



УКРАЇНА

(19) UA (11) 75475 (13) C2
(51) МПК (2006)
A61K 35/74 (2006.01)
C12N 1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОМАСИ БІФІДОБАКТЕРІЙ

1

(21) 20040504103

(22) 28.05.2004

(24) 17.04.2006

(46) 17.04.2006, Бюл. № 4, 2006 р.

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

(73) ЗАКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "БІО-ФАРМА"

(56) RU C1 2104706 20.02.98

RU C1 2123343 20.12.98

RU C2 2171034 27.07.01

(57) 1. Спосіб одержання біомаси біфідобактерій, що включає внесення до живильного середовища інокуляту, культивування біомаси у живильному середовищі при температурі $38 \pm 1^\circ\text{C}$ і коригуванні рН, який **відрізняється** тим, що як інокулят використовують культуру другої генерації маточної культури *B.bifidum*, як живильне середовище використовують біфідум-середовище, при цьому куль-

2

тивування біомаси проводять у атмосфері аргону при тиску не більше ніж 0,3 атм. і при коригуванні рН 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 пп. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що для одержання інокуляту першу та другу генерації маточної культури *B.bifidum* вирощують у живильному середовищі, де як таке використовують біфідум-середовище.

4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що для вирощування першої та другої генерації маточної культури *B.bifidum* використовують скляну ємність.

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

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що коригування рН здійснюють 5-10 %-ним розчином аміаку.

Винахід відноситься до області мікробіології, зокрема, до одержання біомаси біфідобактерій (*B.bifidum*), і може бути використаний для отримання профілактичного або лікарського препарату для лікування дисбактеріозу та для нормалізації кишкової мікрофлори.

B.bifidum відноситься до мікроорганізмів, з яких одержують один з лікарських препаратів - біфідумбактерин.

Існує стандартна методика вирощування мікроорганізмів, за якою маточну культуру бактерій вирощують у достатній кількості елективного живильного середовища при визначених умовах [Методы общей бактериологии. Т1 / Под редакцией Ф.Герхардта. - М.: Мир, 1983] [1]. Так, для вирощування *B.bifidum* використовують живильне середовище, що містить 8,0 г/л живильного бульйону та 5,0г/л хлориду натрію в анаеробних умовах при додаванні вуглекислого газу. Вирощування проводять при температурі $36-38^\circ\text{C}$ і рН 7,0 ([1], с.220).

Недоліком відомого способу є велика

тривалість вирощування біомаси бактерій, наявність в біомасі значної кількості баластних речовин.

Найбільш близьким є спосіб одержання біомаси бактерій *B.bifidum*, що включає внесення до живильного середовища інокуляту, де як інокулят використовують культуру третьої генерації маточної культури *B.bifidum*, культивування біомаси проводять при температурі $38 \pm 1^\circ\text{C}$, коригуванні рН у межах 6,5-7, додаванні розчину глюкози і постійному перемішуванні [RU, патент №2072856, опубл. 10.02.1997] [2]. У відомому способі при одержанні культури бактерій *B.bifidum* першої та другої генерації використовують середовище Блаурокка, для культури третьої генерації та біомаси як живильне середовище використовують гідролізно-молочне середовище.

Недоліком відомого способу є велика тривалість процесу вирощування біомаси бактерій, що становить 14-16 годин у ферментері, наявність в біомасі баластних речовин.

Задачею винаходу є удосконалення способу

(13) C2

(11) 75475

(19) UA

одержання біомаси бактерій *B.bifidum*, 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 бактерій *B.bifidum*, що включає внесення до живильного середовища інокуляту, культивування біомаси у живильному середовищі при температурі $38 \pm 1^\circ\text{C}$ і коригуванні рН, в якому як інокулят використовують культуру другої генерації маточної культури *B.bifidum*, як живильне середовище використовують біфідум-середовище, при цьому культивування біомаси проводять у атмосфері аргону при тиску не більш ніж 0,3 атм і при коригуванні рН здійснюють перемішування. Зазначене перемішування здійснюють протягом 3-7 хв. при 70-100 об./хв.

Для одержання інокуляту першу та другу генерації маточної культури *B.bifidum* вирощують у живильному середовищі, де як таке використовують біфідум-середовище, причому для вирощування використовують скляну ємність.

Для коригування рН, яке підтримують на рівні 5-6,8, використовують 5-10%-ий розчин аміаку.

Експериментально було виявлені умови, що є найбільш сприятливими для нарощування біомаси бактерій *B.bifidum* та використання живильного середовища. Було встановлено, що нарощування біомаси *B.bifidum* у біфідум-середовищі в інертній атмосфері при пониженому тиску і обмеженому перемішуванні проходить енергійно і продуктивно без утворення баластних речовин.

Спосіб здійснюється таким чином.

Ліофілізований штам *B.bifidum* N 1 з ампули розводять біфідум-середовищем методом десятикратних розведень.

