

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к производству сухих микробных препаратов.

В производстве сухих препаратов основными этапами являются смешивание суспензии микроорганизмов с адсорбентом влаги и дальнейшая сушка в определенных условиях. Основным требованием к адсорбенту влаги является его инертность по отношению к микроорганизмам, что должно способствовать сохранению нативных свойств бактериального препарата.

Известен способ получения сухих бактериальных препаратов, включающий выращивание и концентрирование культуры микроорганизмов, смешивание с сорбентом - глинистым минералом и последующее распылительное высушивание. При этом имеет место повышенный выход жизнеспособных клеток (А.с. СССР №1616990, кл. C12N1/04, опубл. БИ №48, 1990).

Общими существенными признаками известного и заявляемого технических решений является выращивание культуры микроорганизмов, смешивание ее с сорбентом и последующая сушка.

Причиной, препятствующей достижению технического результата является недостаточно высокий выход жизнеспособных клеток, а применяемый сорбент не улучшает выживаемости клеток.

Эта причина частично устраняется в способе получения сухих бактериальных препаратов, выбранном авторами в качестве прототипа и являющемся наиболее близким к заявляемому по технической сущности и достигаемому эффекту. Способ (А.с. СССР №1831498, кл. C12N1/00, опубл. БИ №28, 1993) включает выращивание культуры микроорганизмов на питательной среде, смешивание ее с сорбентом и сушку, причем в качестве сорбента выбирают порошкообразную окись алюминия, а затем дополнительно вводят другой сорбент, связывающий воду в меньшей степени, чем основной сорбент. После этого производят досушивание смеси в сушильном шкафу при 105°C в течение 4ч. Отмечается, что полученный по этому способу препарат микроорганизмов сохраняет нативные свойства, выживаемость микроорганизмов повышается по отношению к контролю и составила от 20 до 43%.

Этот способ является наиболее близким к заявляемому. Общими существенными признаками известного и заявляемого технических решений являются выращивание микроорганизмов на питательной среде, смешивание суспензии микроорганизмов с адсорбентом и последующая сушка.

Причинами, препятствующими достижению технического результата, являются:

- использование двух сорбентов, двухступенчатое их смешивание с культуральной жидкостью;
- недостаточно высокий выход жизнеспособных клеток микроорганизмов;
- снижение выживаемости микроорганизмов в течение месяца почти на 30%.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа получения сухих бактериальных препаратов, в котором за счет выбора сорбента обеспечивается высокий выход жизнеспособных микроорганизмов и препарат

сохраняет высокий титр клеток в течение достаточно длительного периода времени, независимо от вида микроорганизмов.

Поставленная цель достигается тем, что в способе получения сухих бактериальных препаратов, включающем выращивание культуры микроорганизмов в виде суспензии, смешивание суспензии микроорганизмов с сорбентом и сушку, согласно изобретению, суспензию микроорганизмов смешивают с высокодисперсным порошком диоксида кремния в соотношении 2 : 1, сушку ведут на воздухе и полученный продукт диспергируют до тонкодисперсного состояния.

Установлено, что в результате осуществления изобретения в объеме его существенных признаков за счет выбора сорбента исключают операцию дополнительного введения сорбента вдобавок к основному, а собственно сушку возможно осуществлять на открытом воздухе при температуре, близкой к комнатной. При этом полученный сухой бактериальный препарат сохраняет высокий титр жизнеспособных бактерий в течение полугода и более. Добавление в качестве сорбента высокодисперсного порошка двуокиси кремния позволяет сохранить нативные свойства микроорганизмов и получить биопрепараты, удобные для применения со 100% - ным сохранением высоких титров бактерий. Выбранное соотношение суспензии микроорганизмов к высокодисперсному порошку диоксида кремния как 2 : 1 необходимо и достаточно для образования удобной для сушки консистенции. Увеличение количества порошка диоксида кремния более 1мас.ч. приводит к загущению смеси и неудобно для перемешивания, а снижение количества кремнезема ведет к увеличению времени сушки полученной смеси, хотя на жизнеспособности бактериального препарата это не сказывается. Введение порошка диоксида кремния в указанном соотношении с суспензией микроорганизмов позволяет не только упростить процесс сушки, но и сделать его возможным при комнатной температуре при сохранении высокого титра бактерий. При дальнейшем использовании нет необходимости отделять сорбент от биокон компонента, биопрепарат удобен в использовании. Диспергирование высушенного продукта до тонкодисперсного состояния способствует обволакиванию бактерий и созданию защитного слоя, что собственно и обеспечивает длительное сохранение высокого титра бактерий, независимо от того идет речь об аэробных, или о анаэробных микроорганизмах.

