



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 93228

(13) C2

(51) МПК (2011.01)

C12N 1/04

A61K 39/07

A61P 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СУХОГО ПРОБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ

1

2

(21) а200810023

(22) 01.08.2008

(24) 25.01.2011

(46) 25.01.2011, Бюл.№ 2, 2011 р.

(72) КУРИЩУК КОСТЯНТИН ВАСИЛЬОВИЧ, ДІ-
ДЕНКО НАТАЛІЯ ЮРІЇВНА(73) КУРИЩУК КОСТЯНТИН ВАСИЛЬОВИЧ, ДІ-
ДЕНКО НАТАЛІЯ ЮРІЇВНА

(56) UA C2 77827, 15.01.2007.

UA C2 75475, 15.04.2006.

UA C2 75233, 15.03.2006.

UA C2 75232, 15.03.2006.

RU C1 2205650, 10.06.2003.

RU C1 2140787, 10.11.1999.

RU C1 2129794, 10.05.1999.

UA A 39021, 15.05.2001.

UA A 39022, 15.05.2001.

UA C2 39712, 15.09.2004.

UA U 2492, 17.05.2004.

UA A 58401, 15.07.2003.

UA C2 88482, 26.10.2009.

(57) 1. Спосіб одержання сухого пробіотичного препарату, що включає вирощування біомаси бактерій *B.bifidum* у елективному живильному середовищі в атмосфері інертного газу при температурі 37-38 °С, концентрування біомаси методом центрифугування, змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем та ліофільне висушування, який **відрізняється** тим, що виро-

щування біомаси проводять при тиску 0,01-0,03 атм, після закінчення вирощування біомасу охолоджують до температури 7-10 °С, концентрування біомаси проводять при 4000-7000 об./хв., змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем проводять при одночасній гомогенізації, а ліофільне висушування здійснюють за режимом: заморожування - при температурі мінус 58 - мінус 60 °С протягом 20-24 годин, основний період - витримка при температурі від мінус 50 до плюс 30 °С протягом 55-61 годин, видалення залишкової вологи - при температурі плюс 30 °С протягом 5-6 годин, і, додатково, ліофільно висушену біомасу змішують з лактозою і стеаратом магнію при масовому співвідношенні компонентів, % мас.:

висушена біомаса	4-8
стеарат магнію	1-2
лактоза	решта.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що додатково при вирощуванні біомаси здійснюють перемішування кожні дві години при 15-25 об./хв. протягом 7-10 хв.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що гомогенізацію проводять при частоті обертів 200-300 об./хв.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що змішування ліофільно висушеної біомаси, лактози і стеарату магнію проводять при температурі 4-8°С.

Винахід відноситься до біотехнології, зокрема до виготовлення сухого пробіотичного препарату на основі біомаси бактерій *B.bifidum*, і може бути використаний в медицині для коригування травного тракту людей та тварин.

Відомий спосіб одержання сухого пробіотичного препарату, що включає вирощування біомаси бактерій *B.bifidum* у елективному живильному середовищі в атмосфері інертного газу при температурі 37-38°С, концентрування біомаси методом центрифугування, змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем та ліофільне висушування (патент України на винахід №77827, опубл. 15.01.2007). Вирощування біомаси бактерій

B.bifidum проводять при тиску 0,3атм, концентрування одержаної біомаси здійснюють при 10000 об./хв. Нарощування біомаси за таких умов проходить приблизно за 8 годин. Для збереження активної біомаси в промисловому виробництві після змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем її піддають заморожуванню при температурі мінус 60 - мінус 80°С і зберігають в таких умовах. В замороженому стані біомаса може зберігатися до 18 місяців. Потім біомасу розморожують, змішують з середовищем висушування і висушують. Отримана лікарська форма про біотичного препарату зберігає свою активність протягом року.

(13) C2

(11) 93228

(19) UA

Недоліком відомого способу одержання сухого пробіотичного препарату є нетехнологічність і зниження активності біомаси при виробництві в промислових масштабах.

