



УКРАЇНА

(19) UA (11) 75232 (13) C2
(51) МПК (2006)
C12N 1/20
C12R 1/19 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОМАСИ КОЛІБАКТЕРІЙ

1

(21) 20040504101

(22) 28.05.2004

(24) 15.03.2006

(46) 15.03.2006, Бюл. № 3, 2006 р.

(72) Куришук Костянтин Васильович, Діденко Наталія Юріївна, Ахмедова Тетяна Михайлівна, Бочагова Ольга Павлівна

(73) ЗАКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "БІО-ФАРМА"

(56) SU 1792330 A3, 30.01.1993

RU 2092167 C1, 10.10.1997

SU 1671685 A1, 23.08.1991

(57) 1. Спосіб одержання біомаси колібактерій, що включає внесення до живильного середовища інокуляту, культивування біомаси у живильному середовищі на основі гідролізату казеїну при коригуванні рН і постійному аеруванні, який **відрізняється** тим, що як інокулят використовують культуру другої генерації маточної культури *Escherichia coli*, як живильне середовище використовують казеїновий бульйон, культивування біомаси проводять при тиску не більш як 0,3 атм та додаванні

2

глюкози, причому при коригуванні рН та/або додаванні глюкози здійснюють перемішування.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перемішування здійснюють протягом 13-17 хв. при 70-100 об./хв.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для одержання інокуляту першу та другу генерації маточної культури *Escherichia coli* вирощують у живильному середовищі, де як таке використовують казеїновий бульйон.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що рН підтримують на рівні 4,9-7,8.

5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що коригування рН здійснюють 5-10%-ним розчином аміаку.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що глюкозу додають у вигляді 40%-ного водного розчину.

7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що культивування біомаси здійснюють при температурі $37 \pm 0,5$ °C.

Винахід відноситься до області мікробіології, зокрема, до одержання біомаси колібактерій (*Escherichia coli*), і може бути використаний для отримання активних препаратів з мікробів-антагоністів.

Для профілактики і лікування дисбактеріозу кишечника та інших розладів шлунково-кишкових розладів широко використовуються біопрепарати, що включають бактерії *Escherichia coli*. Підвищення ефективності виробництва таких препаратів потребує оптимізації одержання біомаси бактерій та підвищення її якості.

Відомий спосіб одержання біомаси колібактерій включає внесення до живильного середовища інокуляту, культивування біомаси у живильному середовищі на основі гідролізату казеїну при коригуванні рН і постійному аеруванні [Методы общей бактериологии. Т1 / Под ред. Ф.Герхардта.

- М.: Мир, 1983] [1]. При цьому, як живильне середовище використовують комплексне середовище, що містить триптон та хлорид натрію, культивування проводять при температурі 37 °C і рН 7,0 ([1], с.230).

Недоліком відомого способу є велика тривалість вирощування біомаси бактерій, наявність в біомасі значної кількості баластних речовин. Тривалість вирощування становить 15-20 годин.

Задачею винаходу є удосконалення способу одержання біомаси колібактерій, в якому завдяки підбору елективного середовища та умов вирощування скорочується тривалість процесу нарощування біомаси та зменшується кількість баластних речовин.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом одержання біомаси колібактерій, що

(13) C2

(11) 75232

(19) UA

включає внесення до живильного середовища інокуляту, культивування біомаси у живильному середовищі на основі гідролізату казеїну при коригуванні рН, і постійному аеруванні, в якому як інокулят використовують культуру другої генерації маточної культури *Escherichia coli*, як живильне середовище використовують казеїновий бульйон, культивування біомаси проводять при тиску не більш як 0,3 атм та додаванні глюкози, причому при коригуванні рН та/або додаванні глюкози здійснюють перемішування. При цьому, рН підтримують на рівні 4,9 - 7,8 за допомогою 5-10 %-ного розчину аміаку.

Краще, зазначене перемішування здійснювати протягом 13 - 17 хв. при 70-100 об./хв.

Для одержання інокуляту першу та другу генерації маточної культури *Escherichia coli* вирощують у живильному середовищі, де як таке також використовують казеїновий бульйон.

При культивуванні біомаси, яке здійснюють при температурі 37 ± 1 °C, глюкозу додають у вигляді 40 %-ного водного розчину.

Експериментальне нами були виявлені умови, що є найбільш сприятливими для нарощування біомаси бактерій *Escherichia coli* та використання живильного середовища. Було встановлено, що нарощування біомаси у казеїновому бульйоні при додаванні глюкози при аеруванні і обмеженому перемішуванні проходить енергійно і продуктивно без утворення баластних речовин.

Спосіб здійснюється таким чином.

Ліофілізований штам *Escherichia coli* M-17 з ампули розводять казеїновим бульйоном методом десятикратних розведень.

