



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015115871/10, 28.04.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.04.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.04.2015

(43) Дата публикации заявки: 20.11.2016 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 27.12.2016 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EP 2848681 A1, 18.03.2015. RU 2471864 C1, 10.01.2013. RU 2432392 C1, 27.10.2011. СОЛОВЬЕВА И.В. и др. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* // Вестник Нижегородского Университета им. Н.И.Лобачевского, 2010, Т. 2, N 2, стр. 462-468. ШЕНДЕРОВ Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том I: Микрофлора человека и животных и ее функции. М.: Издательство ГРАНТЪ, 1998, с. 20-27.

Адрес для переписки:

650056, г. Кемерово, б-р Строителей, 47,
КемТИПП, патентовед Сырцева А.П.

(72) Автор(ы):

Дышлоков Любовь Сергеевна (RU),
Сухих Станислав Алексеевич (RU),
Милентьева Ирина Сергеевна (RU),
Просеков Александр Юрьевич (RU),
Козлова Оксана Васильевна (RU),
Шишин Михаил Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Кемеровский технологический
институт пищевой промышленности
(университет)" (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА С ПРОБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологии и может быть использовано для создания функциональных продуктов питания. Способ получения бактериального препарата с пробиотической активностью на основе представителей нормальной кишечной микрофлоры человека, включающий выделение бифидобактерий и лактобактерий из фекалий человека, культивирование их на жидкой питательной среде в анаэробных условиях при температуре 37°C с последующим центрифугированием и выделением бактериального препарата. Используют фекалии взрослого здорового субъекта, который в течение 3 месяцев перед выделением не принимает ни

антибиотические, ни пробиотические препараты, из фекалий дополнительно выделяют стрептококки и энтерококки. Культивирование осуществляют на среде, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт - 5,0; папаиновый перевар соевой муки - 10,0; натрия гидрофосфат - 1,0; Твин-80 - 0,2; аммония цитрат - 1,0; цистеина гидрохлорид - 0,5; магния хлорид - 0,5; кислота аскорбиновая - 0,5; глюкоза - 10,0; мясной экстракт - 20,0; марганца сульфат - 0,05; натрия азид - 0,2. Либо культивирование может быть осуществлено на среде, содержащей (г/л): протеозопептон - 15,0; папаиновый перевар соевой муки - 10,0; натрия гидрофосфат - 1,5; Твин-80 - 1,0; аммония цитрат - 2,0; цистеина

гидрохлорид - 1,0; магния хлорид - 0,5; кислота аскорбиновая - 0,2; натрия хлорид - 2,5; глюкоза - 10,0; мясной экстракт - 10,0; натрия азид - 0,2. Либо культивирование может быть осуществлено на среде, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт - 10,0; панкреатический гидролизат казеина - 20,0; натрия гидрофосфат - 2,5; Твин-80 - 0,7; лактоза - 5,0; аммония цитрат - 0,5; цистеина гидрохлорид - 1,0; магния хлорид - 1,0; кислота аскорбиновая - 0,1; натрия ацетат - 0,2; натрия хлорид - 3,0;

глюкоза - 5,0; мясной экстракт - 15,0; марганца сульфат - 0,1; натрия азид - 0,2. Культивирование осуществляют до достижения концентрации микроорганизмов $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Способ позволяет получить пробиотический препарат с антагонистическими свойствами по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, а также антиоксидантной, гепатопротекторной и противоопухолевой активностями. 2 табл., 3 пр.

RU 2 6 0 5 6 2 6 C 2

RU 2 6 0 5 6 2 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)*A61K* 35/744 (2015.01)*A61K* 35/745 (2015.01)*A61K* 35/747 (2015.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2015115871/10, 28.04.2015**(24) Effective date for property rights:
28.04.2015

Priority:

(22) Date of filing: **28.04.2015**(43) Application published: **20.11.2016** Bull. № 32(45) Date of publication: **27.12.2016** Bull. № 36

Mail address:

**650056, g. Kemerovo, b-r Stroitelej, 47, KemTIPP,
patentoved Syrtseva A.P.**

(72) Inventor(s):

**Dyshljuk Ljubov Sergeevna (RU),
Sukhikh Stanislav Alekseevich (RU),
Milenteva Irina Sergeevna (RU),
Prosekov Aleksandr Jurevich (RU),
Kozlova Oksana Vasilevna (RU),
SHishin Mikhail Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Kemerovskij tekhnologicheskij
institut pishchevoj promyshlennosti (universitet)"
(RU)**(54) **METHOD OF PRODUCING BACTERIAL PREPARATION WITH PROBIOTIC ACTIVITY**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology.