Задачею винаходу є удосконалення способу одержання сухого пробіотичного препарату, в якому запропоновані режими і умови їх проведення приводять до спрощення процесу отримання активної і стабільної біомаси бактерій *B.bifidum* в промислових масштабах. В результаті запропонованого способу зберігається висока активність отриманої біомаси протягом трьох років.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом одержання сухого пробіотичного препарату, що включає вирощування біомаси бактерій *B.bifidum* у елективному живильному середовищі в атмосфері інертного газу при температурі 37-38°C, концентрування біомаси методом центрифугування, змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем та ліофільне висушування, в якому вирощування біомаси проводять при тиску у 0,01-0,03 атм, після закінчення вирощування біомасу охолоджують до температури 7-10°C, концентрування біомаси проводять при 4000-7000 об./хв., змішування концентрованої біомаси з захисним середовищем проводять при одночасній гомогенізації, а ліофільне висушування здійснюють за режимом:

заморожування - при температурі мінус 58 - мінус 60°C протягом 20-24 годин,

основний період - витримка при температурі від мінус 50 до плюс 30°C протягом 55-61 годин,

видалення залишкової вологи - при температурі плюс 30°C протягом 5-6 годин. При цьому, гомогенізацію проводять при частоті обертів 200...300 об./хв., а при вирощуванні біомаси краще додатково проводити перемішування кожні дві години при 15-25 об./хв. протягом 7-10 хв. Ліофільно висушену біомасу змішують з наповнювачем, наприклад, лактозою і стеаратом магнію при масовому співвідношенні, % мас:

висушена біомаса	- 4...8,
стеарат магнію	- 1...2,
лактоза	- решта,

- яке проводять при температурі 4...8°C.

Експериментально нами було знайдені умови, що сприяють росту біомаси бактерій *B.bifidum* в процесі нарощування та підвищенню живучості мікробних тіл. Запропонована технологія дозволяє скоротити час культивування до 5 годин і забезпечити активність біомаси до трьох років при зберіганні лікарської форми (сухий пробіотичний препарат) при температурі +4...+8°C.

Спосіб здійснюється таким чином.

Біомасу бактерій *B.bifidum* вирощують у елективному живильному середовищі у реакторі (наприклад, біору) в атмосфері інертного газу з тиском 0,01-0,03 атм при температурі 37-38°C. Необов'язково, кожні дві години проводять перемішування при 15-20 об./хв. протягом 7-10 хв. Контроль нарощування біомаси проводять методом відбору проб один раз на годину з визначенням густини та однорідності біомаси *B.bifidum* на колориметрі фотоелектричному на довжині хвилі 460-470 нм. Після закінчення вирощування біомасу

охолоджують до температури 7-10°C. Охолоджену біомасу концентрують на поточній центрифугі при 4000-7000 об./хв. з подальшою гомогенізацією з захисним середовищем: знежирене молоко та сахароза у об'ємному співвідношенні 1 частина біомаси і 1 частина захисного середовища. Для гомогенізації використовують апарат фірми «Waring», гомогенізацію проводять з частотою обертів 200-300 об./хв. протягом 1-2 хв. Отриманий гомогенат вміщують у стерильну касету з нержавіючої сталі та проводять ліофільне висушування до кінцевої температури 28-30°C. Ліофільне висушування здійснюють за режимом:

заморожування-при температурі мінус (58-60)°C протягом 20-24 годин;

основний період - витримка при температурі від мінус 50 до плюс 30°C протягом 55-61 годин;

видалення залишкової вологи - при температурі плюс 30°C протягом 5-6 годин.

Ліофільно висушену біомасу переносять до змішувача, добавляють наповнювачі для забезпечення гомогенності і сипучості готової субстанції. Наприклад, добавляють лактозу і стеарат магнію при масовому співвідношенні компонентів, % мас:

висушена біомаса	- 4...8,
стеарат магнію	- 1...2,
лактоза	- решта.

Змішування проводять при температурі 4-8°C при 20-30 об./хв. протягом 1-2 хв. до отримання однорідної маси.

Отриманий сухий пробіотичний препарат зберігають у стерильних ємностях при температурі 8-10°C і використовують для виготовлення готових лікарських форм.

Нижче наведені приклади, що демонструють але не обмежують винахід.

