



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **27038** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 1/04МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ КОНСЕРВУВАННЯ СПОРОВОЇ КУЛЬТУРИ STREPTOMYCES AUREOFACIENS**

1

2

(21) u200706914

(22) 19.06.2007

(24) 10.10.2007

(72) ЦУЦАЄВА АЛЛА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA,
АНАНЬІНА ГАННА ЄВГЕНІВНА, UA, БЕЛИБЕРДА
ЛЮДМИЛА МИХАЙЛІВНА, UA, ГРИША ІГОР
ГЕОРГІЙОВИЧ, UA, ЧЕРНИШЕНКО ЛЮДМИЛА
ГЕННАДІЇВНА, UA, ЩЕГЛОВ АНДРІЙ
ВІТАЛІЙОВИЧ, UA, ПАВЛЕНКО НЕОНІЛА
ВОЛОДИМИРІВНА, UA(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І
КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ, UA

(56)

(57) Спосіб консервування спорової культури
Streptomyces aureofaciens, який включає
виращування мікробних клітин на скошеному
регламентному живильному середовищі,
вилучення мікробної культури і заморожування-
висушування, який **відрізняється** тим, що
вилучення мікробних клітин здійснюють на
агарових пластинках товщиною 1,0 мм.

Корисна модель належить до кріобіології і мікробіології й може бути використана в мікробіологічній промисловості при виробництві антибіотиків.

Найбільш близьким до способу, який заявляється, є спосіб консервування спорової культури *Streptomyces aureofaciens* [1]. Згідно зі способом мікробну культуру вирощують на скошеному агаровому регламентному середовищі протягом 14 діб при температурі 28°C. Вилучення мікробної культури проводиться шляхом зіскоблювання клітин мікроорганізмів з поверхні скошеного агарового регламентного живильного середовища у пробірках зі штамом спорової культури. Потім у ці пробірки вносять однаковий об'єм одного з захисних середовищ (кінська сироватка, 10% сахароза + 1% желатина медична, знежирене молоко), мікробні клітини перемішують із захисним середовищем. Отриману клітинну суспензію у скляних ампулах заморожують у посуді із сумішшю вуглекислоти з етиловим спиртом (температура суміші -70-80°C) та переносять у вакуум-сушильний апарат для подальшого висушування протягом 6 годин. Залишкова вологість ліофілізованої мікробної культури складає 3-5%. Життєздатність культури після ліофілізації складає 12,9-44,9%. Після закінчення висушування зразки зберігають при температурі 4-10°C. Життєздатність ліофілізованої культури *Streptomyces aureofaciens* зберігається протягом 2 років.

Недоліками цього способу є те, що він не забезпечує високої життєздатності мікробної культури і є складним у виконанні.

В основу корисної моделі поставлено задачу, створити такий спосіб консервування спорової культури *Streptomyces aureofaciens*, у якому б, шляхом зміни способу вилучення мікробних клітин, забезпечувалася можливість підвищити життєздатність мікробної культури, а також спростити процес консервування.

Ця задача вирішується тим, що в способі консервування спорової культури *Streptomyces aureofaciens*, який включає виращування мікробних клітин на скошеному агаровому регламентному живильному середовищі, вилучення мікробної культури і заморожування-висушування, згідно з корисною моделлю, вилучення мікробних клітин здійснюють на агарових пластинках товщиною 1,0 мм.

Зміна умов вилучення мікробних клітин дає можливість підвищити життєздатність мікроорганізмів на 33,5%, а також скоротити процес консервування, знизити трудомісткість способу й затратуваних на його здійснення засобів. Це пов'язане з тим, що вилучення мікробної культури здійснюється безпосередньо на агарових пластинках з ростовим середовищем і таким чином запобігаються пошкодження мікробної культури, які відбуваються у прототипі, де пошкодження пов'язане з процесом зіскоблювання мікробних клітин. Використання тонкого шару агарового живильного середовища

(13) **U**(11) **27038**(19) **UA**

скорочує процес висушування, що дає можливість скоротити час перебування мікробної культури під дією фізико-хімічних факторів, призводящих до загибелі клітин. Після зберігання ліофілізованих зразків при температурі 4-10°C протягом 4 років життєздатність спорової культури *Streptomyces aureofaciens* складає $(2,64 \pm 0,1200) \times 10^2$ кл/мл, тоді як мікробна культура, яка вказана у прототипі, гине після 2 років зберігання.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Спорову культуру *Streptomyces aureofaciens* вирощували протягом 14 діб при температурі 28°C на скошеному агаровому регламентному живильному середовищі при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

| | |
|--|-------|
| Екстракт кукурудзяний | 1,0 |
| Крохмаль картопляний | 2,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0,4 |
| MgSO ₄ | 0,025 |
| CaCO ₃ | 0,1 |
| Агар-агар | 2,0 |
| Вода дистильована | інше |

Агарові пластинки з мікробними клітинами, товщиною 1,0мм, знімали зі скошеного агарового регламентного живильного середовища гострим шпателем разом із шаром агарового середовища, потім їх містили на дно пеніцилінових флаконів. Флакони з агаровими пластинками ставили у металеві касети, які розміщували на полках установки заморожування-висушування УЗВ-2 виробництва СКТБ з ДВ ІПКІК НАН України. Зразки заморожували зі швидкістю 2°C/хв. до початкової температури висушування -20°C та висушували протягом 1 години. Залишковий тиск у камері установки заморожування-висушування складав 1,33Па. Після закінчення висушування флакони із зразками укупорювали у парах сухого азоту гумовими пробками та завальцьовували металевими ковпачками. Залишкова вологість зразків після висушування складала 2%. Регідратацію ліофілізованих зразків проводили протягом 10 хвилин шляхом додавання дистильованої води. Життєздатність мікробної культури оцінювали за числом сформованих макроколоній на агаровому регламентному живильному середовищі. Результати наведені у таблиці 1.

