



УКРАЇНА

(19) UA (11) 75233 (13) C2
(51) МПК (2006)
C12N 1/20
C12R 1/25

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОМАСИ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

1

(21) 20040504102

(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) UA 37714 A 15.05.2001

Методы общей бактериологии. Том 1. Под ред. Ф. Герхардта. - Мир 1983.

(57) 1. Спосіб одержання біомаси лактобактерій, що включає внесення до живильного середовища інокуляту, культивування біомаси у живильному середовищі при коригуванні рН, який **відрізняється** тим, що як інокулят використовують культуру другої генерації маточної культури *Lactobacillus plantarum*, як живильне середовище використовують казеїново-дріжджове середовище КД-5, культивування біомаси проводять при тиску не більш як 0,3 атм та додаванні глюкози, причому при ко-

2

ригуванні рН та/або додаванні глюкози здійснюють перемішування.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перемішування здійснюють протягом 3 - 7 хв. при 70-100 об./хв.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для одержання інокуляту першу та другу генерації маточної культури *Lactobacillus plantarum* вирощують у живильному середовищі, де як таке використовують MPC-1.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що рН підтримують на рівні 5,0-6,8.

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 $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

Винахід відноситься до області мікробіології, зокрема, до одержання біомаси лактобактерій (*Lactobacillus plantarum*), і може бути використаний у медицині для отримання активних препаратів з мікробів-антагоністів та у харчовій промисловості при виробництві кисломолочних продуктів.

Лікувально-профілактичний кисломолочний продукт на основі лактобактерій використовується у медичній практиці і харчовій промисловості для підвищення імунорезистентності організму людини і профілактики шлунково-кишкових захворювань.

Відомий спосіб одержання біомаси лактобактерій включає внесення до живильного середовища інокуляту, культивування біомаси у живильному середовищі протягом 15-16 годин [UA, патент 37714 А, кл. А23С 21/02, 15.05.2001] [1]. При цьому, як живильне середовище використовують молочну сироватку з додаванням кукурудзяного екстракту, молока, екстракту пшеничних

висівків, сульфату марганцю і буферних солей.

Недоліками відомого способу є велика тривалість вирощування біомаси бактерій та наявність в біомасі значної кількості баластних речовин.

Найбільш близьким є спосіб одержання біомаси лактобактерій, що включає внесення до живильного середовища інокуляту, культивування біомаси у живильному середовищі [Методы общей бактериологии. Т1 / Под ред. Ф.Герхардта. - М.: Мир, 1983] [2]. При цьому, як живильне середовище використовують комплексне середовище, що містить глюкозу, олеїнову кислоту, твін 40, ферментативний гідролізат казеїну, неорганічні солі ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , KCl , $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), а також амінокислоти, кислотний гідролізат казеїну, пурини та вітаміни. Культивування проводять при температурі 37°C і рН 6,5 ([2], сс. 219, 251-253).

Недоліками відомого способу є тривалість ви-

(13) C2

(11) 75233

(19) UA

рощування біомаси бактерій та наявність в біомасі баластних речовин. Тривалість процесу вирощування займає 15-20 годин.

Задачею винаходу є удосконалення способу одержання біомаси лактобактерій, 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 лактобактерій, що включає внесення до живильного середовища інокуляту, культивування біомаси у живильному середовищі при коригуванні pH, в якому як інокулят використовують культуру другої генерації маточної культури *Lactobacillus plantarum*, як живильне середовище використовують казеїново-дріжджове середовище КД-5. Культивування біомаси проводять в атмосфері повітря чи аргону при тиску не більш як 0,3 атм та при додаванні глюкози. Причому при коригуванні pH, яке підтримують на рівні 5,0 - 6,8 за допомогою 5-10 %-ного розчину аміаку, та/або додаванні глюкози здійснюють перемішування протягом 3 - 7 хв. при 70 - 100 об./хв. Глюкозу додають у вигляді 40 %-ного водного розчину.

Для одержання інокуляту першу та другу генерації маточної культури *Lactobacillus plantarum* вирощують у живильному середовищі, де як таке використовують MPC-1.

Культивування біомаси здійснюють при температурі 38 ± 1 °C.

Експериментально нами були виявлені умови, що є найбільш сприятливими для нарощування біомаси бактерій *Lactobacillus plantarum* та використання живильного середовища. Було встановлено, що нарощування біомаси у казеїново-дріжджовому середовищі КД-5 при тиску не більш як 0,3 атм та додаванні глюкози і обмеженому перемішуванні проходить енергійно і продуктивно без утворення баластних речовин.

Спосіб здійснюється таким чином.

Ліофілізований штам *Lactobacillus plantarum* N 38 з ампули розводять поживним середовищем MPC-1 методом десятикратних розведень.

До складу поживного середовища MPC-1 входять наступні компоненти: марганець сірчанокислений п'ятиводний - 0,05 г, цистеїн солянокислий - 0,2 г, магній сірчанокислений семиводний - 0,2 г, калій фосфорнокислий двоаміновий триводневий - 2,0 г, амоній лимоннокислий - 2,0 г, натрій оцтовокислий триводневий - 5,0 г, печінковий екстракт - 100,0 мл, дріжджовий автолізат - 50,0 мл, пептон сухий ферментативний - 10,0 г, гідролізат знежиреного молока - 330,0 мл, твін 80-1,0 мл, глюкоза - 20,0 г, вода очищена - до 1 л.

