

Изобретение относится к биотехнологии, а также микробиологии и касается выращивания микроорганизмов.

Прототипом выбрана "Питательная среда для производственного культивирования лактобактерий штамма *Lactobacterium plantarum* 8-PA-3", в состав которой входит гидролизат соевого шрота (существенный признак) с содержанием аминного азота 120-150мг% (0.12-0,15%), а также глюкоза, цистеин солянокислый, цитрат аммония, ацетат натрия, магний сернокислый, калий фосфорнокислый двузамещенный, твин-80, вода.

Недостатками этой питательной среды являются, во-первых, ее ограниченное использование только для производственного культивирования лактобактерий штамма *Lactobacterium plantarum* 8-PA-3, и, во-вторых, довольно сложная рецептура, в состав которой входят такие дефицитные и дорогостоящие компоненты как глюкоза, цистеин солянокислый, цитрат аммония, ацетат натрия, калий фосфорнокислый двузамещенный, твин-80. Ссылки на возможность использования этой среды для культивирования других видов бактерий в описании изобретения отсутствуют, что, по-видимому, связано с вышеуказанной ее спецификой (сложностью рецептуры),

Таким образом, анализ уровня техники позволяет утверждать, что хотя продукты из соевых бобов широко используются для создания микробиологических питательных сред их применение ограничивается как из-за дефицитности и дороговизны исходного сырья (соевых бобов), так и из-за того, что эти среды предназначены для культивирования ограниченного круга бактерий и вследствие этого являются малодоступными для повседневного использования в практических микробиологических лабораториях.

В основу изобретения поставлена задача создание микробиологической питательной среды на базе отходов производства, в которой в качестве питательной основы использованы соевые промывные воды, полученные при изготовлении белково-жирового обогатителя из соевых бобов, что обеспечивает конструирование эффективной по ростовым свойствам, простой, дешевой и доступной питательной среды для культивирования различных групп бактерий.

Поставленная задача решается тем, что микробиологическая питательная среда, содержащая питательную основу из отходов обработки соевых бобов и воду, согласно изобретению в качестве питательной основы содержит сухой ферментативный гидролизат гидротермически обработанных соевых промывных вод и дополнительно содержит пептон, натрий хлористый, агар, а в качестве воды - дистиллированную воду, при следующем количественном соотношении компонентов, г/л:

Сухой ферментативный гидролизат соевых промывных вод	10,0-30,0
Пептон	9,0-12,0
Натрий хлористый	3,0-9,0
Агар	10,0-20,0
Дистиллированная вода	Остальное

Причинно-следственная связь между совокупностью существенных признаков изобретения и достигаемым техническим результатом. В соевых промывных водах содержится большое количество белков, сахаров, минеральных веществ и витаминов, сохраняющихся в сухом остатке, введение которого в питательную среду способствует хорошему размножению бактерий, а добавление лептона и натрия хлористого усиливает этот эффект. Введение агара (сложного полисахарида) позволяет получить плотную питательную среду. В результате утилизации этих вод с добавлением указанных компонентов получается питательная среда для выращивания широкого круга микроорганизмов.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Пример 1. Для приготовления среды берут компоненты в следующем соотношении, г/л:

Сухой ферментативный гидролизат соевых промывных вод	10,0
Пептон	9,0
Натрий хлористый	9,0
Агар	10,0
Дистиллированная вода	Остальное

Гидролизат соевых промывных вод, взятый в качестве питательной основы, получают следующим образом. Шелушенные соевые бобы заливают водой, имеющей температуру около 50°C, и оставляют на 2ч. (соотношение бобов и воды 1:3 по исходной массе). В процессе замачивания периодически снимают всплывшую на поверхность кожуру и пену. Через 2ч. жидкость сливают в специальную емкость, а бобы заливают новой порцией воды при тех же условиях (температура воды примерно равна 50°C) и замачивают в течение двух часов. После этого вторые промывные воды объединяют с первыми. Затем соевые бобы подвергают автоклавированию при 126°C (1,5кгс/см²) при соотношении массы бобов после замачивания и воды 1:3. Образовавшиеся после автоклавирования соевые воды собирают. Цвет соевых промывных вод после замачивания и не прошедших автоклавирования соломенно-желтый, а прошедших автоклавирование - светло-коричневый. Затем соевые воды, не прошедшие автоклавирование и прошедшие его, подвергают разделению ферментативному гидролизу (например, проназой) при температуре 37°C в течение двух часов. Фермент добавляют из расчета 10мг на 1л промывных вод (0,001%). Полученные гидролизаты дополнительно осветляют. Для этого используют белок куриного яйца, который добавляют к охлажденному ниже 50°C гидролизату (один белок на 1л гидролизата). Белок предварительно суспендируют в небольшом количестве гидролизата. После добавления белка гидролизат хорошо размешивают и кипятят 10мин., а затем фильтруют.

Для осветления гидролизата используют также природный энтеросорбент лигносорб по следующей методике: его добавляют в количестве 1% (10г на 1л гидролизата), хорошо перемешивают и оставляют на 30мин. После этого смесь центрифугируют 5мин при 2000об/мин

Для приготовления питательной среды используют полученные гидролизаты как каждый в отдельности, так и после их смешивания.

