

Винахід відноситься до мікробіологічної промисловості, до галузі біотехнології, зокрема, до способів одержання біомаси молочнокислих бактерій для виробництва на її основі медичних та ветеринарних препаратів, харчових добавок, молочнокислих заквасок.

Важлива роль молочнокислих бактерій і продуктів на їх основі для оздоровлення організму людини і тварин і лікування деяких захворювань відома з давніх часів. За допомогою молочнокислих бактерій одержують велику групу препаратів, до складу яких входять живі клітини, які називаються пробіотики (нормофлори).

Для одержання біомаси молочнокислих бактерій використовується широкий спектр природних і штучно виведених штамів, індивідуальні властивості яких визначають фармакологічну дію одержаних на їх основі препаратів.

Відомий спосіб одержання біомаси молочнокислих бактерій, для росту яких необхідно добавляти в поживне середовище сульфід натрію, амонію або оцтової кислоти. Одержані з цієї біомаси препарати застосовують для запобігання інфекційних захворювань (заявка Великобританії, №1585863).

Також відомий спосіб одержання біомаси молочнокислих бактерій, із клітин яких готують препарати, які знижують рівень холестерину в організмі. В цьому способі застосовують нові штами і певні умови культивування (Європейський патент №0181170, 1988).

На основі біомаси молочнокислих бактерій в теперішній час розробляють препарати, які мають імуномодуючу, протипухлинну дію, препарати для лікування шлунково-кишкових захворювань, харчові добавки і молочнокислі закваски.

Найбільш близьким до заявленого є «Способ приготовления питательной среды для культивирования термофильных молочнокислых бактерий *Lactobacillus delbrueckii*» (а.с. СРСР №1357427, 1987) і «Штамм молочнокислых бактерий *Lactobacillus bulgaricus*, используемый в заквасках для кисломолочных продуктов» (а.с. СРСР №1502617, 1989). В якості основних джерел живлення для підвищення виходу біомаси використовують ферментолізати рослинної сировини, мікроелементи.

Задача, яку вирішують автори способу, що заявляють, складається в розробці способу одержання біомаси молочнокислих бактерій зі стабільними властивостями і постійним складом, яка відповідає вимогам стандартів і фармакопії, для подальшого одержання медичних та ветеринарних препаратів з широким спектром фармакологічної дії, а також харчових добавок і молочнокислих заквасок.

Відомо, що молочнокислі бактерії відносяться до найбільш складних мікроорганізмів з точки зору потреби в різноманітних поживних речовинах.

При їх культивуванні велику роль має збалансованість поживних елементів. Навіть незначні зміни в їх співвідношенні можуть призвести до різкого зниження продуктивності культури, зміни структури і складу клітин, що вплине на стабільність самої біомаси клітин і біологічної речовини, яку отримують із біомаси.

Задача вирішується способом одержання біомаси молочнокислих бактерій шляхом культивування мікроорганізму *Lactobacillus bulgaricus* на поживному середовищі, що містить азот, вуглець, фосфор, мінеральні солі і вітаміни, в анаеробних умовах, з подальшим відокремленням одержаної біомаси, який відрізняється тим, що в якості продуцента використовують штам *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702, депонований в колекції Депозитарію Інституту мікробіології і вірусології НАН України (реєстраційний номер 1MB B-7085), а культивування проводять на збалансованому поживному середовищі слідуєчого складу, в % мас.:

Калій фосфорнокислий	
однозаміщений	0,18 ÷ 0,22
Магній сірчаноокислий 7-водний	0,01 ÷ 0,03
Марганець сірчаноокислий 5-водний	0,005 ÷ 0,007
Цукор-пісок	0,5 ÷ 1,5
Ферментолізат казеїну	1,8 ÷ 2,2
Ферментолізат борошна соєвого	0,8 ÷ 1,2
Екстракт дріжджовий	1,8 ÷ 2,4
Екстракт кукурудзяний	0,3 ÷ 0,6

Спільними з прототипом ознаками є:

- використання мікроорганізму *Lactobacillus bulgaricus*;

- культивування в анаеробних умовах на поживному середовищі, що містить вуглець, азот, фосфор, мінеральні солі, вітаміни.

Відмінними ознаками є:

- використання в якості продуцента нового штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702;

- використання збалансованого поживного середовища нового складу;

- рН поживного середовища 6,0 ÷ 6,4

- сумарний аміний азот 1,0 ÷ 1,2%

В даному способі задача одержання біомаси зі стабільними властивостями і постійним складом вирішена за рахунок застосування нового штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 на збалансованому поживному середовищі.