SUBSTANCE: invention relates to microbiology and can be used for manufacturing of functional food products. Method of producing bacterial preparation with probiotic activity based on species of normal human intestinal microflora, involving extraction of bifidobacteria and lactobacilli from human excrements, their cultivation on liquid nutrient medium in anaerobic conditions at temperature 37 °C with subsequent centrifugation and separation of bacterial preparation. Excrements of adult healthy subject are used, who does not take antibiotic or probiotic preparations for 3 months before extraction, streptococci and enterococci are additionally extracted from excrements. Culturing is carried out on medium containing (g/l): yeast extract - 5.0; papain overcook of soya flour - 10.0; sodium hydrophosphate - 1.0; Tween-80 - 0.2; ammonium citrate - 1.0; cysteine hydrochloride - 0.5; magnesium chloride - 0.5; ascorbic acid - 0.5; glucose - 10.0; meat extract - 20.0; manganese sulphate - 0.05; sodium azide - 0.2. Or cultivation can be performed on medium

containing (g/l): proteose peptone - 15.0; papain overcook of soya flour - 10.0; sodium hydrophosphate - 1.5; Tween-80 - 1.0; ammonium citrate - 2.0; cysteine hydrochloride - 1.0; magnesium chloride - 0.5; ascorbic acid - 0.2; sodium chloride - 2.5; glucose - 10.0; meat extract - 10.0; sodium azide - 0.2. Or cultivation can be performed on medium containing (g/l): yeast extract - 10.0; pancreatic hydrolysate of casein - 20.0; sodium hydrophosphate - 2.5; Tween-80 - 0.7; lactose - 5.0; ammonium citrate - 0.5; cysteine hydrochloride - 1.0; magnesium chloride - 1.0; ascorbic acid - 0.1; sodium acetate - 0.2; sodium chloride - 3.0; glucose - 5.0; meat extract - 15.0; manganese sulphate - 0.1; sodium azide - 0.2. Cultivation is performed till concentration of microorganisms reaches $1.0 \cdot 10^8$ COE/ml.

EFFECT: method enables to obtain probiotic preparation with antagonistic properties towards pathogenic and opportunistic pathogens, as well as antioxidant, hepatoprotective and anticancer activity.

1 cl, 2 tbl, 3 ex

Изобретение относится к микробиологии и биотехнологии, в частности изобретение касается бактериального препарата с пробиотической активностью, и может быть использовано для создания функциональных продуктов питания для онкологических больных в период реабилитации.

5 Пробиотики - это живые физиологически функциональные пищевые ингредиенты в виде полезных для человека (непатогенных и нетоксикогенных) живых микроорганизмов, обеспечивающие при систематическом употреблении человеком в пищу непосредственно в виде препаратов или биологически активных добавок (БАД) к пище либо в составе пищевых продуктов благоприятное воздействие на организм
10 человека в результате нормализации состава и/или повышения биологической активности нормальной микрофлоры кишечника (Бондаренко, В.М. Пробиотики и механизмы их лечебного действия / В.М. Бондаренко, Р.П. Чуприна, Ж.И. Аладышева, Т.В. Мацулевич // Эксперим. и клин. Гастроэнтерол. - 2004. - №3. - С. 83-87).

Систематическое использование пробиотиков в питании повышает колонизационную
15 резистентность кишечника, усиливает иммунитет, предотвращает развитие аллергических осложнений, оказывает гипохолестеринемический, противоопухолевый и другие положительные эффекты на человека. Исходя из этого, создание продуктов функционального питания на основе пробиотических штаммов микроорганизмов, обладающих специфическим позитивным действием на организм человека,
20 рассматривают как стратегическое направление альтернативной медицины, направленное на поддержание и восстановление здоровья человека (Янковский, Д.С. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов человека // Здоровье женщины. - 2003. - №4(16). - С. 145-158).

