



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92522** (13) **C2**
(51) **МПК (2009)**
A61K 35/66
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 39/07

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СУХОЇ КОМПОЗИЦІЇ БІОМАСИ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

1

(21) а200812803
(22) 03.11.2008
(24) 10.11.2010
(46) 10.11.2010, Бюл.№ 21, 2010 р.
(72) ШАЛАЄВ ЕДУАРД ДМИТРОВИЧ
(73) ШАЛАЄВ ЕДУАРД ДМИТРОВИЧ
(56) UA 77827 C2, 15.01.07.
UA75233 C2, 15.03.06.
UA 37714 A, 15.05.01.
UA 39508 A, 15.06.01.
UA 27673 C2, 15.09.2000.
UA 51006 A, 15.11.02.
UA 56385 A, 15.05.03.
RU 2257408 C1, 27.07.05.
RU 2209630 C2, 10.08.03.
RU 2353094 C2, 27.04.09.
(57) 1. Спосіб одержання сухої композиції біомаси лактобактерій, що включає вирощування лактобактерій у елективному поживному середовищі в атмосфері стерильного повітря, концентрування біомаси центрифугуванням, змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем та ліофільне висушування суміші концентрованої біомаси з захисним середовищем з отриманням ліофілізату лактобактерій, який **відрізняється**

2

тим, що вирощування лактобактерій проводять під тиском стерильного повітря 0,01...0,04 атм і температурі 35...37 °С при постійному перемішуванні 10...25 об./хв., вирощену біомасу лактобактерій охолоджують до температури 10...17 °С і концентрують при 3000...7000 об./хв., а отриманий ліофілізат лактобактерій гомогенізують та змішують з стеаратом магнію та лактозою при температурі 2...10 °С.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ліофілізат лактобактерій, стеарат магнію та лактозу змішують при такому їх співвідношенні, % мас:

ліофілізат лактобактерій	4...8
стеарат магнію	1...3
лактоза	решта.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ліофілізат лактобактерій гомогенізують при 200...300об./хв. протягом 1...2 хв.

4. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що ліофілізат лактобактерій гомогенізують в апараті "Waring".

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ліофілізат лактобактерій змішують з стеаратом магнію та лактозою при 20...50 об./хв. протягом 1...2хв.

Винахід відноситься до біотехнології, зокрема, до одержання сухої композиції біомаси лактобактерій (*Lactobacillus plantarum*), і може бути використаний для отримання активних препаратів, що застосовуються в медицині та у харчовій промисловості для лікування дисбактеріозів різної етіології та нормалізації мікрофлори кишечника.

Відомий спосіб одержання біомаси лактобактерій для отримання активних препаратів включає вирощування лактобактерій у елективному поживному середовищі - казеїнове дріжджове КД-5, в атмосфері стерильного повітря чи аргону під тиском не більше як 0,3атм. і температурі 38±1°С (UA, патент на винахід №75233, опубл. 15.03.2006), [1]. Вирощування лактобактерій проводять при додаванні глюкози у вигляді 40%-ного водного розчину та коригуванні рН 5-10%-ним розчином аміаку,

причому при додаванні глюкози та коригуванні рН здійснюють перемішування протягом 3...7 хвилин при 70...100об./хв.

Недоліком відомого способу є нестабільність виходу біомаси лактобактерій з високою активністю, та суттєве зменшення активності біомаси при зберіганні.

Найбільш близьким є спосіб одержання сухої композиції біомаси лактобактерій, що включає вирощування лактобактерій у елективному поживному середовищі в атмосфері стерильного повітря при тиску 0,2атм. і температурі 38°С, концентрування біомаси центрифугуванням, яке проводили при 10000об./хв. (UA, патент на винахід №77827, опубл. 15.01.2007), [2]. Концентровану біомасу змішували з захисним середовищем: сумішшю знежиреного молока з сахарозою, - заморожували

(13) **C2**

(11) **92522**

(19) **UA**

при температурі мінус 60°C на 24 міс., розморозили, змішували з сахарозно-желатиновим середовищем та ліофільно висушували.

Недоліком відомого способу є недостатня стабільність виходу біомаси лактобактерій з високою активністю і зменшення активності при зберіганні. Отриманий ліофілізат - суха композиція біомаси лактобактерій містить у 1г порошку 10^9 - 10^{10} клітин, через 12 місяців - 10^8 - 10^9 . Число життєздатних лактобактерій через рік становить 10^5 у 1г порошку.

Задачею винаходу є удосконалення способу одержання сухої композиції біомаси лактобактерій, в якому за рахунок умов проведення вирощування і обробки лактобактерій підвищується стабільність виходу біомаси лактобактерій з високою активністю та зберігається висока активність протягом тривалого часу.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом одержання сухої композиції біомаси лактобактерій, що включає вирощування лактобактерій у елективному поживному середовищі в атмосфері стерильного повітря, концентрування біомаси центрифугуванням, змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем та ліофільне висушування суміші концентрованої біомаси з захисним середовищем з отриманням ліофілізату лактобактерій, в якому вирощування лактобактерій проводять під тиском стерильного повітря 0,01...0,04атм. і температурі 35...37°C при постійному перемішуванні 10...25об./хв. Вирощену біомасу лактобактерій охолоджують до температури 10...17°C і концентрують при 3000...7000об./хв., а отриманий ліофілізат лактобактерій гомогенізують та змішують з стеаратом магнію та лактозою при температурі 2...10°C.

Ліофілізат лактобактерій, стеарат магнію та лактозу змішують при 20...50об./хв. протягом 1...2хв., при такому їх співвідношенні: ліофілізат лактобактерій - 4...8мас.%, стеарат магнію - 1...3мас.%, лактоза - решта.

