



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР (ГОСПАТЕНТ СССР)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(19) SU (11) 1469613 A1

(51) S A 61 K 35/66



1

(21) 4193794/13

(22) 13.02.87

(46) 30.10.93 Бюл. № 39-40

(71) Институт технической теплофизики АН УССР,
Всесоюзный научно-исследовательский институт
биотехнологии

(72) Волкова Н.Т.; Платонов А.В.; Микалевич В.В.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО
ПРЕПАРАТА "ПРОПИОВИТ"

(57) Изобретение относится к технологии получения продуктов микробиологической промышленности и может быть использовано в пищевой промышленности, ветеринарии и сельском хозяйстве. Цель изобретения - ускорение процесса и повышение выхода целевого продукта. Бактериальный препарат "Пропиовит" на основе выделенных из рубца пропионовокислых бактерий *Propionibacterium asnes* ВКПМ - 1967 и продуктов их метаболизма получен при ферментации на питательной среде следующего состава, мас.%: глюкоза 1,0 - 1,5; кукурузный экстракт 1,0 - 2,5; хлористый кобальт 2,5 - 3,3 мг%; сернистый аммоний 0,05 - 2,5; водопроводная вода до 100, в течение 40-48 ч при темпе-

2

ратуре 37 - 38°C и периодическом перемешивании в течение 5 - 6 мин до максимального накопления биомассы пропионовых бактерий и содержания аминокислот азота 28-40 мг%, углеводов 0,56 - 0,8%, сухих веществ 2 - 5%, с понижением pH до 4,5 - 4,9, после чего культуральную жидкость усредняют 40%-ным раствором NaOH до значения pH 6,5 - 7,0, смешивают с защитными добавками и наполнителем и обезвоживают до остаточной влажности не выше 5-8%. Накопленные в процессе ферментации живые пропионовокислые бактерии и продукты их жизнедеятельности, витаминные группы B и летучие жирные кислоты после внесения защитных добавок и наполнителя обезвоживают до остаточной влажности не выше 8%. Данный препарат используется при скармливании животным и птице для повышения противояснотного эффекта сельскохозяйственных животных и птицы, повышения яйценоскости кур, регуляции стрессов после перевозки и перегруппировки, а в ветеринарии как профилактическое средство в борьбе с дисбактериозом животных и птицы и кетозом коров. 1 зл. ф.-лы, 7 табл.

(19) SU

(11) 1469613 A1

Изобретение относится к технологии получения продуктов микробиологической промышленности и может быть использовано в пищевой промышленности, ветеринарии и сельском хозяйстве.

Целью изобретения является ускорение процесса и повышение выхода целевого продукта.

Изобретение заключается в следующем.

Для повышения питательной ценности и качества бактериального препарата используют культуру рудцовых пропионовых бактерий *Propionobacterium asnes*, шт.Фз ВКПМ В-1967, и продуктов их метаболизма, витаминами группы В и летучие жирные кислоты), выращенную на модифицированной глюкозо-кукурузной среде следующего состава, %: глюкоза 1,0-1,5; кукурузный экстракт 1,0-2,5; $CoCl_2$ 2,5-3,3 мг%; сернокислый аммоний 0,05-2,5; водопроводная вода до 100. Значение pH питательной среды до стерилизации устанавливается 6,7-7,0, после стерилизации не ниже 6,3-7,0. Посевной материал вносится в количестве 7-10%. Выращивание ведут в течение 40-48 ч при температуре 37-38°C при периодическом перемешивании в течение 5-6 мин. К концу срока выращивания количество бактериальных клеток составляет 600-700 млн/мл, pH культуральной жидкости снижается до значений 4,5-4,9, содержание аминокислотного азота - до 28,56-40,0 мг%, углеводов - до 0,56-0,8%, сухих веществ до 2-3%.