Пробиотики являются неотъемлемой частью диеты онкологических больных.
25 Цитостатическая и лучевая терапия, применяемая у больных онкологическими заболеваниями, имеющая небольшой порог между лечебным и токсическим дозами, приводит к повреждению гастроинтестинального тракта, его слизистых оболочек, являющихся наиболее чувствительными к повреждающему воздействию, поскольку являются активно пролиферирующими тканями организма, а также к нарушению в
30 микробной флоре кишечника, также являющейся быстро пролиферирующим сообществом. Происходит гибель нормальной кишечной микрофлоры, расширяется спектр потенциально-патогенных микроорганизмов, изменяется видовой и количественный состав. Все это усиливает повреждение гастроинтестинального тракта и печени, что диктует необходимость поиска и включения в комплекс реабилитационных
35 мероприятий препаратов, направленных на восстановление нормального микробиоценоза кишечника, что может быть достигнуто включением в рацион питания продуктов, обогащенных пробиотиками.

В настоящее время известно большое число пробиотических препаратов для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний человека и животных.
40 Такой препарат, как правило, содержит клетки бактерий, остатки культуральной жидкости, жиры, белки, лактозу, камедь и другие добавки. Технология их получения включает в себя, как правило, подготовку раствора или взвеси биомассы микроорганизмов, введение в нее специальных добавок, сублимационное высушивание и получение готового продукта. Условия процесса и состав композиций определяются
45 особенностями используемых микроорганизмов и характером поставленной задачи.

Так, известны препарат и способ его получения (RU, патент 2080795, опубл. 10.06.1997). Данный препарат содержит живые клетки *Lactobacillus acidophilus*, желатин, сахарозу, обезжиренное молоко, воду, остатки культуральной жидкости. Способ его

получения предусматривает культивирование бактерий *Lactobacillus acidophilus* в жидкой питательной среде, введение защитной среды, содержащей желатин, сахарозу, обезжиренное молоко, замораживание при температуре -30-(-)35°C в течение 18-12 часов, сублимационную сушку в течение 45-52 часов.

Недостатком препарата является относительно невысокая эффективность, ограниченная область применения, а также невозможность длительного хранения.

В настоящее время одним из перспективных направлений для обеспечения оздоравливающего воздействия на ЖКТ является применение препаратов, содержащих несколько штаммов микроорганизмов, обладающих синергетическим действием.

Известен препарат (RU, патент 2160992, опубл. 27.12.2000), содержащий жизнеспособные клетки 2-х симбиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus*, остатки культуральной жидкости и вспомогательные вещества - желатин, сахарозу, обезжиренное молоко. Способ его получения предусматривает культивирование бактерий в жидкой питательной среде, введение защитной среды, содержащей желатин, сахарозу и обезжиренное молоко, замораживание при температуре минус 25-30°C в течение 2-3 часов и сублимационную сушку в течение 45-48 часов.

Недостатком препарата является его недостаточная эффективность в отношении повышения резистентности организма к неблагоприятным условиям внешней среды, недостаточная термоустойчивость.

Известен (RU, патент 2471864, опубл. 10.01.2013) пробиотический препарат против вирусных и бактериальных инфекций «токсиспорин», содержащий смесь биомассы штаммов бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3679 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ - 4161 в споровой форме с титром не менее 10^9 спор/г, и глауконит. Оптимальное содержание спор бактерий *Bacillus subtilis* в их смеси со спорами *Bacillus licheniformis* составляет 50%. Препарат получают раздельным культивированием вышеоговоренных бактерий в глюкозо-мелассной среде при pH - 6,8-7,0, получают смесь спор в количестве 0,1-1 мас. % от массы препарата и смешивают ее с глауконитом до содержания КОЕ не менее 10^9 спор/г. Для приготовления препарата используют штамм бактерий *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-4161.

Недостатком известного способа можно признать относительно узкий спектр воздействия на организм.

Известен (ЕР, патент 2848681, опубл. 18.03.2015) способ получения бактериального препарата с пробиотической активностью, согласно которому проводят выделение бифидобактерий и лактобактерий из фекалий человека, культивирование их на жидкой питательной среде в анаэробных условиях при температуре 37°C с последующим центрифугированием и выделением бактериального препарата.

Указанный источник информации принят в качестве ближайшего аналога.

Недостатком известного способа следует признать недостаточную пробиотическую активность, обусловленную низкой концентрацией микроорганизмов в готовом продукте.

Техническая задача, решаемая использованием разработанного способа, состоит в расширении ассортимента пробиотических препаратов.

Технический результат, достигаемый при реализации разработанного способа, состоит в получении пробиотического препарата с выраженными антагонистическими свойствами по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, а также антиоксидантной, гепатопротекторной и противоопухолевой активностью.