Посіви у вигляді окремих ізольованих колоній витримують у скляній ємності, наповненій на чверть живильним середовищем MPC-1, при температурі $38 \pm 0,5$ °C протягом 24 - 36 годин.

При відсутності сторонньої мікрофлори в пробірках і контрольних середовищах, типові колонії першої генерації пересівають у балон, наповненому на чверть живильним середовищем MPC-1. Посіви витримують при температурі 38 ± 1 °C про-

тягом 24 - 36 годин.

Використовують готове або готують казеїново-дріжджове середовище КД-5, що містить: нативний дріжджовий автолізат із дріжджів (150 мг %) - 650 мл, триптичний гідролізат казеїну (з вмістом амінного азоту 150 мг %) - 350 мл, лактоза - 10,0 г, натрію хлорид - 5,0 г, 1--цистеїн-0,1 г, агар мікробіологічний - 0,75 г, відвар із печінки ялової (1 : 2) - 100 мл.

До біору у підготовлене живильне середовище - казеїново-дріжджове середовище КД-5 (маса 60 - 110 л, температура 38 ± 1 °C) вносять інокулят - культуру другої генерації маточної культури *Lactobacillus plantarum* N 38.

Інокулят подається за допомогою тиску чи вакууму. Культивування біомаси проводять при температурі 38 ± 1 °C, додаванні глюкози у вигляді 40%-ного водного розчину і коригуванні pH. Тиск підтримують не більш як 0,3 атм очищеним атмосферним повітрям чи аргonom. Перемішування, яке здійснюють під час коригування pH, додаванні розчину глюкози та відбору проб, триває протягом 3-7 хв. при 70-100 об./хв. В процесі культивування біомаси pH підтримують на рівні 5-6,8. Коригування pH здійснюють 5-10%-им розчином аміаку. Кінець процесу культивування встановлюють за оптичною щільністю.

Нарощування біомаси займає 7-10 годин. Кількість біомаси після концентрування становить - 5 - 10 кг.

Приклад 1

Ліофілізований штам *Lactobacillus plantarum* N 38 з ампули розводять поживним середовищем MPC-1 методом десятикратних розведень.

Посіви у вигляді окремих ізольованих колоній витримують у скляній ємності, наповненій на чверть живильним середовищем MPC-1, при температурі 38 °C протягом 28 годин.

При відсутності сторонньої мікрофлори в пробірках і контрольних середовищах, типові колонії першої генерації пересівають у балон, наповненому на чверть живильним середовищем MPC-1. Посіви витримують при температурі 38 °C протягом 24 годин.

До біору у підготовлене живильне середовище - казеїново-дріжджове середовище КД-5 (маса 60 л, температура 38 °C) вносять інокулят - культуру другої генерації маточної культури *Lactobacillus plantarum* N 38.

Інокулят подається за допомогою тиску. Культивування біомаси проводять при температурі 38 °C, додаванні глюкози у вигляді 40%-ного водного розчину і коригуванні pH. Тиск підтримують 0,2 атм очищеним атмосферним повітрям. Перемішування, яке здійснюють під час коригування pH, додаванні розчину глюкози та відбору проб, триває протягом 5 хвилин при 100 об./хв. В процесі культивування біомаси pH підтримують на рівні 5,3-5,8. Коригування pH здійснюють 10%-им розчином аміаку. Кінець процесу культивування встановлюють за оптичною щільністю.

Нарощування біомаси займає 9 годин.

Кількість біомаси після концентрування становить - 8,5 кг.

Приклад 2

Ліофілізований штам *Lactobacillus plantarum* N

38 з ампули розводять поживним середовищем МРС-1 методом десятикратних розведень.

Посіви у вигляді окремих ізольованих колоній витримують у скляній ємності, наповненій на чверть живильним середовищем МРС-1, при температурі 38 °С протягом 34 годин.

При відсутності сторонньої мікрофлори в мазках і контрольних середовищах, типові колонії першої генерації пересівають у балон, наповненому на чверть живильним середовищем МРС-1. Посіви витримують при температурі 38 °С протягом 29 годин.

До біору у підготовлене живильне середовище - казеїново-дріжджове середовище КД-5 (маса 110 л, температура 38 °С) вносять інокулят -культуру другої генерації маточної культури *Lactobacillus plantarum* N 38.

Інокулят подається за допомогою вакууму. Культивування біомаси проводять при температурі

38 °С, додаванні глюкози у вигляді 40%-ного водного розчину і коригуванні рН. Тиск підтримують 0,3 атм аргоном. Перемішування, яке здійснюють під час коригування рН, додаванні розчину глюкози та відбору проб, триває протягом 7 хв. при 70 об./хв. В процесі культивування біомаси рН підтримують на рівні 6,0- 6,4. Коригування рН здійснюють 5%-им розчином аміаку. Кінець процесу культивування встановлюють за оптичною щільністю.

Нарощування біомаси займає 10 годин.

Кількість біомаси після концентрування становить - 9,5 кг.

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