



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 92518

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 35/00

A61K 39/108

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОМАСИ КОЛІБАКТЕРІЙ ДЛЯ БАКТЕРІЄВМІСНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА КОМПОЗИЦІЯ СУХОЇ БІОМАСИ КОЛІБАКТЕРІЙ

1

(21) а200812101

(22) 13.10.2008

(24) 10.11.2010

(46) 10.11.2010, Бюл.№ 21, 2010 р.

(72) ШАЛАЄВ ЕДУАРД ДМИТРОВИЧ

(73) ШАЛАЄВ ЕДУАРД ДМИТРОВИЧ

(56) UA 75232 C2, 15.03.06.

UA 77827 C2, 15.01.07.

UA 2492 U, 17.05.04.

SU 907067, 23.02.02.

RU 2004105687 A, 10.08.04.

RU 2164801 C1, 10.04.01.

RU 2257408 C1, 27.07.05.U

UZ 5272 B, 30.08.02.

UA 2493 U, 17.05.04.

UA 51006 A, 15.11.02.

UA 56385 A, 15.05.03.

UA 24770 A, 06.10.98.

(57) 1. Спосіб одержання біомаси колібактерій для бактерієвмісних препаратів, що включає вирощування біомаси колібактерій у живильному середовищі, змішування біомаси з захисним середовищем, концентрування та висушування біомаси, який **відрізняється** тим, що вирощування біомаси колібактерій проводять під тиском не вище 0,03 атм., вирощену біомасу охолоджують до темпера-

2

тури 6...9 °C і змішують з захисним середовищем, а концентрування здійснюють після змішування біомаси з захисним середовищем при заморожуванні та ліофільному висушуванні за режимом: заморожування при температурі мінус (60...80) °C протягом 20-25 годин, підвищення до температури 30-37 °C протягом 75-85 годин.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як захисне середовище, з яким змішують вирощену біомасу, використовують желатину та сахарозу при наступному співвідношенні компонентів, % мас.:

желатина	3...5
сахароза	8...10
біомаса	решта.

3. Композиція сухої біомаси колібактерій, що включає суху біомасу колібактерій, змішану з захисним середовищем, яка **відрізняється** тим, що зазначена біомаса колібактерій отримана способом за п. 1 і додатково містить стеарат магнію та лактозу при наступному співвідношенні компонентів, % мас.:

біомаса колібактерій	4...15
стеарат магнію	1...8
лактоза	решта.

Винахід відноситься до біотехнології, зокрема, до одержання біомаси колібактерій (*Escherichia coli*), і може бути використаний для отримання активних препаратів з мікробів-антагоністів, що застосовуються в медицині як пробіотичні лікарські засоби та у харчовій промисловості як активні біологічні добавки.

Відомий спосіб одержання біомаси колібактерій включає вирощування біомаси у живильному середовищі на основі гідролізату казеїну при температурі 37±0,5°C і тиску не більш як 0,3атм., зокрема 0,2-0,3атм., та концентрування нарощеної біомаси (UA, патент №75232, опубл. 15.03.2006) [1]. Недоліком відомого способу є швидка втрата активності при зберіганні біомаси колібактерій.

Найбільш близьким є спосіб одержання біомаси колібактерій для бактерієвмісних препаратів, що включає вирощування біомаси колібактерій у живильному середовищі, змішування її з захисним середовищем, концентрування та висушування (UA, патент №77827, опубл. 15.01.2007) [2]. При цьому, вирощування біомаси колібактерій проводять під тиском біля 0,3атм. Далі одержану біомасу концентрують шляхом центрифугування. Центрифугат змішують з захисним середовищем, отриманого з 10%-ного розчину знежиреного сухого молока і 20%-ного розчину сахарози. Для подовження терміну зберігання активності колібактерій композицію заморожують і зберігають при температурі мінус 70°C. Через 18 місяців композицію

(13) C2

(11) 92518

(19) UA

розморожують, змішують з знежиреним молоком і висушують методом розпилення.

Недоліком відомого способу є невисокий термін зберігання колібактерій з високою активністю (не більше року).

Найбільш близькою є також композиція сухої біомаси колібактерій, що включає суху біомасу колібактерій, змішану з захисним середовищем [2]. Зазначена композиція містить біомасу колібактерій, вирощену під тиском біля 0,3 атм., яку після концентрування шляхом центрифугування змішують з захисним середовищем. При цьому захисне середовище отримують з 10%-ного розчину знежиреного сухого молока і 20%-ного розчину сахарози. Отриману композицію заморожують і зберігають при температурі мінус 70°C до 18 місяців, розморожену композицію, додатково змішану з захисним середовищем, висушують методом розпилення.

Недоліком відомої композиції є невисокий термін зберігання колібактерій з високою активністю (не більше року).

Задачею винаходу є удосконалення способу одержання біомаси колібактерій для бактерієвмісних препаратів, в якому за рахунок запропонованих умов вирощування біомаси та обробки біомаси, підвищується термін активності отриманої біомаси.

Задачею винаходу є удосконалення композиції сухої біомаси колібактерій, в якій за рахунок використання біомаси колібактерій, вирощених і оброблених певним чином, а також за рахунок її складу, підвищується термін активності біомаси.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом одержання біомаси колібактерій для бактерієвмісних препаратів, що включає вирощування біомаси колібактерій у живильному середовищі, змішування біомаси з захисним середовищем, концентрування та висушування біомаси, в якому вирощування біомаси колібактерій проводять під тиском не більше 0,03 атм., вирощену біомасу охолоджують до температури 6...9°C і змішують з захисним середовищем, а концентрування здійснюють після змішування біомаси з захисним середовищем при заморожуванні та ліофільному висушуванні за режимом: заморожування при температурі мінус (60...80)°C протягом 20-25, підвищення до температури 30-37°C протягом 75-85 годин. Як захисне середовище, з яким змішують вирощену біомасу, використовують желатину та сахарозу при наступному співвідношенні компонентів, % мас.:

желатин	3...5
сахароза	8...10
біомаса	решта.