Для достижения указанного технического результата предложено использовать разработанный способ получения бактериального препарата с пробиотической

активностью, согласно которому проводят выделение бифидобактерий и лактобактерий из фекалий человека, культивирование их на жидкой питательной среде в анаэробных условиях при температуре 37°C с последующим центрифугированием и выделением бактериального препарата, причем используют фекалии взрослого здорового субъекта,

который в течение 3 месяцев перед выделением не принимает ни антибиотические, ни пробиотические препараты, из фекалий дополнительно выделяют стрептококки и энтерококки, культивирование осуществляют до достижения концентрации микроорганизмов $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, либо на среде 1, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт - 5,0; папаиновый перевар соевой муки - 10,0; натрия гидрофосфат - 1,0; Твин-80 - 0,2; аммония цитрат - 1,0; цистеина гидрохлорид - 0,5; магния хлорид - 0,5; кислота аскорбиновая - 0,5; глюкоза - 10,0; мясной экстракт - 20,0; марганца сульфат - 0,05; натрия азид - 0,2, либо на среде 2, содержащей (г/л): протеозопептон - 15,0; папаиновый перевар соевой муки - 10,0; натрия гидрофосфат - 1,5; Твин-80 - 1,0; аммония цитрат - 2,0; цистеина гидрохлорид - 1,0; магния хлорид - 0,5; кислота аскорбиновая - 0,2; натрия хлорид - 2,5; глюкоза - 10,0; мясной экстракт - 10,0; натрия азид - 0,2, либо на среде 3, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт - 10,0; панкреатический гидролизат казеина - 20,0; натрия гидрофосфат - 2,5; Твин-80 - 0,7; лактоза - 5,0; аммония цитрат - 0,5; цистеина гидрохлорид - 1,0; магния хлорид - 1,0; кислота аскорбиновая - 0,1; натрия ацетат - 0,2; натрия хлорид - 3,0; глюкоза - 5,0; мясной экстракт - 15,0; марганца сульфат - 0,1; натрия азид - 0,2.

Разработанный способ реализуют следующим образом.

Источником выделения пробиотических бактерий являются фекалии взрослого здорового субъекта, который в течение 3 месяцев перед выделением не принимает ни антибиотические, ни пробиотические препараты. Критерием включения для здоровых лиц является отсутствие острых заболеваний, очагов гнойно-воспалительных инфекций, сахарного диабета, онкопатологии, первичного и вторичного иммунодефицита.

Подготовку содержимого кишечника проводят следующим образом: 1 г фекалий вносят в 9 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия (NaCl) и тщательно суспендируют путем встряхивания в течение 20-30 минут. Затем отстаивают и через 1 час из надосадочной жидкости готовят разведения в изотоническом растворе хлорида натрия 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 . Из разведений 10^3 , 10^4 , 10^5 делают посев бактериологической петлей на питательные среды.

Для первичного выделения бактерий используют бифидум-среду, среду МРС, селективный агар для стрептококков, среду Сланец-Бартли для энтерококков. Культивирование бактерий осуществляют на агаризованных питательных средах в анаэробном режиме при температуре 37°C в течение 24,0 часов. С суммарных газонов на чашках Петри с видимым ростом микроорганизмов проводят истощающие рассевы. Выделенные микроорганизмы культивируют в жидких питательных средах в анаэробном режиме при температуре 37°C в течение 1,20-24,0 часов до достижения концентрации микроорганизмов $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

По окончании культивирования биомассу отделяют от культуральной жидкости центрифугированием при 8000 об/мин в течение 20 минут.

Культуры микроорганизмов, выделенных из желудочно-кишечного тракта человека, хранятся в сублимационно-высушенном состоянии в ампулах при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ не менее 24 месяцев. Параметры сублимационной сушки бактериального препарата: температура замораживания в защитной среде, содержащей 5% глицерина, -25°C при продолжительности 90 минут; температура сушки 30°C ; продолжительность сушки 6

часов; тепловая нагрузка 5,45 кВт/м²; остаточное давление 0,6-0,8 кПа; толщина слоя сушки 2 мм.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1

1 г фекалий вносят в 9 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия (NaCl) и тщательно суспендируют путем встряхивания в течение 20-30 минут. Затем отстаивают и через 1 час из надосадочной жидкости готовят разведения в изотоническом растворе хлорида натрия 10², 10³, 10⁴, 10⁵. Из разведений 10³, 10⁴, 10⁵ делают посев бактериологической петлей на питательную среду.