Культуральную жидкость с pH 4,5-4,9 усредняют 40%-ным раствором NaOH до значений pH 6,5-6,8. Обезвоживание ведут в сушилке псевдо кипящего слоя при температуре 60-70°C после смешивания с защитной средой и наполнителем или в распылительной сушилке (Anhydro) при температуре 130-140°C на входе после добавления защитной среды и наполнителя концентрированием культуральной жидкости при температуре раствора 40-50°C до содержания сухих веществ 4-10% смешиванием концентрата с защитными добавками и наполнителем и гранулированием смеси с последующей сушкой влажных гранул в кипящем слое при температуре 50-60°C до остаточной влажности 5-8%.

Описание процесса по стадиям.

1. Выращивание. Культуру пропионовых бактерий выращивают на модифицированной глюкозо-кукурузной среде следующего состава, %: глюкоза 1,5; кукурузный экстракт 1,0; $CoCl_2$ 3,3 мг%; сернокислый аммоний 0,05; водопроводная вода до 100 мл. Значение pH питательной среды

до стерилизации устанавливают не выше 6,7-6,8, после стерилизации - не ниже 6,3. Для увеличения вязкости питательной среды и создания более благоприятных условий для культивирования пропионовых бактерий в питательную среду можно добавлять 3-5% наполнителей, например муки, отрубей, солодовых ростков, кормовых дрожжей, так как крахмал, мука, отруби, а также азотистые соединения солодовых ростков, дрожжей являются не только питательными веществами, но и служат для сохранности бактерий в процессе сушки.

Питательную среду инокулируют двухсуточной культурой. Посевной материал вносят в количестве 7-10%. Культуру выращивают в ферментере в течение 48 ч при температуре 37°C при периодическом перемешивании в течение 5-6 мин. К концу срока выращивания количество бактериальных клеток составляет 600-700 млн/мл, pH культуральной жидкости снижается до значений 4,5-4,9; содержание аминокислотного азота 28,56 мг%, углеводов 0,56%, сухих веществ 2%.

2. Концентрирование. Культуральную жидкость, имеющую pH 4,5-4,9, усредняют 40%-ным раствором NaOH до значений 6,5-6,9. В связи с тем, что в культуральной жидкости по окончании выращивания пропионовых бактерий остаются углеводы до 0,56% и аминокислотный азот до 29,56 мг%, которые могут служить защитными веществами, то при концентрировании дополнительное введение защитных добавок обязательно.

Упаривание проводят на роторно-пленочном аппарате при температуре упариваемого раствора 40-50°C до содержания в концентрате сухих веществ 4-10% (объем исходной культуральной жидкости уменьшается в 2-5 раз). Подведение pH культуральной жидкости до нейтральных значений необходимо для ослабления ингибирующего действия образовавшихся пропионовой и уксусной кислот и увеличения выхода бактериальных клеток при концентрировании культуральной жидкости.

Содержание углеводов в концентрате составило 1,4%, а аминокислотного азота 46,73 мг%. В процессе концентрирования изучали зависимость выживаемости пропионовых бактерий от температуры и кратности упаривания. Перед концентрированием значение pH культуральной жидкости после 48 ч выращивания доводили до 6,3-7,0 (табл.2).

3. Гранулирование смеси концентрата и наполнителя проводят как с защитной средой, так и без нее.

При гранулировании без защитной среды выживаемость бактерий достигает 70,5-94%. Добавка только 1% мелассы позволяет получить выживаемость в процессе гранулирования 100%.

Влияние традиционных защитных добавок при гранулировании давало положительный эффект, но в данном случае можно ограничиться только мелассой, не используя сухое молоко и т.д.

4. Влияние защитных сред особенно четко проявляется при высушивании влажных гранул. Если при сушке выживаемость составляла 19,85-28,2%, то добавление 1% мелассы повысило число жизнеспособных клеток в 2,3 раза (табл. 4).

Важными моментами при высушивании влажных гранул являются температура теплоносителя и время сушки. Влажный гранулированный продукт (с влажностью не менее 30%) подвергают высушиванию в кипящем слое при температуре 40-60°C в течение 4-8 мин. Полученный сухой продукт в виде мелких гранул светло-желтого цвета должен иметь остаточную влажность не выше 8%.

В табл. 5 приведены средние результаты по всей технологической цепочке до получения конечного продукта.

Исследования показали, что процесс сушки гранулированного продукта при данном способе целесообразно вести при температуре воздуха 50-60°C в течение 6-8 мин. Получаемый продукт должен иметь влажность не более 8%.