Використане живильне середовище біфідум-середовище має такий склад, г/л: панкреатичний гідролізат казеїну - 30,0; екстракт пекарських дріжджів - 5,0; глюкоза - 7,5; лактоза - 2,5; цистеїн - 0,5; натрій хлористий - 2,5; магній сірчаноокислий - 0,5; кислота аскорбінова - 0,5; натрій оцтовокислий - 0,3; агар - 0,75.

Посіви у вигляді окремих ізольованих колоній витримують у скляній ємності, наповненій на чверть, при температурі $38 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 36-48 годин. При відсутності сторонньої мікрофлори в мазках і контрольних середовищах, типові колонії першої генерації пересівають у іншу скляну ємність, наповнену на чверть біфідум-середовищем. Посіви витримують при температурі $38 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 36-48 годин. При підтвердженні чистоти другої генерації культури використовують як інокулят.

До біору об'ємом 250 дм^3 у підготовлене біфідум-середовище (маса - 60-140 л, температура $37-38^\circ\text{C}$) вносять інокулят - культуру другої генерації маточної культури *B.bifidum* N 1. Інокулят подається за допомогою тиску чи втягується за допомогою вакууму, після чого у біору створюють тиск не більш ніж 0,3 атм інертним газом аргонном. Культивування біомаси проводять при температурі $38 \pm 1^\circ\text{C}$ і коригуванні рН. Перемішування, яке здійснюють під час коригування рН та відбору

проб, триває протягом 3-7хв. при 70-100 об./хв. В процесі культивування біомаси рН підтримують на рівні 5-6,8. Коригування рН здійснюють 5-10%-им розчином аміаку. Кінець процесу культивування встановлюють за оптичною щільністю.

Нарощування біомаси займає 7-10 годин.

Кількість біомаси після концентрування становить 4-11 кг. Баластні речовини відсутні.

Приклад 1

Ліофілізований штам *B.bifidum* №1 з ампули розводили біфідум-середовищем методом десятикратних розведень. У флакон, заповнений на чверть біфідум-середовищем, вносили посіви у вигляді окремих ізольованих колоній. Витримували протягом 42 годин при температурі близько 38°C . Стороння мікрофлора в мазках і контрольних середовищах в колонії першої генерації маточної культури *B.bifidum* відсутня.

Типові колонії першої генерації пересівали у другий флакон, наповнений на чверть біфідум-середовищем. Посіви витримували при температурі близько 38°C протягом 38 годин. Стороння мікрофлора в мазках і контрольних середовищах в колонії другої генерації маточної культури *B.bifidum* відсутня.

До біору у підготовлене біфідум-середовище масою 100л і температурою близько 38°C вносили одержану культуру другої генерації маточної культури *B.bifidum*. Інокулят подавали за допомогою тиску, після чого у біору було створено тиск 0,3 атм інертним газом аргонном. Культивування біомаси проводили при температурі близько 38°C . Водневий показник рН підтримували на рівні 5,5-6 за допомогою 10 %-ого розчину аміаку. Під час коригування рН та відбору проб здійснювали перемішування протягом 5хв. при 90 об./хв. Весь інший процес вирощування біомаси проходив без перемішування.

Нарощування біомаси проходив 7 годин 20хв.

Одержану біомасу концентрували шляхом центрифугування при 10 об./хв.

Кількість біомаси після концентрування - 9,5кг.

Баластні речовини відсутні.

Приклад 2

Ліофілізований штам *B.bifidum* N 1 з ампули розводили біфідум-середовищем методом десятикратних розведень. У флакон, заповнений на чверть біфідум-середовищем, вносили посіви у вигляді окремих ізольованих колоній. Витримували протягом 37 годин при температурі близько $38,5^\circ\text{C}$. Стороння мікрофлора в мазках і контрольних середовищах в колонії першої генерації маточної культури *B.bifidum* відсутня.

Типові колонії першої генерації пересівали у другий флакон, наповнений на чверть біфідум-середовищем. Посіви витримували при температурі близько 38°C протягом 36 годин. Стороння мікрофлора в мазках і контрольних середовищах в колонії другої генерації маточної культури *B.bifidum* N 1 відсутня.

До біору у підготовлене біфідум-середовище масою 80 л і температурою близько $38,5^\circ\text{C}$ вносили одержану культуру другої генерації маточної культури *B.bifidum*. Інокулят всмоктували за допомогою вакууму, після чого у біорі було створено тиск 0,3 атм інертним газом аргонном. Культивуван-

5

ня біомаси проводили при температурі близько 38,5°C. Водневий показник рН підтримували на рівні 6,0-6,5 за допомогою 10 %-ого розчину аміаку. Під час коригування рН та відбору проб здійснювали перемішування протягом 7 хв. при 90 об./хв. Весь інший процес вирощування біомаси

75475

6

проходив без перемішування.

Нарощування біомаси проходив 8 годин 25хв.

Одержану біомасу концентрували шляхом центрифугування при 10 об./хв.

Кількість біомаси після концентрування - 8,7кг.

Баластні речовини відсутні.