Бактерии культивируют в анаэробном режиме при температуре 37°C в течение 1,20-24,0 часов до достижения концентрации микроорганизмов 1,0·10⁸ КОЕ/мл в жидкой питательной среде состава (г/л): дрожжевой экстракт - 5,0; папаиновый перевар соевой муки - 10,0; натрия гидрофосфат - 1,0; Твин-80 - 0,2; аммония цитрат - 1,0; цистеина гидрохлорид - 0,5; магния хлорид - 0,5; кислота аскорбиновая - 0,5; глюкоза - 10,0; мясной экстракт - 20,0; марганца сульфат - 0,05; натрия азид - 0,2; pH среды - 6,8±0,2.

По окончании культивирования биомассу отделяют от культуральной жидкости центрифугированием при 8000 об/мин в течение 20 минут.

Пробиотические бактерии подвергают сублимационной сушке при следующих параметрах: температура замораживания в защитной среде, содержащей 5% глицерина, -25°C при продолжительности 90 минут; температура сушки 30°C; продолжительность сушки 6 часов; тепловая нагрузка 5,45 кВт/м²; остаточное давление 0,6-0,8 кПа; толщина слоя сушки 2 мм.

Сублимационно-высушенный бактериальный препарат хранят в ампулах при температуре 4±2°C не менее 24 месяцев.

Для полученного бактериального препарата определяли ингибиторную активность в отношении широкого круга грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов диффузионным методом на твердой питательной среде (таблица 1).

Для предлагаемого бактериального препарата с пробиотической активностью в экспериментах *in vitro* установлена антиоксидантная, гепатопротекторная, противоопухолевая активность.

Антиоксидантные свойства бактериального препарата изучали в соответствии с методом, описанным Сао, et al (1995) путем определения степени защиты от окисления β-фикоэритрином по измерению относительной флуоресценции при 595 нм и при 535 нм в течение 70-минутного периода.

Гепатопротекторные свойства бактериального препарата оценивали по его ингибирующему эффекту на образование β-глюкуронидазы тест-штаммом *E. coli* HGU-3.

Противоопухолевые свойства бактериального препарата тестировали *in vitro* на раковых клеточных линиях: лимфомы Беркитта ЛБР2, рака предстательной железы человека DU 145, рака молочной железы человека MDAMB-231 и MCF7, гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, рака головного мозга U-87, рака поджелудочной железы человека PANC-1.

Количество живых раковых клеток по окончании периода инкубации с бактериальным препаратом определяли с помощью МТТ-колориметрического метода, основанного на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ) до фиолетовых кристаллов формазана, растворимых в диметилсульфоксиде.

Результаты определения антиоксидантной активности бактериального препарата представлены на фиг. 1.

Результаты определения гепатопротекторной активности бактериального препарата представлены на фиг. 2.

5 Результаты определения противоопухолевой активности бактериального препарата представлены в таблице 2.

Пример 2

1 г фекалий вносят в 9 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия (NaCl) и тщательно суспендируют путем встряхивания в течение 20-30 минут. Затем
10 отстаивают и через 1 час из надосадочной жидкости готовят разведения в изотоническом растворе хлорида натрия 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 . Из разведений 10^3 , 10^4 , 10^5 делают посев бактериологической петлей на питательную среду.

Бактерии культивируют в анаэробном режиме при температуре 37°C в течение 1,20-
15 24,0 часов до достижения концентрации микроорганизмов $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл в жидкой питательной среде состава (г/л): протеозопептон - 15,0; папаиновый перевар соевой муки - 10,0; натрия гидрофосфат - 1,5; Твин-80 - 1,0; аммония цитрат - 2,0; цистеина гидрохлорид - 1,0; магния хлорид - 0,5; кислота аскорбиновая - 0,2; натрия хлорид - 2,5; глюкоза - 10,0; мясной экстракт - 10,0; натрия азид - 0,2; pH среды - $7,0 \pm 0,2$.

20 По окончании культивирования биомассу отделяют от культуральной жидкости центрифугированием при 8000 об/мин в течение 20 минут.

Пробиотические бактерии подвергают сублимационной сушке при параметрах, указанных в примере 1. Сублимационно-высушенный бактериальный препарат хранят в ампулах при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ не менее 24 месяцев.