Пример 1. Двухсуточную освеженную культуру пропионовых бактерий Prop. asnes с количеством клеток 450 млн/мл засевают в ферментер с питательной средой следующего состава, мас. %: глюкоза 1,5; кукурузный экстракт 1,0; сернистый аммоний 0,05; $CoCl_2$ 3,3 мг%; водопроводная вода, pH питательной среды до стерилизации не выше 7,0, после стерилизации не ниже 6,3. Выращивание культуры проводят при температуре 37°C в течение 48 ч при периодическом перемешивании через каждые 12 ч в течение 6 мин. К концу выращивания в культуральной жидкости содержится не менее 900 млн/мл клеток пропионовых бактерий; 0,56 углеводов; 28,56 мг% аминокислотного азота; до 2% сухих веществ; pH культуральной жидкости снижается до значений 4,5-5,0.

Перед концентрированием pH культуральной жидкости доводят до значений 6,5 40%-ным раствором NaOH. Культуральную жидкость упаривают в 2 раза при температуре 40°C до содержания сухих веществ 4-5%. Содержание в концентрате углеводов

1,4%, а аминокислотного азота 46,73 мг%. Количество клеток в 1 мл концентрата составило 1-1,2 млрд.

К объему концентрата (из расчета 1%) добавляют защитную среду (мелассу) и в качестве наполнителя кукурузную муку в соотношении 3:7. Влажность сырого продукта 30%.

10 Влажный гранулированный препарат сушат при температуре 50-60°C в течение 6-8 мин до остаточной влажности не более 8%.

15 Сухой гранулированный продукт светло-желтого цвета с влажностью 8% и содержанием пропионовых бактерий в 1 г не менее 1 млрд. расфасовывают в полиэтиленовые пакеты по 10 г.

20 **Пример 2.** Выращенную культуру пропионовых бактерий так же, как и в примере 1, но с количеством клеток в 1 мл 500 млн, концентрируют до содержания сухих веществ 10%, гранулируют и сушат в тех же условиях, что и в примере 1.

25 **Пример 3.** Культуральную жидкость пропионовых бактерий, полученную по описанному способу в примере 1, нейтрализуют до значений pH 6,8, смешивают с защитной средой и напыляют на наполнитель (кукурузная мука, отруби и т.д.) с последующей сушкой в псевдокипящем слое при 60-70°C. Культуральную жидкость и наполнитель смешивают в соотношении 1:1. Для увеличения выхода жизнеспособных клеток пропионовых бактерий можно использовать комбинированный наполнитель, например, в следующей композиции: сухое молоко - кукурузная мука - кормовые дрожжи 1:1:1.

40 **Пример 4.** Культуральную жидкость, полученную как в примере 1, нейтрализуют 40%-ным раствором NaOH до значений pH 6,8 т, высушивают при добавлении 3% мелассы в качестве защитной среды и наполнителя, например кукурузной муки, кормовых дрожжей и т.д., на распылительной сушилке (Anhydro) при температуре воздуха на входе 130-140°C и 70-75°C на выходе. В результате получают пылевидный продукт с влажностью не более 8,0% и количеством бактерий 1,0 млрд./г.

50 При влиянии дисперсности распыла на качество сухого продукта установлено, что скорость вращения диска 46 тыс. об/мин дает лучшие показатели, чем 26 тыс. об/мин.

55 Предполагается использование препарата, полученного предлагаемым способом и содержащего как живые клетки пропионовых бактерий, так и продукты их метаболизма (витамины группы B и летучие жирные кислоты), в животноводстве, птицеводстве

для повышения привесов молодняка сельскохозяйственных животных и птицы, повышения яйценоскости кур, регуляции стрессов после перевозки и перегруппировки, а в ветеринарии как профи-

лактическое средство в борьбе с дисбактериозом животных и птицы и кетозом коров.

(56) Авторское свидетельство СССР №1236630, кл. А 61 К 35/66, 1985.