Штам виділений із асоціативної культури при дослідно-промисловому напрацюванні біомаси молочнокислих бактерій.

Морфологія клітин

Грампозитивні, нерухомі, рівні палички 0,5х3-8мкм з заокругленими кінцями, розташовані ланцюжками різної довжини.

Фізіологічна характеристика штаму

Факультативний анаероб, оптимальна температура (40±1)°С. Оптимум рН 6,0-6,2. Каталазонегативний, нітрати та нітроти не відновлює, желатину не розріджує, аміак із аргініну не утворює. Молоко згущує, утворюючи кислоту (1,3%), молоко з лакмусом відновлює без утворення газу, відновлює молоко з метиленовою синьою, на середовищах з підвищеним вмістом (більше 4%) хлористого натрію і рН більше 9,6 не росте.

Не виживає після прогрівання при температурі 63°C протягом 30хв., слиз не утворює, росте на середовищах з жовцю (40%).

Зброджує: глюкозу, фруктозу, лактозу, сахарозу.

Не зброджує: арабінозу, мальтозу, дульцит, ксилозу, рафінозу, інозит, рибозу, манніт, інουλін, целобіозу, галактозу, ескулін, сорбозу, амідгалін, трегалозу, маннозу.

Штам відноситься до групи delbrueckii роду *Lactobacillus*, ріст можливий від 28 до 50°C і pH від 3,5 до 8,5, оптимальна температура від 36 до 40°C, pH від 5,6 до 6,4.

Культурально-морфологічні особливості штаму.

Штам росте на середовищах, селективних для молочнокислих бактерій. На поверхні агризованих середовищ утворює напівпрозорі, білуваті колонії, гладенькі з блиском, слабовипуклі, круглі з нерівним краєм діаметром 1-3мм. В товщі агару - білуваті дискovidні колонії діаметром 1-2мм. В рідкому середовищі утворює однорідну муть і дрібнодисперсний осад.

Спосіб, умови і склад середовищ для зберігання:

На рідкому середовищі MRS з вмістом 0,5% глюкози і 2% крейди протягом 2 міс при температурі 4°C.

Тривале зберігання в ліофільному стані при температурі (4-8)°C.

Захисні середовища при висушуванні: сахароза - 10%, желатин - 1%, pH - 7,0±0,2 або сахароза - 10%, поліглюкін - 2%.

Спосіб, умови і склад середовищ для розмноження штаму:

Температура росту (39±1)°C, термін 18-24 год, pH - 6,6-6,8. Середовище MRS; середовище P-4 слідуєчого складу, г/л:

Рибний гідролізат	10,0
Дріжджовий екстракт	10,0
Цукор	10,0
Магній сірчаноокислий 7-водний	0,2
Марганець сірчаноокислий 5-водний	0,005
Натрій лимоннокислий	5,0

Умови та склад середовищ для ферментації:

Температура росту (39±1)°C, pH - 6,6-6,8.

Середовище В-1 з вмістом амінного азоту слідуєчого складу, %:

Ферментолізат казеїну 50% по амінному азоту;

Ферментолізат

соевого борошна 23% по амінному азоту;

Дріжджовий екстракт 17% по амінному азоту;

Кукурудзяний екстракт 10% по амінному азоту;

Цукор 0,5-1,5;

Магній сірчаноокислий

7-водний 0,2;

Марганець

сірчаноокислий 5-

водний 0,005;

Калій

фосфорнокислий

двузаміщений 2,0;

Вода дистильована до 1л

Активність культури: накопичення біомаси 1-10⁸кл/мл. Титр визначають методом граничних розбавлень в стовпчиках агаризованого середовища MRS.

Оптимальні співвідношення ростових факторів знайдені методом аддитивно-сітчатого опису з використанням багаторівневих планів.

Для проведення дослідів використовували план п'ятифакторного експерименту на чотирьох рівнях. Фактори, що оптимізують, є K₁ - концентрація ферментолізату казеїну (1-4-й рівень по амінному азоту 300-500мг/л); K₂ - концентрація ферментолізату соєвого борошна (100-250мг/л) по амінному азоту; K₃ - концентрація кукурудзяного екстракту (25-100мг/л) по амінному азоту; для K₄ - концентрація дріжджового екстракту (100-200мг/л); для K₅ - концентрація калію фосфорнокислого двузаміщеного (0,5-2,0г/л).

Базовим показником, відносно якого йшла оптимізація середовища, є вихід вологої біомаси культури *Lactobacillus bulgaricus* (LB) з 1 літра культуральної рідини.