25 Для полученного бактериального препарата определяли ингибиторную активность в отношении широкого круга грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов диффузионным методом на твердой питательной среде (таблица 1).

Для предлагаемого бактериального препарата с пробиотической активностью в экспериментах *in vitro* установлена антиоксидантная, гепатопротекторная,
30 противоопухолевая активность.

Результаты определения антиоксидантной активности бактериального препарата представлены на фиг. 1.

Результаты определения гепатопротекторной активности бактериального препарата представлены на фиг. 2.

35 Результаты определения противоопухолевой активности бактериального препарата представлены в таблице 2.

Пример 3

1 г фекалий вносят в 9 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия (NaCl) и тщательно суспендируют путем встряхивания в течение 20-30 минут. Затем
40 отстаивают и через 1 час из надосадочной жидкости готовят разведения в изотоническом растворе хлорида натрия 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 . Из разведений 10^3 , 10^4 , 10^5 делают посев бактериологической петлей на питательную среду.

Бактерии культивируют в анаэробном режиме при температуре 37°C в течение 1,20-
45 24,0 часов до достижения концентрации микроорганизмов $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл в жидкой питательной среде состава (г/л): дрожжевой экстракт - 10,0; панкреатический гидролизат казеина - 20,0; натрия гидрофосфат - 2,5; Твин-80 - 0,7; лактоза - 5,0; аммония цитрат - 0,5; цистеина гидрохлорид - 1,0; магния хлорид - 1,0; кислота аскорбиновая - 0,1; натрия ацетат - 0,2; натрия хлорид - 3,0; глюкоза - 5,0; мясной экстракт - 15,0; марганца сульфат

- 0,1; натрия азид - 0,2; pH среды - $7,0 \pm 0,2$.

По окончании культивирования биомассу отделяют от культуральной жидкости центрифугированием при 8000 об/мин в течение 20 минут.

5 Пробиотические бактерии подвергают сублимационной сушке при параметрах, указанных в примере 1. Сублимационно-высушенный бактериальный препарат хранят в ампулах при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ не менее 24 месяцев.

Для полученного бактериального препарата определяли ингибиторную активность в отношении широкого круга грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов диффузионным методом на твердой питательной среде (таблица 1).

10 Для предлагаемого бактериального препарата с пробиотической активностью в экспериментах *in vitro* установлена антиоксидантная, гепатопротекторная, противоопухолевая активность.

Результаты определения антиоксидантной активности бактериального препарата представлены на фиг. 1.

15 Результаты определения гепатопротекторной активности бактериального препарата представлены на фиг. 2.

Результаты определения противоопухолевой активности бактериального препарата представлены в таблице 2.

20 Фиг. 1 позволяет сделать вывод о том, что бактериальные препараты с пробиотической активностью, полученные по трем описанным примерам, характеризуются выраженными антиоксидантными свойствами (величина тролокс-эквивалента/ 10^9 клеток находится в диапазоне от 1346 до 2728). При этом максимальная антиоксидантная активность обнаружена у бактериального препарата по примеру 2 (2728).

25 Из фиг. 2 следует, что бактериальные препараты с пробиотической активностью, полученные по трем описанным примерам, проявляют гепатопротекторные свойства (ингибирующий эффект на образование β -глюкуронидазы *E. coli* HGU-3 составляет от 75,0 до 83,0%). Наиболее ярко гепатопротекторные свойства проявляются у бактериального препарата по примеру 3 (83,0%).

30 Из таблицы 2 следует, что бактериальные препараты с пробиотической активностью, полученные по трем описанным примерам, характеризуются противоопухолевой активностью по отношению к тестируемым клеточным линиям, однако наиболее выраженные противоопухолевые свойства характерны для бактериального препарата по примеру 1. Бактериальный препарат по примеру 1 в концентрации 10^7 КОЕ/мл наибольшую активность проявляет в отношении клеточных линий гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 (выживаемость 16,4%) и рака молочной железы человека MDAMB-231 (выживаемость 19,6%).

40 Таким образом, заявляемый способ получения бактериального препарата с пробиотической активностью позволяет получить продукт с выраженными антагонистическими свойствами по отношению к широкому кругу патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также антиоксидантной, гепатопротекторной и противоопухолевой активностью.