Таблица 1

Влияние наполнителей в питательной среде на рост пропионовых бактерий при выращивании

Наполнитель	Количество бактерий в к. ж., млн/мл	Урожай, кл/мл
Кукурузная мука	580	448,8
Пшеничная мука	532,5	401,3
Соевая мука	862,5	731,3
Кормовые дрожжи	893,8	762,6
Отруби	853,3	722,6
Солодовая дробина	515,0	383,8

Таблица 2

Влияние кислотности среды на выживаемость клеток пропионовокислых бактерий при концентрировании

Значение pH культуральной жидкости перед концентрированием	Количество бактерий в исходной культуральной жидкости, млрд/г сухих веществ	Количество бактерий в концентрате, млрд/г сухих веществ	% жизнеспособных клеток	Примечание
5,3	16,37	-	100	Концентрирование проходило при температуре 40°C. Кратность концентрирования 3
5,3	16,37	13,82	28,10	
6,0	16,37	15,37	31,30	
7,0	16,37	17,51	35,66	
6,3	16,37	13,36	37,46	Концентрирование проходило при температуре 40°C. Кратность концентрирования 2
6,0	16,37	29,75	90,86	
7,0	16,37	17,31	52,86	

Таблица 3

Защитная среда, содержание компонентов, %	Влажный гранулированный продукт		
	Влажность, %	Количество жизнеспособных клеток, млн/г	Выживаемость, %
Без защитной среды	32	40,25	94,1
Меласса, 1	35,0	42,30	100
Без защитной среды	38,0	38,1	70,47
Меласса, 1	37,0	54,02	100
Без защитной среды	35,0	41,8	76,5
Меласса, 1	37,0	54,0	100
Меласса, 1+сухое молоко, 10	35,0	56,32	100
Меласса, 1+сухое молоко, 10+дрожжи, 5	37,0	53,71	100

Таблица 4

Защитная среда, содержание компонентов, %	Сухой гранулированный продукт		
	Влажность, %	Количество бактерий, млн/г	Выживаемость, %
Без защитной среды	7,0	12,25	19,85
Меласса, 1,0	7,0	27,3	43,26
Без защитной среды	7,4	13,57	28,24
Меласса, 1,0	7,0	70,76	100

Таблица 5

Получение эролизита в гранулированной форме

Испытуемый вариант	Режим концентрирования		Сухое вещество, %	Количество бактерий		% жизнеспособных	Гранулирование		
	Кратность	Температура, °C		в 1 мл	в 1 г сухих веществ		Сухое вещество, %	Количество бактерий	
				млн/мл	млн/г сухих веществ			1 кг влажного препарата	1 г сухих веществ
Культуральная жидкость Концентрат	2	40	2,005	87,15	4357,5	-	-	-	-
			3,69	233,4	6325,2	72,56	35,3 34,4	41,29 62,3	63,82 94,97
							35,15	129,53	195,74
Концентрат	2	50	4,85	293,45	6050,52	69,43	35,05	139,5	214,76
							34,75	101,5	155,56
							35,8	92,0	143,3
То же	5	40	9,53	1255	13038,96	99,85	33,7	338,8	511,01
То же	5	50	9,97	593,65	5954,36	27,33	35,25	241,38	372,79

Продолжение таблицы 5

Испытуемый вариант	% жизнеспособных	Температура, °С	Время, мин	Сушка Влажность, %	Количество бактерий		% жизнеспособных бактерий
					млн/г сухих веществ		
					млн/мл	млн/г сухих веществ	
Культуральная жидкость Концентрат	57,31	40	4	14,26	95,54	111,43	174,6
			6	8,5	23,58	25,77	40,38
			8	7,6	61,95	67,05	105,06
	85,29	50	4	9,7	20,05	22,29	23,38
			6	6,43	29,43	31,47	33,14
			8	5,94	66,95	71,16	74,95
	107,54	60	4	8,08	55,62	60,51	30,29
			6	5,35	39,36	41,59	20,82
			8	5,66	37,9	40,17	20,11
	152,83	40	4	19,75	94,14	115,48	53,77
			6	7,10	42,68	48,27	21,54
			8	6,57	52,9	56,02	26,98
	110,69	50	4	9,93	108,25	120,18	77,25
			6	6,69	40,98	43,92	28,33
			8	5,69	22,05	23,41	15,05
	101,95	60	4	11,58	43,98	49,74	34,71
			6	5,97	19,05	20,26	14,14
			8	5,33	159,32	168,29	117,44
	86,99	60	4	8,10	92,15	100,27	19,62
			6	6,11	163,75	174,41	34,13
			8	5,66	121,5	128,79	25,20
	131,02	60	4	7,08	85,0	91,48	24,54
			6	3,76	104,0	108,98	28,99
			8	3,73	29,5	24,41	6,55