Після проведення оптимізації статистичній обробці підлягали дані 3-х дослідів, кожний проводився в 3-х повторностях, максимальний вихід біомаси зі стабільними біологічними властивостями одержаний для слідуєчих концентрацій ростових факторів:

- Ферментолізату

казеїну 450-480мг/л (по NH₂)

- Ферментолізату

соевого борошна 200-240мг/л (по NH₂)

- Кукурудзяного

екстракту 50-100мг/л (по NH₂)

- Дріжджового екстракту 150-180мг/л (по NH₂)

- Калій

фосфорнокислий

двузаміщений 2,0г/л (по NH₂)

- (концентрація цукру у

всіх дослідях була

10г/л)

При оптимізації джерел вуглецю використовували: цукор в концентрації 4,0; 6,0; 15,0г/л; гідролізований цукор (ступінь гідролізу 38%) в концентрації 4,0; 6,0; 15,0г/л і глюкозу в концентрації 4,0; 6,0; 15,0г/л (табл. 1).

Із наданих даних видно, що найбільший вихід біомаси LB був досягнутий на середовищі, яке містить в якості джерела вуглецю цукор в концентрації 5-15г/л.

Таблиця 1

Вплив джерел вуглецю і його концентрації на накопичення біомаси культурою *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702

Джерело вуглецю	Концентрація джерела вуглецю, %	Кількість біомаси, яка утворюється, (16 годин росту), г/л
Цукор	4,0	5,2±0,2
-«-	5,0	7,6±0,2
-«-	15,0	8,2±0,2
Цукор гідролізований	4,0	7,2±0,2
-«-	6,0	8,0±0,2
-«-	15,0	8,0±0,2
Глюкоза	4,0	6,2±0,2
-«-	6,0	6,3±0,2
-«-	15,0	6,5±0,2

Примітка. рН до засіву - 6,0-6,3; NH₂ - 0,99-1,01мг/мл поживного середовища.

Найбільш низький вихід біомаси спостерігався на середовищах до складу яких входила глюкоза. За даними цієї серії дослідів в виробниче поживне середовище в якості вуглеводного компоненту був включений цукор в концентрації 5-15г/л. Збалансоване по елементам вуглеводного, азотного, фосфорного живлення, ростовим факторам, поживне середовище пройшло апробацію в лабораторних, стендових, дослідно-промислових умовах для вирощування штаму.

Практично досягнутий вихід вологої біомаси:

- лабораторні умови - 5,0-15,0г/л;
- дослідно-промислові умови - 4,5-6,0г/л.

При проведенні експерименту в дослідно-промислових умовах біомасу відділяли центрифугуванням або сепаруванням на сепараторі Westfalia зі швидкістю подачі 200л/год, потім промивали від залишків поживного середовища і передавали на переробку для одержання ферментативних лізатів і біологічних екстрактів за відомими схемами.

Одержана після сепарації непромита біомаса являла собою пастоподібну речовину коричневого кольору зі слабким специфічним запахом, вологістю 85%, кількістю життєздатних клітин більше 1-10⁸кл/г. Після ліофільної сушки непромитої біомаси, в залежності від режиму сушки, підбраного наповнювача і стабілізатора, життєздатність клітин штаму складала від 1-10³кл/г до 1-10⁹кл/г препарату.

Одержана біомаса характеризується дуже низькою токсичністю ЛД₅₀ більше 20г/кг маси мишей.

Штам *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 характеризується високим рівнем антагоністичної активності, по відношенню до патогенної і умовно патогенної мікрофлори людини (табл. 2). Крім того, виявлені інші біологічні властивості штаму:

- імуномодуючі;
- неспецифічна нуклеазна активність;
- стійкість до антибіотиків, які застосовуються в клінічній практиці та ін.

Слід відмітити, що, в залежності від умов культивування, співвідношення компонентів поживного середовища, одні властивості (наприклад, імуномодуючі) можуть підсилюватись, інші - (антагоністичні) зменшуватись (табл. 2).

Таблиця 2

Антагоністична активність *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702, по відношенню до різних видів мікроорганізмів

№ п/п	Тест-штам	Зона пригнічення росту, мм
1	<i>Escherichia coli</i> 011	22
2	<i>Escherichia coli</i> 055	21
3	<i>Escherichia coli</i> K-12	5
4	<i>Escherichia coli</i> K-1	17
5	<i>Proteus vulgaris</i>	10
6	<i>S.typhimurium</i>	23
7	<i>Serratia marcescens</i>	-
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
9	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	25

10	Staphylococcus aureus 209	33
11	Candida albicans	-

Таблиця 3

Імуностимулюючий ефект лізатів клітин *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702, в залежності від складу джерел азоту

№ п/п	Варіант середовища	Рівень активності при розведенні				
		10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
1	Ферментолізат казеїну	++	+++	++	+	+
2	Ферментолізат соєвого борошна	+	+	+	+	-
3	Суміш ферментолізатів і екстрактів (дослідно-промисловий варіант)	-	+	+	+	-
4	MRS	-	-	++	+	+

Примітка.