45 Предлагаемый бактериальный препарат с пробиотической активностью может быть использован для создания функциональных продуктов питания для онкологических больных в период реабилитации.

Табл. 1

Диаметр зон ингибирования роста тест- культур, мм	Выделенные образцы		
	Пример 1	Пример 2	Пример 3
<i>Escherichia coli</i> B-6954 -	34,4±1,7	31,1±1,6	29,3±1,5
<i>Bacillus</i> <i>fastidiosus</i> B- 5651 +	28,2±1,4	35,0±1,8	23,1±1,2
<i>Bacillus subtilis</i> B-1325	15,6±0,8	14,0±0,7	17,2±0,9
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> B- 3502 -	33,0±1,7	32,4±1,6	31,9±1,6
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 9027 -	25,6±1,3	32,1±1,6	30,5±1,5
<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> B- 8404 +	27,8±1,4	32,6±1,6	29,9±1,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	30,2±1,5	33,5±1,7	33,6±1,7
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 25923 +	34,5±1,7	33,0±1,7	35,0±1,8

Табл. 2 – Результаты определения противоопухолевой активности бактериального препарата

Выживаемость клеток, %, при разной концентрации микроорганизмов, КОЕ/мл	Клеточная линия						
	ЛБР2	DU 145	MDAMB-231	MCF7	HepG2	U-87	PANC-1
Бактериальный препарат по примеру 1							
10^5	79,4±4,0	72,3±3,6	73,7±3,7	77,1±3,9	64,3±3,2	63,5±3,2	61,8±3,1
10^7	34,7±1,7	24,7±1,2	19,6±1,0	22,1±1,1	16,4±0,8	20,8±1,0	24,6±1,2
Бактериальный препарат по примеру 2							
10^5	111,5±5,6	98,7±4,9	72,3±3,6	80,9±4,0	89,9±4,5	91,4±4,6	96,8±4,8
10^7	54,7±2,7	49,0±2,4	34,0±1,7	36,3±1,8	36,8±1,8	46,4±2,3	51,3±2,6
Бактериальный препарат по примеру 3							
10^5	90,6±4,5	95,3±4,8	81,4±4,1	97,2±4,9	117,8±5,9	99,8±5,0	88,5±4,4
10^7	48,2±2,4	54,7±2,7	40,6±2,0	48,4±2,4	59,9±3,0	56,5±2,8	39,1±1,9

Формула изобретения

Способ получения бактериального препарата с пробиотической активностью на основе представителей нормальной кишечной микрофлоры человека, включающий выделение бифидобактерий и лактобактерий из фекалий человека, культивирование их на жидкой питательной среде в анаэробных условиях при температуре 37°C с последующим центрифугированием и выделением бактериального препарата, отличающийся тем, что используют фекалии взрослого здорового субъекта, который в течение 3 месяцев перед выделением не принимает ни антибиотические, ни пробиотические препараты, из фекалий дополнительно выделяют стрептококки и энтерококки, культивирование осуществляют до достижения концентрации микроорганизмов $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, а культивирование осуществляют либо на среде 1, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт - 5,0; папаиновый перевар соевой муки - 10,0; натрия гидрофосфат - 1,0; Твин-80 - 0,2; аммония цитрат - 1,0; цистеина гидрохлорид - 0,5; магния хлорид - 0,5; кислота аскорбиновая - 0,5; глюкоза - 10,0; мясной экстракт - 20,0; марганца сульфат - 0,05; натрия азид - 0,2, либо на среде 2, содержащей (г/л): протеозопептон - 15,0; папаиновый перевар соевой муки - 10,0; натрия гидрофосфат - 1,5; Твин-80 - 1,0; аммония цитрат - 2,0; цистеина гидрохлорид - 1,0; магния хлорид - 0,5; кислота аскорбиновая - 0,2; натрия хлорид - 2,5; глюкоза - 10,0; мясной экстракт - 10,0; натрия азид - 0,2, либо на среде 3, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт - 10,0; панкреатический гидролизат казеина - 20,0; натрия гидрофосфат - 2,5; Твин-80 - 0,7; лактоза - 5,0; аммония цитрат - 0,5; цистеина гидрохлорид - 1,0; магния хлорид - 1,0; кислота аскорбиновая - 0,1; натрия ацетат - 0,2; натрия хлорид - 3,0; глюкоза - 5,0; мясной экстракт - 15,0; марганца сульфат - 0,1; натрия азид - 0,2.