Краще, ліофілізат лактобактерій гомогенізують при 200...300об./хв. протягом 1...2хв., зокрема, в апараті «Waring».

Експериментально нами було встановлено, що проведення процесу вирощування біомаси лактобактерій під тиском стерильного повітря 0,01...0,04атм. і температурі 35...37°C при постійному перемішуванні 10...25об./хв. сприяє росту біомаси та підвищенню живучості мікроорганізмів. Подальша обробка біомаси: концентрування при 3000...7000об./хв., гомогенізація ліофілізату лактобактерій і змішування їх з стеаратом магнію та лактозою при температурі 2...10°C, - сприяють збереженню життєздатних мікроорганізмів.

Спосіб здійснюється таким чином.

Вирощування біомаси лактобактерій (*Lactobacillus plantarum*) здійснюють у елективному поживному середовищі у біореакторі в атмосфері стерильного повітря під тиском 0,01...0,04атм. і температурі 35...37°C при постійному перемішуванні 10...25об./хв. Контроль нарощування біомаси проводили методом відбору проб один раз на годину до оптичної густини 0,55-0,65 при довжині хвилі 360-370нм. Вирощену біомасу лактобактерій

охолоджують до температури 10...17°C і концентрують на проточній центрифугі при 3000...7000об./хв. Концентрат біомаси лактобактерій змішують з захисним середовищем та ліофільно висушують. Отриманий ліофілізат лактобактерій гомогенізують при 180...300об./хв. протягом 1...2хв., наприклад, в апараті «Waring», переносять до змішувача і змішують при 20...50об./хв. протягом 1...2хв. з стеаратом магнію та лактозою у співвідношенні: ліофілізат лактобактерій - 4...8% мас, стеарат магнію - 1...3мас.%, лактоза - решта.

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

Приклад 1

До біору завантажили 115л казеїново-дріжджевого середовища і внесли 14л інокуляту - культуру другої генерації культури *Lactobacillus plantarum* (штам №38). Вирощування біомаси проводили в атмосфері стерильного повітря під тиском 0,01атм. і температурі 37°C при постійному перемішуванні 10об./хв. В процесі культивування додали 3л 40%-ного розчину аміаку (через дві години від початку вирощування), рН підтримували на рівні 5,5 за допомогою 5%-ного розчину аміаку.

Вирощування до оптичної густини 0,60 тривав 5 годин.

Вирощену біомасу лактобактерій охолоджували до температури 17°C і концентрували на проточній центрифугі при 3000об./хв. Одержали 3 л концентрованої біомаси, яку перемістили у стерильну ємність з нержавіючої сталі. Концентрат біомаси лактобактерій змішали з захисним середовищем: 2,4л 10%-ного знежиреного молока та 0,6л 20%-ної сахарози. Суміш ліофільно висушували протягом 90 годин при наступному режимі: заморожування до температури мінус 55 °C протягом 28 годин, поступове підвищення температури до температури 32°C - протягом 62 годин.

Одержали 420г ліофілізату культури *Lactobacillus Plantarum*, який гомогенізували в апараті «Waring» при 200об./хв. впродовж 2 хвилин при температурі 10°C. Гомогенізат перенесли до змішувача, додали 315г стеарату магнію та 9765г лактози, перемішали при 20об./хв. протягом 2 хвилин при температурі 10°C.

Одержали 10500г порошку сухої композиції біомаси лактобактерій з активністю 10^{12} у 1г порошку. Випробування сухої композиції біомаси лактобактерій на експериментальній установці (імітатор часу) показало, що активність культури *Lactobacillus plantarum* через 3 роки становить 10^{11} у 1г порошку.

Приклад 2

До біору завантажили 300л казеїново-дріжджевого середовища і внесли 37л інокуляту - культуру другої генерації культури *Lactobacillus plantarum* (штам №38). Вирощування біомаси проводили в атмосфері стерильного повітря під тиском 0,04атм. і температурі 35°C при постійному перемішуванні 25об./хв. В процесі культивування додали 8л 40%-ного розчину аміаку (через три години від початку вирощування), рН підтримували на рівні 6,5 за допомогою 5%-ного розчину аміаку.

Вирощування до оптичної густини 0,65 тривав 6 годин.

Вирощену біомасу лактобактерій охолоджували до температури 10°C і концентрували на проточній центрифугі при 7000об./хв. Одержали 6,2л концентрованої біомаси, яку перемістили у стерильну ємність з нержавіючої сталі. Концентрат біомаси лактобактерій змішали з захисним середовищем: 5л 10%-ного знежиреного молока та 1,2л 20%-ної сахарози. Суміш ліофільно висушували протягом 96 годин при наступному режимі: заморожування до температури мінус 60°C протягом 32 годин, поступове підвищення температури до температури 32°C - протягом 64 годин.

Одержали 1200г ліофілізату культури *Lactobacillus plantarum*, який гомогенізували в апараті «Waring» при 300об./хв. впродовж 1 хвилини

при температурі 2°C. Гомогенізатор перенесли до змішувача, додали 150г стеарату магнію та 13650г лактози, перемішали при 50об./хв. протягом 1 хвилини при температурі 2°C.

Одержали 15000г порошку композиції сухої біомаси лактобактерій з активністю 2×10^{12} у 1г порошку. Випробування композиції сухої біомаси лактобактерій на експериментальній установці (імітатор часу) показало, що активність культури *Lactobacillus plantarum* через 3 роки становить 5×10^{11} 1г порошку.

Запропонований винахід дозволяє отримати суху композицію біомаси лактобактерій з високою активністю, яка зберігається (при збереженні в стерильних умовах при температурі біля 4°C.) протягом тривалого часу.