- відсутність стимулюючого ефекту;
- + слабкий стимулюючий ефект;
- ++ помірний стимулюючий ефект;
- +++ сильний стимулюючий ефект.

Таблиця 4

Вплив складу середовищ на накопичення біомаси клітин *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702

Середовище	Накопичення біомаси, % від контролю
Ферментолізат казеїну	65,0
Ферментолізат соєвого борошна	78,0
Суміш ферментолізатів і екстрактів	105,0
MRS (контроль)	100,0

Як видно із даних таблиць 3, 4, виробничий варіант приготування середовища і вирощування культури дозволяє одержувати біомасу зі стабільними властивостями.

Біомаса, яку одержують по вищенаведеній технології, може бути субстанцією для виготовлення високоефективних гастроентерологічних препаратів (аналоги - Нормофлор (Болгарія), Лактобактерін (Росія), гепатопротекторних і імуномодулюючих препаратів, харчової добавки, молочнокислих заквасок.

Дослідження по підборі ефективних доз, схем і способів введення цих препаратів, їх нешкідливості, проводять в спеціалізованих закладах МОЗ України.

Якщо із біомаси за спеціальною технологією готувати препарати, то можна одержати субстанції зі стабільними властивостями і широким спектром фармакологічної дії.

Приклад 1. Посівне поживне середовище MRS в пробірці засівали штамом *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 із ампули і витримували 24 години при температурі (40±1)°C, після чого культуру пересівали в колбу ємністю 0,75л з 0,3л поживного середовища MRS або середовища №1 і термостатували 24 год при температурі (40±1)°C.

Культивування в дослідно-промислових умовах проводили в ферментаторі об'ємом 10м³ з інокулятором об'ємом 1,2м³. Для засіву інокулятора використовували однодобову культуру *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 із колби, витрата посівного матеріалу дорівнювала 5,0л на 500л поживного середовища. Використовували поживне середовище такого складу, %:

Калій фосфорнокислий однозаміщений	0,18
Магній сірчанокислий 7-водний	0,015
Марганець сірчанокислий 5-водний	0,005
Цукор-пісок	0,80
Ферментолізат казеїну	1,8
Ферментолізат соєвого борошна	0,8
Дріжджовий екстракт	1,8
Екстракт кукурудзяний	0,4

Ферментолізати і екстракт дріжджовий використовували готові, в сухому вигляді, для економії часу, енерговитрат і з метою одержання стабільних результатів. Змішували всі компоненти поживного середовища, стерилізували в ферментаторі при температурі (126-128)°C 40хв. Після охолодження середовища до 40°C проводили засів інокулятора однодобовою посівною культурою штаму, яка вирощена на середовищі MRS.

Культивування проводили в анаеробних умовах при температурі 40°C протягом 8-16 годин, після чого інокулят в асептичних умовах пересівали в підготовлене поживне середовище (7,0м³). Ріст культури в ферментаторі супроводжується закисанням поживного середовища, збільшенням оптичної густини культуральної рідини. Через 12 годин при стабілізації росту культури (рН=4,0, ОГ=2,3), процес культивування припиняли, охолоджуючи культуральну рідину в ферментаторі оборотною водою до температури 20°C. Потім культуральну рідину сепарували на сепараторі Westfalia при швидкості подачі 200-250л/год. Відокремлену біомасу вивержали із сепаратора, заморожували при температурі мінус 35°C або висушували на сублімаційній сушарці. Вихід вологої біомаси складав 4,0кг/м³ або 28,0кг з однієї виробничої операції (V_{середовища}=7,0м³). В результаті одержана біомаса

коричневого кольору з вологістю 84%, кількість життєздатних клітин $2 \cdot 10^8$ кл/г, нешкідливість більше 100мг/мишу, що відповідає вимогам НТД.

Приклад 2. Одержання біомаси штаму *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* 9702 здійснювали способом, який описаний в прикладі 1.

Після вивантаження із сепаратора половину вологої біомаси в асептичних умовах змішували зі стабілізатором. Біомасу зі стабілізатором сушили в сублімаційній сушарці ТГ-50.

Якісні характеристики висушеної біомаси наступні: порошок коричневого кольору, вологість 7%, нешкідливість більше 100мг/мишу, що також відповідає вимогам НТД.