,05±0,16	1,10±0,19	1,08±0,21
оцтова	0,58±0,15	0,78±0,10	0,81±0,17	0,80±0,19
пропіонова	0,34±0,10	0,67±0,11	0,66±0,10	0,64±0,08
Концентрація екзополісахаридів, %	2,5-2,6	3,3±0,27	3,4±0,31	3,4±0,31
Зниження концентрації клітин через 3 місяці зберігання, %:				
<i>Bifidobacterium</i>	44,7±4,3	20,8±3,9	21,1±2,5	20,6±5,2
<i>Lactobacillus</i>	51,0±5,0	23,2±1,7	22,6±3,0	24,0±3,1
<i>Propionibacterium</i>	39,8±3,9	19,7±2,3	20,4±4,9	18,8±1,3
<i>Lactococcus</i>	61,1±7,8	28,2±4,4	31,3±3,3	21,6±3,5
Антагоністична активність (зона затримки росту патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів), мм:				
<i>S. aureus</i> 209	6,8±0,7	22,2±0,6	21,9±2,1	22,3±1,7
<i>P. mirabilis</i> 403	6,5±0,3	19,4±0,9	19,5±0,4	19,9±1,6
<i>P. vulgaris</i> 52	7,4±0,9	20,4±1,2	20,6±2,3	20,1±1,5
<i>K. pneumoniae</i> 5055	9,1±0,7	16,1±0,9	16,9±1,1	16,5±1,1
<i>C. albicans</i> 1b	5,3±0,6	15,4±1,4	14,1±0,5	15,1±1,2
<i>S. sonnei</i> 115	8,7±1,2	16,9±1,8	16,3±0,7	16,6±1,5
<i>E. coli</i> 055	5,9±0,2	20,2±1,3	21,2±1,8	20,8±2,4
<i>E. coli</i> 0111	7,4±0,5	18,9±0,9	19,5±1,4	18,7±0,8
<i>P. aeruginosa</i> 9027	8,8±0,4	28,3±0,8	27,9±2,2	27,7±1,9
<i>E. cloacae</i> 16	5,7±0,3	19,5±1,0	19,6±1,4	19,0±1,4
<i>C. freundii</i> 39	4,9±0,5	22,8±0,9	22,3±2,0	22,6±1,2
<i>S. typhimurium</i> 156	8,3±0,3	21,6±1,5	21,7±1,6	21,2±1,1
<i>Y. enterocolitica</i> 15	10,1±0,4	19,2±1,2	19,9±1,3	19,5±1,0
<i>M. morganii</i> 76	8,0±0,6	18,9±2,2	19,0±1,8	19,2±1,7
<i>E. aerogenes</i> 312	5,5±0,3	13,8±0,9	14,3±1,3	13,7±1,0
<i>E. faecalis</i> 15	9,0±0,4	18,1±0,7	18,6±1,5	18,5±2,5
<i>E. epidermidis</i> 37	7,8±0,5	22,6±1,4	21,7±1,9	21,9±2,1

Таблиця 5

Характеристика пробіотиків у формі суспензії для ректального, вагінального й зовнішнього застосування

Показники	Характеристика пробіотиків		
	За прикладом 4	За прикладом 5	За прикладом 6
Концентрація клітин, КУО/см <sup>3</sup> :			
<i>Bifidobacterium</i>	3,3×10 <sup>11</sup>	2,8×10 <sup>11</sup>	1,2×10 <sup>11</sup>
<i>Lactobacillus</i>	5,6×10 <sup>10</sup>	6,2×10 <sup>10</sup>	2,6×10 <sup>10</sup>
<i>Propionibacterium</i>	1,5×10 <sup>10</sup>	1,8×10 <sup>10</sup>	7,1×10 <sup>10</sup>
<i>Lactococcus</i>	2,7×10 <sup>10</sup>	3,0×10 <sup>10</sup>	1,3×10 <sup>10</sup>
Зниження концентрації клітин через 3 місяці зберігання, %	19,4±2,0	21,2±3,4	24,6±4,1
Лізоцимсинтезуюча активність, зона лізису тест-культури, мм	11,0±0,7	11,3±0,5	11,1±0,4
Концентрація екзополісахаридів, %	3,0±0,21	2,9±0,25	2,7±0,31
Концентрація КЛЖК, %:			
молочна	0,66±0,14	0,82±0,22	1,06±0,17
оцтова	0,43±0,09	0,61±0,17	0,73±0,15
пропіонова	0,30±0,05	0,33±0,13	0,42±0,07