Далее сущность изобретения поясняется описанием технологии получения бактериальных препаратов микроорганизмов, а также данными изучения изменений титра бактерий, их выживаемости во времени.

Для осуществления способа использования культуральные жидкости аэробных микроорганизмов *Streptococcus lactis* №8, *Bacillus subtilis*, анаэробных микроорганизмов *Lactobacillus plantarum* №12 и *Bifidobacterium adolescentis* №5. Штаммы культ культивировали на кровяно-сыровоточном бульоне по известным методикам.

Высокодисперсный (размер частиц 5 - 10нм) порошок диоксида кремния (см. ГОСТ 14922 - 77 "Аэросил").

Пример 1. Высокодисперсный порошок диоксида кремния предварительно высушивают при 400 - 450°C. Затем в количестве 20г постепенно

добавляют к 40мл бульонной культуры *Bifidobacterium adolescentis* №5 до получения однородной густой массы. Полученную массу сушат в термостате при 27 - 32°C и затем ведут диспергирование в течение 2ч до тонкодисперсного состояния.

Полученный препарат тестируют по общепринятой методике: посев производят на питательную среду МРС-2. Для этого делают разведение в физиологическом растворе на 4,5мл 0,5г препарата, затем 1мл вносят на 9мл МРС-2. Выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 72ч. Проверку титра этого препарата проводили через каждые 2 недели в течение шести месяцев. На шестой месяц хранения титр бактерий снизился незначительно. Данные представлены в табл.1.

Пример 2. К 50мл бульонной культуры *Lactobacillus plantarum* №12 при постоянном перемешивании добавляют 24г высокодисперсного порошка диоксида кремния. Полученную массу сушат на воздухе. Затем после диспергирования полученный продукт тестируют. Жизнеспособность бактерий 100%. По мере хранения тестирование проводят через каждые две недели. Данные представлены в табл.1.

Пример 3. К 40мл бульонной культуры *Streptococcus lactis* №8 добавляют 26г порошка диоксида кремния при постоянном перемешивании. К концу перемешивания масса становится несколько неудобной для перемешивания, но дальнейшее тестирование показывает достаточно высокий титр бактерий и практически 100% - ную выживаемость в течение полугода. Для проверки титра бактерий высев культуры проводили на мясо-пептонном бульоне. Данные представлены в таблице.

Пример 4. К 50мл бульонной культуры *Bacillus subtilis*, представляющей собою суспензию микроорганизмов, добавляют 25г порошка диоксида кремния при постоянном перемешивании, как описано в примере 1. Готовый продукт представляет высокодисперсный сухой бактериальный препарат со 100% - ной выживаемостью, сохраняющейся в течение полугода. Данные проверки титра бактерий представлены в табл.2.

Далее в табл.1 представлены данные проверки титра бактерий полученных сухих бактериальных препаратов по заявляемому способу. В табл.2 представлены данные за 1995 год. Выживаемость сразу после получения готового продукта составила 100%, а через полгода - 78%. Выживаемость микроорганизмов в сухом бактериальном препарате, полученном по известному способу (прототип) составила 29 - 43%, в течение месяца титр бактерий снизился на треть.

Таким образом, способ получения сухих бактериальных препаратов прост, не требует дополнительных затрат на введение и смешивание со вторым сорбентом, не требует повышения температуры сушки, а полученный продукт обладает высокими характеристиками: высокий выход жизнеспособных клеток микроорганизмов - 100%, препарат сохраняет высокий титр бактерий в течение 6 - 9 месяцев независимо от того, аэробные или анаэробные это бактерии. Сорбент выбран таким, что при дальнейшем использовании бактериального препарата нет необходимости отделять сорбент от биоконпонента.

Дата Культура	07.07.94	15.07.94	01.08.94
<i>Streptococcus lactis</i> №8	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i> №12	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-7</sup>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> №5	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>

Дата Культура	28.01.95	28.02.95	25.04.95
<i>Bacillus subtilis</i>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>
<i>Streptococcus lactis</i> №8	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> №5	-	-	10 <sup>-9</sup>