Казеїновий бульйон готують з гідролізату казеїну, який фільтрують, розводять водою очищеною або для ін'єкцій. Суміш перемішують і доводять середовище до кипіння. Доводять рН до 7,8 - 7,9 розчином NaOH. Додають фосфорнокислий натрій двузаміщений, кип'ятять протягом 5 хвилин і залишають до повного осадження. Бульйон фільтрують, додають желатини і крохмальний клейстер і стерилізують.

Посіви у вигляді окремих ізольованих колоній витримують у балоні, наповненому на чверть казеїновим бульйоном, при температурі $37 \pm 0,5$ °C протягом 12-35 годин.

При відсутності сторонньої мікрофлори в мазках і контрольних середовищах, типові колонії першої генерації пересівають у балон, наповненому на чверть казеїновим бульйоном. Посіви витримують при температурі $37 \pm 0,5$ °C протягом 15-35 годин.

До біору об'ємом 250 дм³ у підготовлене живильне середовище -казеїновий бульйон (маса 60 - 140 л, температура $37 \pm 0,5$ °C) вносять інокулят - культуру другої генерації маточної культури *Escherichia coli* M-17. Інокулят подається за допомогою тиску або всмоктується за допомогою вакууму. Культивування біомаси проводять при постійній аерації живильного середовища стерильним атмосферним повітрям при температурі $37 \pm 0,5$ °C, додаванні глюкози у вигляді 40%-ного водного розчину і коригуванні рН. Тиск підтримують не більш як 0,3 атм. Перемішування, яке здійснюють під час коригування рН, додаванні розчину глюко-

зи та відбору проб, триває протягом 13-17 хв. при 70-100 об./хв. В процесі культивування біомаси рН підтримують на рівні 4,9-7,8. Коригування рН здійснюють 5-10%-им розчином аміаку. Кінець процесу культивування встановлюють за оптичною щільністю.

Нарощування біомаси займає 5-8 годин.

Кількість біомаси після концентрування становить - 6 - 11 кг.

Приклад 1

Ліофілізований штам *Escherichia coli* M-17 з ампули розводять казеїновим бульйоном методом десятикратних розведень.

Посіви у вигляді окремих ізольованих колоній витримують у балоні, наповненому на чверть казеїновим бульйоном, при температурі 37°C протягом 24 годин.

При відсутності сторонньої мікрофлори в мазках і контрольних середовищах, типові колонії першої генерації пересівають у балон, наповненому на чверть казеїновим бульйоном. Посіви витримують при температурі 37 °C протягом 25 годин.

До біору у підготовлене живильне середовище - казеїновий бульйон (маса 60 л, температура 37 °C) вносять культуру другої генерації маточної культури *Escherichia coli* M-17 (Інокулят). Інокулят подається всмоктуванням за допомогою вакууму. Культивування біомаси проводять при постійній аерації живильного середовища стерильним атмосферним повітрям, при температурі 37 °C, додаванні глюкози у вигляді 40%-ного водного розчину і коригуванні рН. Тиск підтримують на рівні 0,2 атм. Під час коригування рН, додавання розчину глюкози та під час відбору проб перемішування здійснюють протягом 15 хвилин при 70 об./хв. В процесі культивування біомаси рН підтримують на рівні 5,0 - 5,5. Коригування рН здійснюють 5%-им розчином аміаку. Кінець процесу культивування встановлюють за оптичною щільністю.

Нарощування біомаси тривало 6 годин.

Кількість біомаси після концентрування - 10,6кг.

Приклад 2

Ліофілізований штам *Escherichia coli* M-17 з ампули розводять казеїновим бульйоном методом десятикратних розведень.

Посіви у вигляді окремих ізольованих колоній витримують у балоні, наповненому на чверть, при температурі 37°C протягом 18 годин. При відсутності сторонньої мікрофлори в мазках і контрольних середовищах, типові колонії першої генерації пересівають у балон, наповненому на чверть казеїновим бульйоном. Посіви витримують при температурі 37 °C протягом 25 годин.

До біору у підготовлене живильне середовище - казеїновий бульйон (маса 140 л, температура 37 °C) вносять культуру другої генерації маточної культури *Escherichia coli* M-17 (інокулят). Інокулят подається за допомогою тиску. Культивування біомаси проводять при постійній аерації живильного середовища стерильним атмосферним повітрям, при температурі 37 °C, додаванні глюкози у вигляді 40%-ного водного розчину і коригуванні рН. Тиск підтримують на рівні 0,3 атм. Під час коригування рН, додавання розчину глюко-

зи та під час відбору проб перемішування здійснюють протягом 13 хвилин 100 об./хв. В процесі культивування біомаси рН підтримують на рівні 6,5 - 7,0. Коригування рН здійснюють 10%-им розчином аміаку. Кінець процесу культивування встановлюють за оптичною щільністю.

Нарощування біомаси тривало 7 годин.

Кількість біомаси після концентрування - 9,8 кг.

Таким чином, запропоновано ефективний спосіб вирощування біомаси бактерій *Escherichia coli*, який дозволяє скоротити тривалість процесу нарощування біомаси та зменшити кількість баластних речовин у отриманій біомасі.