Приклад 1

До бору у підготовлене елективне живильне середовище масою 100 л і температурою 38°C вносили культуру бактерій *B.bifidum*. Вирощування біомаси бактерій проводили в атмосфері азоту при тиску 0,02 атм. Кожні дві години проводили перемішування при 20 об./хв. протягом 8 хв. Контроль нарощування проводили до показника 10^{12} мікроорганізмів у 1 мл. При постійному моніторингу густини культури процес вирощування біомаси пройшов за 5 годин. Біомасу в реакторі охолодили до 8°C. Охолоджену біомасу концентрували на поточній центрифугі при 4000 об./хв. протягом 2,5 годин. Одержали 10,5 л біомаси з вмістом 10^{12} мікроорганізмів у 1 мл. До отриманої біомаси додали 10%-ний розчин сухого знежиреного молока у кількості 8,4 л та 20%-ний розчин сахарози у кількості 2,1 л. Гомогенізацію і змішування проводили в апараті фірми «Waring» з частотою обертів 200 об./хв. протягом 2 хв. Гомогенат культури бактерій *B.bifidum* у кількості 21 л розливали у стерильні касети з нержавіючої сталі та ліофільно висушували за режимом:

заморожування - при температурі мінус 58 - мінус 60°C протягом 24 годин,

основний період - витримка при температурі від мінус 50 до плюс 30°C протягом 60 годин,

видалення залишкової вологи - при температурі плюс 30°C протягом 6 годин. Одержали 0,5 кг

сухого напівфабрикату, який зібрали у змішувач. До біомаси бактерій *B.bifidum* добавили стеарат магнію 0,1 кг та лактози 9,5 кг. Перемішали при охолодженні до плюс 5°C при 20 об/хв. протягом 2 хв. Одержали сухий пробіотичний препарат у кількості 10,1 кг з активністю 1×10^{12} в 1 мг препарату.

Активність біомаси, в 1 мг препарату:

через 12 міс. - 1×10^{12} ,

через 24 міс. - 1×10^{11} ,

через 36 міс. - 5×10^{10} .

Приклад 2

До бору у підготовлене елективне живильне середовище масою 150 л і температурою 37°C вносили культуру бактерій *B.bifidum*. Вирощування біомаси бактерій проводили в атмосфері азоту при тиску 0,01 атм. Контроль нарощування проводили до показника 10^{12} мікроорганізмів у 1 мл. При постійному моніторингу густини культури процес вирощування біомаси пройшов за 6 годин. Біомасу в реакторі охолодили до 10°C. Охолоджену біомасу концентрували на поточній центрифугі при 7000 об./хв. протягом 2 годин. Одержали 15,5 кг біомаси з вмістом 10^{12} мікроорганізмів у 1 мл. До отриманої біомаси додали 10%-ний розчин сухого знежиреного молока у кількості 12,4 л та 20%-ний розчин сахарози у кількості 3,1 л. Гомогенізацію і змішу-

вання проводили в апараті фірми «Waring» з частотою обертів 300 об/хв. протягом 1 хв. Отриманий гомогенат культури бактерій *B.bifidum* розливали у стерильні касети з нержавіючої сталі та а ліофільно висушували за режимом:

заморожування - при температурі мінус 58 - мінус 60°C протягом 20 годин,

основний період - витримка при температурі від мінус 50 до плюс 30°C протягом 57 годин,

видалення залишкової вологи - при темпера-

турі плюс 30°C протягом 5 годин. Одержали 0,650

кг сухого напівфабрикату, який зібрали у змішувач.

До біомаси бактерій *B.bifidum* добавили стеарат

магнію 0,132 кг та лактози 12,348 кг. Перемішали

при охолодженні до плюс 4°C при 20 об/хв. протя-

гом 2 хв. Одержали сухий пробіотичний препарат у

кількості 13,13 кг з активністю 1×10^{12} в 1 мг препа-

рату. Активність біомаси, в 1 мг препарату:

через 12 міс. - 1×10^{12} ,

через 24 міс. - 5×10^{11} ,

через 36 міс. - 3×10^{10} .

Таким чином, запропонований винахід дозво-

ляє спростити процес отримання активної біомаси

бактерій *B.bifidum* і забезпечити її стабільної при

промислового виробництва.