З таблиці 1 видно, що при консервуванні мікробної культури способом, який заявляється, життєздатність складала 78,6%. Залишкова вологість зразків дорівнювала 2,0%. Тривалість процесу висушування становила 1 годину.

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що спори мікробної культури знімали гострим шпателем із шаром живильного середовища різної товщини: 0,5мм та 1,5мм. Результати наведені в таблиці 1.

З таблиці видно, що при товщині агарових пластинок 0,5мм після консервування мікробної спорової культури її життєздатність була на 5% нижче, ніж при використанні агарових пластинок товщиною 1мм. Залишкова вологість зразків була менш на 0,5%. Але тривалість процесу висушування не змінювалася і складала 1 годину. Збільшення товщини агарових пластинок до 1,5мм

приводило до зниження життєздатності спорової культури після висушування на 16,2%. Залишкова вологість збільшувалася на 0,5%. При цьому тривалість процесу висушування збільшувалася на 0,5 години, що підвищувало трудомісткість способу і вимагало великих витрат засобів (електроенергія, рідкий азот, захисні середовища та інші).

Таким чином, у порівнянні з прототипом заявлений спосіб дає можливість підвищити життєздатність мікробної культури, зменшити тривалість процесу консервування і, крім того, знизити витрати засобів.

Приклад 3. Консервування спорової культури *Streptomyces aureofaciens* проводили згідно з прототипом у різних захисних середовищах (кінська сироватка, 10% сахароза +1% желатина медична і знежирене молоко).

Спорову культуру *Streptomyces aureofaciens*, як у прототипі, вирощували протягом 14 діб при температурі 28°C на скошеному агаровому регламентному живильному середовищі при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

| | |
|--|-------|
| Екстракт кукурудзяний | 1,0 |
| Крохмаль картопляний | 2,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0,4 |
| MgSO ₄ | 0,025 |
| CaCO ₃ | 0,1 |
| Агар-агар | 2,0 |
| Вода дистильована | інше |

Вилучення мікробної культури проводилося шляхом зіскоблювання клітин мікроорганізмів з поверхні скошеного агарового регламентного живильного середовища у пробірках зі штамом спорової культури. Потім у ці пробірки вносили однаковий об'єм захисного середовища (кінська сироватка, 10% сахароза + 1% желатина медична і знежирене молоко), мікробні клітини перемішували із захисним середовищем. Отриману клітинну суспензію розливали по 1мл у пеніцилінові флакони, котрі вміщали у посуд із сумішшю вуглекислоти з етиловим спиртом (температура суміші складала - 70-80°C) на 10 хвилин для заморожування та переносили у вакуум-сушильний апарат для подальшого висушування протягом 6 годин. Залишкова вологість висушеної мікробної культури складала 3-5%. Результати наведені у таблиці 2.

З таблиці видно, що після консервування мікробної спорової культури відомим способом життєздатність складала 12,9%-44,9%, що нижче, ніж у способі, який заявляється. При цьому залишкова вологість зразків після 6 годин висушування складала 3,1-4,8%.

Життєздатність спорової культури *Streptomyces aureofaciens* після консервування на агарових пластинках

| Товщина агарового шару, мм | Життєздатність мікробної культури, кл/мл ($\times 10^7$) | | |
|----------------------------|--|------|--|
| | x \pm Sx | % | |
| 0,5 | 4,27 \pm 0,1400 | 73,6 | |

| 5 | | 27038 | 6 | |
|-----|---------------|-------|-----|----|
| 1,0 | 4,58 ± 0,1000 | 78,6 | 2,0 | 60 |
| 1,5 | 3,62 ± 0,1200 | 62,4 | 2,6 | 90 |

Таблиця 2

Життєздатність спорової культури *Streptomyces aureofaciens* консервованої за прототипом

| Захисні середовища | Вихідна життєздатність, кл/мл ($\times 10^7$) | Життєздатність після ліофілізації | | Тривалість ліофілізації |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|------|----------------------------|
| | $\bar{x} \pm Sx$ | $\bar{x} \pm Sx$ | % | % |
| Кінська сироватка | 4,0 ± 0,0013 | 0,57 ± 0,1415 | 12,9 | 6 |
| 10%сахароза+ 1% желатини медичної | 2,10 ± 0,1990 | 0,46 ± 0,1431 | 21,9 | 6 |
| Знежирене молоко | 1,5 ± 0,0280 | 0,69 ± 0,1415 | 44,9 | 6 |

Джерела інформації:

1. Семенов С.М. Сравнительная оценка сред
суспендирования при лиофилизации
актиномицетов //Антибиотики.-1973.-т.18.-№11.-
С.1026-1029.