Поставлена задача вирішується також запропонованою композицією сухої біомаси колібактерій, що включає суху біомасу колібактерій, змішану з захисним середовищем, в якій зазначена біомаса колібактерій отримана вищеописаним способом і додатково містить стеарат магнію та лактозу при наступному співвідношенні компонентів, % мас.:

біомаса колібактерій	4...15
стеарат магнію	1...8
лактоза	решта.

Експериментально нами було встановлено, що при проведенні вирощування біомаси колібактерій під тиском не вище 0,03 атм. та здійснення після змішування з захисним середовищем одночасно концентрування і висушування шляхом заморожування і ліофільного висушування, приводить до подовження терміну активності сухої біомаси, що містить також стеарат магнію і лактозу.

Винахід здійснюється таким чином.

Вирощування біомаси колібактерій проводять у ферментері (наприклад, біорі) у живильному середовищі під тиском не вище 0,03 атм. Температуру підтримують 37°C. Процес вирощування біомаси проводять при постійній подачі у живильне середовище стерильного повітря та перемішування з частотою 20-30 об./хв. рН підтримувалося в межах 6,0-6,5 розчином аміаку (5%-ний) та розчином глюкози (40%-ний). Процес вирощування контролювали за показником оптичної густини.

Після закінчення процесу вирощену біомасу охолоджують у біорі до температури 6...9°C і змішують з захисним середовищем. Як захисне середовище використовують желатину та сахарозу при наступному їх співвідношенні, % мас.: желатин - 3...5, сахароза - 8...10, біомаса - решта.

Отриману суміш перемішують і стерильним повітрям під тиском розливають у стерильні ємності із нержавіючої сталі та концентрують при заморожуванні та ліофільному висушуванні за режимом: заморожування при температурі мінус (60...80)°C протягом 20-25 годин, підвищення до температури 30-37°C протягом 75-85 годин. Вологість отриманого продукту (сухої біомаси колібактерій) - не вище 7%.

Отриману суху біомасу колібактерій переносять до змішувача, додають стеарат магнію та лактозу при наступному їх співвідношенні, % мас.: біомаса колібактерій - 4...15, стеарат магнію - 1...8, лактоза - решта.

Вміст бактерій *Escherichia coli* в 1 мг - 10^{10} ... 10^{13} .

Нижче наведені приклади, що демонструють, але не обмежують винахід.

Приклад 1

До бору вносять 123 л підготовленого казеїнового бульйону, що є живильним середовищем для *Escherichia coli*, та другу генерацію маточної культури штаму M-17. Вирощування біомаси колібактерій проводили при температурі 37°C, тиску 0,03 атм., постійній подачі у живильне середовище стерильного повітря, перемішування з частотою 20 об./хв. та рН в межах 6,0. Процес нарощування біомаси тривав 4,5 годин. Вирощену біомасу (121 л) охолоджували до температури 8°C і змішували з захисним середовищем: 6,0 л желатини і 12 л сахарози. Отриману суміш перемішують і стерильним повітрям під тиском розливають у стерильні ємності із нержавіючої сталі та концентрують при заморожуванні та ліофільному висушуванні за режимом: заморожування при температурі мінус 60°C протягом 25 годин, підвищення до температури 33°C протягом 80 годин. Вологість отриманого продукту - 5%. Отриману суху біомасу колібактерій зібрали у стерильну ємність, гомогенізували

у гомогенізаторі фірми «Warning» і додали додають стеарат магнію та лактозу при наступному їх співвідношенні: біомаса колібактерій - 0,6кг (15% мас.), стеарат магнію - 0,3кг (7,5% мас.), лактоза - 3,1кг (77,5% мас.).

Одержали 4 кг композиції сухої біомаси колібактерій з активністю 10^{13} у 1мг продукту. Після 3-х років зберігання активність біомаси складала 10^{11} .

Приклад 2

До біору вносять 300л підготовленого казеїнового бульйону, що є живильним середовищем для *Escherichia coli*, та другу генерацію маточної культури штаму М-17. Вирощування біомаси колібактерій проводили при температурі 37°C, тиску 0,01атм, постійній подачі у живильне середовище стерильного повітря, перемішування з частотою 30об./хв. та рН в межах 6,5. Процес нарощування біомаси тривав 3,5 годин. Вирощену біомасу (300л) охолоджували до температури 6°C і змішували з захисним середовищем: 12,5л желатини і 28,5л сахарози. Отриману суміш перемішують і

стерильним повітрям під тиском розливають у стерильні ємності із нержавіючої сталі та концентрують при заморожуванні та ліофільному висушуванні за режимом: заморожування при температурі мінус 80°C протягом 20 годин, підвищення до температури 30°C протягом 75 годин. Вологість отриманого продукту - 7%. Отриману суху біомасу колібактерій зібрали у стерильну ємність, гомогенізували у гомогенізаторі фірми «Warning» і додали стеарат магнію та лактозу при наступному їх співвідношенні: біомаса колібактерій - 1,5кг (10% мас.), стеарат магнію - 0,75 кг (5% мас.), лактоза - 12,75кг (85% мас.).

Одержали 15кг композиції сухої біомаси колібактерій з активністю 10^{12} у 1мг продукту. Після 3-х років зберігання активність біомаси складала 10^{11} .

Запропонований винахід дозволяє отримувати композицію сухої біомаси колібактерій, з високою активністю, яка зберігається протягом тривалого часу (біля трьох років).