В жидком гидролизате содержание аминного и общего азота соответственно составляет 0,059-0,090% и 0,072-0,144%, а углеводов - 1,08-1,50%. С целью концентрации указанных веществ и консервации гидролизата его подвергают лиофильному высушиванию на лиофилизаторе марки ОЕ-960. При этом гидролизат предварительно замораживают при температуре -20°C, а затем подвергают сушке при 40°C. В сухом гидролизате

содержание аминного и общего азота соответственно составляет 1,7-3,2% и 2,8-4,1%, а углеводов - 42,5-45,1%.

Для приготовления среды по примеру 1 смесь нагревают до растворения ингредиентов, фильтруют, разливают в стерильную лабораторную посуду (флаконы, пробирки и т.п.), стерилизуют, pH готовой среды составляет 7,3-7,4.

Пример 2. Берут следующее соотношение компонентов, г/л:

Сухой ферментативный гидролизат соевых промывных вод	30,0
Пептон	12,0
Натрий хлористый	3,0
Агар	20,0
Дистиллированная вода	Остальное

Далее среду готовят как описано в примере 1.

Пример 3. Берут следующее соотношение компонентов, г/л:

Сухой ферментативный гидролизат соевых промывных вод	20,0
Пептон	10,0
Натрий хлористый	6,0
Агар	15,0
Дистиллированная вода	Остальное

Далее среду готовят как описано в примере 1.

При создании различных рецептов микробиологической питательной среды исходили из того, что введение в ее состав сухого ферментативного гидролизата соевых промывных вод и пептона, как основных питательных ингредиентов среды, должно быть пропорциональным.

Для оценки ростовых свойств предлагаемой среды в сравнении с контрольной (мясопептонный агар с содержанием аминного азота 0,074%) использовали биологические показатели - рост тест-штаммов при посеве 100 расчетных бактериальных клеток, полученных методом серийных разведений из одномиллиардной взвеси суточных культур (1млрд/мл), приготовленной с использованием оптического стандарта мутности. Основные результаты сравнительного испытания контрольной среды с вариантами предлагаемой среды, описанными в примерах 1-3, приведены в таблице. При этом оказалось, что тест-штаммы по всхожести, количеству выросших колониеобразующих единиц (КОЕ), а также по их размеру не уступали росту и размеру КОЕ на контрольной среде, а в некоторых случаях даже их превосходили. Так, всхожесть КОЕ наблюдалась уже после 17-18-ти часов инкубации при 37°C как на опытной среде, так и на контрольной. Количество выросших КОЕ в зависимости от использованной рецептуры равнялась для *Staphylococcus aureus* 209-P от 51% до 62%, на контрольной среде - 69%. Для *Pseudomonas aeruginosa* 62 от 77% до 89%, на контрольной - 85%. Для *Proteus vulgaris* 127 от 64% до 75%, на контрольной среде - 60%. Для *Escherichia coli* M-17 от 62% до 91%, на контрольной - 70%. Средний размер выросших КОЕ также в большинстве случаев не уступал этому показателю на контрольной среде.

При использовании опытных сред в сравнении с контрольной для определения чувствительности к 12-ти антибиотикам методом диффузии в агар с применением бумажных дисков, пропитанных стандартным раствором антибиотиков, у 4-х вышеуказанных тест-штаммов и 8-ми свежeweделенных бактериальных культур были получены совпадающие результаты, т.е. антибиотикограмма каждого из изученных штаммов, определенная на опытной среде, не отличалась от антибиотикограммы, определенной при использовании контрольной среды.

Сравнительное определение способности к пигментообразованию у стафилококков (5 штаммов) на опытных и контрольной среде показало, что интенсивность этого показателя, как при посеве культур "бляшками", так и на отдельные КОЕ была одинаковой как на опытных, так и на контрольной среде.

На Одесской противочумной станции проводилось испытание экспериментальных питательных сред на пригодность роста возбудителя холеры (штамм *Vibrio cholerae cholerae* P-1 (145)) с использованием оптимальной рецептуры (пример 3). Посев на опытную и контрольную (щелочной агар) среды 100 расчетных бактериальных клеток дал следующие результаты: через 15-18 часов инкубации при 37°C на опытной среде выросло 59 КОЕ, на контрольной - 55. На обеих средах КОЕ в S-форме, размером 1-2мм, прозрачные, плоские. Среда позволяет рассматривать КОЕ в проходящем свете.

Таким образом, проведенные исследования позволяют утверждать, что питательная среда, приготовленная на основе гидролизата соевых промывных вод, при оптимальных концентрациях введенных компонентов по своим ростовым свойствам не уступает составу известной питательной среды при снижении ее стоимости.

Среда	Количество и размер КОЕ, выросших при посеве 100 расчетных бактериальных клеток через 24 ч при температуре инкубации 37°C							
	Staphylococcus aureus 209-P		Pseudomonas aeruginosa 62		Proteus vulgaris 127		Escherichia coli M-17	
	Количество	Средний размер (в мм)	Количество	Средний размер (в мм)	Количество	Средний размер (в мм)	Количество	Средний размер (в мм)
Контрольная	69	1,9	85	2,0	60	2,5	70	2,6
Опытная по примеру 1	60	1,7	84	2,2	65	1,9	89	2,3
2	51	1,4	77	1,5	64	2,4	62	3,4
3	62	1,5	89	1,7	75	3,1	91	3,0