Таблица 6

Выживаемость пропионовых бактерий при высушивании в псевдокипящем слое с разными наполнителями

Наполнитель	Массовое содержание компонентов	Количество бактерий, млн/г сухих веществ		% жизнеспособных клеток
		перед сушкой	после сушки	
Кукурузная мука	2,0:1	243,09	72,79	30,07
Сухое молоко		312,25	159,33	51,03
Кукурузная мука	1,5:1,5	312,25	160,13	51,28
Сухое молоко		312,25	218,98	70,13
Кукурузная мука	1,5:1:0,5	312,25	218,98	70,13
Кормовые дрожжи		312,25	218,98	70,13
Сухое молоко	1:1:1	312,25	242,38	77,62
Кукурузная мука		312,25	242,38	77,62
Кормовые дрожжи	312,25	242,38	77,62	

Таблица 7

Выживаемость пропионовых бактерий при распылительном высушивании

Режим высушивания		Скорость вращения диска, об/мин	Титр бактерий		Выживаемость, %
температура, °С, на			до высушивания, кл./г сухих веществ суспензии	после высушивания, кл./г сухих веществ порошка	
входе	выходе				
110-120	60-65	4600	$860,09 \cdot 10^9$	$85,25 \cdot 10^9$	9,91
130-140	70-75	4600	$677,22 \cdot 10^9$	$152,95 \cdot 10^9$	22,53
140-150	70-75	4600	$762,04 \cdot 10^9$	$31,58 \cdot 10^9$	4,14
130-140	70-77	4600	$648,75 \cdot 10^9$	$205,10 \cdot 10^9$	30,61
		2600	$484,34 \cdot 10^9$	$76,54 \cdot 10^9$	15,80

Формула изобретения

1. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА "ПРОПИОВИТ",

предусматривающий выращивание штамма *Propionibacterium acnes* ВКПМ В-1967 на питательной среде, содержащий глюкозу, кукурузный экстракт, хлористый кобальт, сернистый аммоний и воду, при температуре 37 - 38°C до максимального накопления биомассы и аминного азота, обезвоживание, смешение с защитными добавками и сушку, отличающийся тем, что, с целью ускорения процесса и повышения выхода целевого продукта, культивирование ведут на среде, содержащей указанные компоненты в следующем соотношении, мас. %: глюкоза 1,0 - 1,5; кукурузный экстракт 1,0 - 2,5; хлористый кобальт 2,5 - 3,3 мг %; сернистый аммоний 0,05 - 2,5 и водопроводная вода до 100, до достижения аминного азота 28 - 40 мг %, углево-

дов 0,56 - 0,8% и сухих веществ 2 - 5%, рН культуральной жидкости доводят 40%-ным раствором едкого натра до 6,5 - 7,0, обезвоживание проводят до остаточной влажности 5 - 8%.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что обезвоживание ведут в псевдокипящем слое при температуре 60 - 70°C.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что обезвоживание ведут распылительным методом при температуре 130 - 140°C на входе.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что обезвоживание ведут концентрированием культуральной жидкости при температуре раствора 40 - 50°C до содержания сухих веществ 4 - 10%, смешивая концентрат с защитными добавками и наполнителем, и гранулированием смеси с последующей сушкой влажных гранул в кипящем слое при температуре 50 - 60°C на входе до остаточной влажности 5 - 8%.

Составитель И.Привалова

Редактор Л.Павлова

Техред М.Моргентал

Корректор М.Демчик

Заказ 3191

Тираж

Подписное

НПО "Поиск" Роспатента
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5