



УКРАЇНА

(19) UA (11) 77827 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
C12N 1/20  
C12N 1/04  
C12R 1/19 (2006.01)  
C12R 1/23 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОМАСИ БАКТЕРІЙ ДЛЯ БАКТЕРІЄВМІСНИХ ПРЕПАРАТІВ

1

(21) а200500289  
(22) 12.01.2005  
(24) 15.01.2007  
(46) 15.01.2007, Бюл. № 1, 2007 р.  
(72) Куришук Костянтин Васильович, Діденко Наталія Юріївна, Ахмедова Тетяна Михайлівна, Бочагова Ольга Павлівна  
(73) ЗАКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "БІО-ФАРМА"  
(56) RU C1 2072856, 10.02.1997  
RU C1 2140787, 10.04.1997  
SU A1 1082371, 30.03.1984  
SU A1 581701, 25.09.1979  
RU C1 2223775, 20.02.2004  
RU C1 2112387, 20.06.1998  
RU C1 2149008, 20.05.2000  
(57) 1. Спосіб одержання біомаси бактерій для бактерієвмісних препаратів, який передбачає вирощування бактерій у елективному поживному середовищі, концентрування біомаси, змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем і висушування біомаси у присутності середовища висушування, який **відрізняється** тим, що після змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем її піддають заморожуванню при те-

2

мпературі мінус 60 - мінус 80°C, а висушування біомаси здійснюють після розморожування біомаси і змішування її з середовищем висушування.  
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як бактерії використовують *B. bifidum* бактерії.  
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як бактерії використовують бактерії *Escherichia coli*.  
4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як бактерії використовують лактобактерії *Lactobacterium acidophilus*.  
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що як захисне середовище використовують склад, приготовлений з 10%-ного знежиреного сухого молока і 20%-ної сахарози, змішаних у співвідношенні 4:1 за об'ємом.  
6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як середовище висушування використовують молоко знежирене.  
7. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як середовище висушування використовують сахарозо-желатину.  
8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як середовище висушування використовують сахарозу.

Винахід відноситься до області мікробіології, зокрема, до одержання біомаси бактерій, і може бути використаний у мікробіології для отримання біомаси бактерій, які використовують при одержанні активних препаратів з мікробів-антагоністів та у харчовій промисловості при виробництві кисломолочних продуктів.

Підвищення ефективності виробництва сухих бактеріальних препаратів потребує оптимізації кожного етапу їх виробництва. Одержання бактерієвмісних препаратів, використання бактерій у харчовій промисловості залежать в першу чергу від самого процесу вирощування бактерій і можуть значно розрізнитися в часу. Необхідною умовою,

пов'язаною з специфічністю сировини, є розробка технологій, що дозволяють зберігати вирощену біомасу бактерій у законсервованому стані без втрати чи з незначної втрати її активності.

Відомий спосіб одержання біомаси бактерій для бактерієвмісних препаратів включає вирощування бактерій у елективному живильному середовищі, концентрування біомаси, змішування концентрованої біомаси з середовищем висушування, заморожування і ліофілну сушку (RU, патент на винахід №2072856, кл. A61K35/74, опубл. 10.02.1997 [1]).

Недоліком відомого способу є недостатня активність бактерієвмісних препаратів через невисо-

(13) C2

(11) 77827

(19) UA

ку життєздатність одержаних за відомим способом мікробних клітин, яка особливо знижується з часом. Запропонований спосіб не дозволяє використовувати біомасу бактерій для виробництва бактерійвмісних препаратів через тривалий час, наприклад 6-12 місяців після її вирощування.

Найбільш близьким є спосіб одержання біомаси бактерій для бактерійвмісних препаратів, що включає вирощування бактерій у елективному живильному середовищі, концентрування біомаси, змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем і висушування біомаси у присутності середовища висушування (RU, патент на винахід №2140787, кл. A61K 35/74, опубл. 10.11.1999 [1]). При вирощуванні за відомим способом бактерій *B. bifidum* число життєздатних біфідобактерій у 1 грамі порошку становить  $10^9$ - $10^{10}$  клітин. Сухий препарат, одержаний за даним способом, має добру сипучість і розчинність.

Недоліком відомого способу є неможливість використання біомаси бактерій для виробництва бактерійвмісних препаратів через 12-18 місяців після її вирощування. Так, через 12 місяців зберігання при температурі 6-10°C (в холодильнику) число життєздатних біфідобактерій у 1 грамі порошку становить  $10^6$ - $10^9$  клітин, через 18 місяців -  $10^3$ - $10^5$ .

Задачею винаходу є удосконалення способу одержання біомаси бактерій для бактерійвмісних препаратів, в якому за рахунок запропонованої обробки вирощених клітин біомаси забезпечується можливість збереження біомаси бактерій з високою активністю клітин протягом тривалого часу і можливість використання біомаси бактерій через 1,5-2 роки після її вирощування для виробництва бактерійвмісних препаратів при збереженні високої активності клітин бактерій.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом одержання біомаси бактерій для бактерійвмісних препаратів, що включає вирощування бактерій у елективному живильному середовищі, концентрування біомаси, змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем і висушування біомаси у присутності середовища висушування, в якому після змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем її піддають заморожуванню при температурі (-60)-(-80)°C, а висушування біомаси здійснюють після розморожування біомаси і змішування її з середовищем висушування.

Запропонований спосіб використовували при вирощуванні бактерій *B. bifidum*, *Escherichia coli* та лактобактерій *Lactobacterium acidophilus*.

Як середовище висушування використовують молоко знежирене, сахарозо-желатину або сахарозу.

Як захисне середовище використовують склад, приготовлений з 10 Усного знежиреного сухого молока і 20%-ної сахарози, змішаних у співвідношенні 4:1 за об'ємом.

Експериментальне нами було встановлено, що заморожування концентрованої біомаси з захисним середовищем при температурі мінус 60 - мінус 80°C, проведене до змішування концентрованої біомаси з середовищем висушування дозволяє підвищити виживаність мікроорганізмів, і доз-

воляє використовувати вирощену біомасу бактерій через 1,5-2 роки.

Спосіб здійснюється таким чином.

До біору у підготовлене середовище вносять інокулят - культуру певного виду бактерій. Інокулят подається за допомогою тиску чи втягується за допомогою вакууму, після чого у біору створюють необхідні умови для культивування біомаси.

При вирощуванні біомаси біфідобактерій як поживне середовище використовують, зокрема, біфідум-середовище, при вирощуванні біомаси бактерій *Escherichia coli* як поживне середовище використовують казеїновий бульйон, і при вирощуванні біомаси лактобактерій використовують казеїново-дріжджове середовище. Нарощування біомаси займає 5-10 годин.

Біомасу бактерій переносять до центрифуги і концентрують її при обертанні центрифуги зі швидкістю 10000об./хв., після чого концентровану біомасу змішують з захисним середовищем у співвідношенні 1:1. Як захисне середовище використовують склад, приготовлений з 10%-ного розчину знежиреного сухого молока і 20%-ного розчину сахарози, змішаних у співвідношенні 4:1 за об'ємом.

Біомасу бактерій, змішану з захисним середовищем, піддають заморожуванню при температурі мінус 60 - мінус 80°C. Заморожування здійснюють у холодильних системах типу "Jouan". В таких системах заморожена біомаса може зберігатися тривалий час (від кількох годин до двох років).

Потім біомасу розморожують, змішують з середовищем висушування і піддають висушуванню, наприклад методом ліофілізації чи розпилення. Як середовище висушування використовують молоко знежирене, сахарозо-желатину або сахарозу.

Для кращого розуміння винахід ілюструється прикладами.

#### Приклад 1

До біору у підготовлене біфідум-середовище масою 100л і температурою близько 38°C вносили інокулят - культуру другої генерації маточної культури *B. bifidum*. Інокулят подавали за допомогою тиску, після чого у біору було створено тиск 0,3атм інертним газом аргон. Культивування біомаси проводили при температурі близько 38°C.

Нарощування біомаси проходило протягом 8 годин.

Одержану біомасу концентрували шляхом центрифугування при 10000об./хв. Кількість біомаси після концентрування - 10,5л.

Концентровану біомасу змішали з 10,5л захисного середовища, який одержали змішуванням 8,4л 10%-ного розчину знежиреного сухого молока і 2,1л 20%-ного розчину сахарози.

Біомасу бактерій *B. bifidum*, змішану з захисним середовищем, заморозили при температурі мінус 60°C. Заморожування проводили у холодильній камері "Jouan".

Через 18 місяців біомасу розморозили, змішали з сахарозо-желатиновим середовищем і висушили методом розпилення з одержанням сухої біомаси бактерій.

Число життєздатних біфідобактерій у 1 граму порошку сухої біомаси бактерій відразу після одержання становить  $10^9$ - $10^{10}$  клітин, через 3

місяця після одержання  $10^9$ - $10^{10}$  клітин, через 6 місяців після одержання -  $10^9$ - $10^{10}$ , через 12 місяців після одержання -  $10^8$ - $10^9$ .

#### Приклад 2

Одержання біомаси здійснювали як описано у прикладі 1.

Концентровану біомасу у кількості 9,6л змішали з 9,6л захисного середовища, який одержали змішуванням 7,68л 10%-ного розчину знежиреного сухого молока і 1,92л 20%-ного розчину сахарози.

Біомасу бактерій *B. bifidum*, змішану з захисним середовищем, заморозили при температурі мінус 80°C. Заморожування проводили у холодильній камері "Jouan",

Через 24 місяці біомасу розморозили, змішали з сахарозою і висушили методом ліофілізації з одержанням сухої біомаси бактерій.

Число життєздатних біфідобактерій у 1 граму порошку сухої біомаси бактерій відразу після одержання становить  $10^9$ - $10^{10}$  клітин, через 3 місяця після одержання  $10^9$ - $10^{10}$  клітин, через 6 місяців після одержання -  $10^9$ - $10^{10}$ , через 12 місяців після одержання -  $10^8$ - $10^9$ .

#### Приклад 3

До біору у підготовлене середовище - казеїновий бульйон масою 60 л і температурою близько 37°C вносили інокулят - культуру другої генерації маточної культури *Escherichia coli* M-17. Інокулят подавали за допомогою тиску, після чого у біору було створено тиск 0,3атм інертним газом аргонном. Культивування біомаси проводили при постійній аерації живильного середовища стерильним атмосферним повітрям, при температурі 37°C.

Нарощування біомаси проходило протягом 6 годин.

Одержану біомасу концентрували шляхом центрифугування при 10000об./хв. Кількість біомаси після концентрування - 10,6л.

Концентровану біомасу змішали з 10,6л захисного середовища, який одержали змішуванням 8,48л 10%-ного розчину знежиреного сухого молока і 2,12л 20%-ного розчину сахарози.

Біомасу бактерій *Escherichia coli*, змішану з захисним середовищем, заморозили при температурі мінус 70°C. Заморожування проводили у холодильній камері "Jouan".

Через 18 місяців біомасу розморозили,

змішали з молоком знежиреним і висушили методом розпилення з одержанням сухої біомаси бактерій.

Число життєздатних *Escherichia coli* у 1 граму порошку сухої біомаси бактерій відразу після одержання становить  $10^{10}$ - $10^{12}$  клітин, через 3 місяця після одержання  $10^9$ - $10^{10}$  клітин, через 6 місяців після одержання -  $10^9$ - $10^{10}$ , через 12 місяців після одержання -  $10^8$ - $10^9$ .

#### Приклад 4

До біору у підготовлене поживне середовище - казеїново-дріжджове середовище КД-5 (маса 60л, температура 38°C) вносять інокулят - культуру другої генерації маточної культури *Lactobacteriums acidophilus*. Інокулят подається за допомогою тиску. Культивування біомаси проводили при температурі 38°C. Тиск підтримували 0,2атм очищеним атмосферним повітрям.

Нарощування біомаси проходило протягом 9 годин.

Одержану біомасу концентрували шляхом центрифугування при 10000об./хв. Кількість біомаси після концентрування - 8,5л.

Концентровану біомасу змішали з 8,5л захисного середовища, який одержали змішуванням 6,8л 10%-ного розчину знежиреного сухого молока і 1,7л 20%-ного розчину сахарози.

Біомасу бактерій *Lactobacteriums acidophilus*, змішану з захисним середовищем, заморозили при температурі мінус 60°C. Заморожування проводили у холодильній камері "Jouan".

Через 24 місяці біомасу розморозили, змішали з сахарозо-желатиновим середовищем і висушили методом ліофілізації з одержанням сухої біомаси бактерій.

Число життєздатних *Lactobacteriums acidophilus* у 1 граму порошку сухої біомаси бактерій відразу після одержання становить  $10^9$ - $10^{10}$  клітин, через 3 місяця після одержання  $10^9$ - $10^{10}$  клітин, через 6 місяців після одержання -  $10^9$ - $10^{10}$ , через 12 місяців після одержання -  $10^8$ - $10^9$ .

Таким чином, запропонований винахід дозволяє забезпечити високу активність клітин протягом тривалого часу і можливість використання біомаси бактерій через 1,5-2 роки після її вирощування для виробництва бактеріймісних препаратів при збереженні високої активності клітин бактерій.