



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 58031

(13) A

(51) 7 A23K3/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ НА ТРОФІЧНИХ СУМІШАХ "ГПП" І "ЛАКТИС" (ВАРІАНТИ)

1

2

(21) 2002076382

(22) 31 07 2002

(24) 15 07 2003

(46) 15 07 2003, Бюл. № 7, 2003 р.

(72) Пенясов Геннадій Павлович

(73) Пенясов Геннадій Павлович, ЗАКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "ІНСТИТУТ "КРИМАГРОПРОЕКТ"

(57) 1 Спосіб культивування молочнокислих бактерій на трофічній суміші «ГПП», який включає завантаження в ємність компонентів живильного середовища, їхнє перемішування, інокулювання живильного середовища пересадною культурою молочнокислих бактерій, перемішування інокульованого живильного середовища у тару, термостатування і введення захисного середовища, який відрізняється тим, що основою живильного середовища є пшеничні висівки (42-50 мас. %) з вологістю 15-16 %, що завантажують у змішувач, а потім додають воду (до 100 мас. %), інокульовану суміш термостатують при температурі 30-36°C протягом 95-100 годин, при цьому як захисне середовище для збереження використовують вуглекислий газ, що утворюється при сублімації «сухого льоду», шматочки якого вводять у ємність для збереження.

2 Спосіб культивування молочнокислих бактерій на трофічній суміші «ЛАКТИС», який включає завантаження в ємність компонентів живильного середовища, їхнє перемішування, інокулювання живи-

льного середовища пересадною культурою молочнокислих бактерій, перемішування інокультанта і живильного середовища, вивантаження інокульованого середовища в тару, термостатування і захист сипосної закваски захисним середовищем, який відрізняється тим, що в живильне середовище на основі пшеничних висівок додатково введені цукор, крейда, ацетат натрію, сульфат марганцю і вода, при цьому живильне середовище містить зазначені компоненти при наступному співвідношенні, мас. %

|                  |         |
|------------------|---------|
| висівки пшеничні | 45-50   |
| цукор            | 3,0-3,5 |
| крейда           | 1,0-2,0 |
| ацетат натрію    | 1,0-2,0 |
| сульфат марганцю | 0,1-0,2 |
| вода             | інше,   |

при цьому спочатку в змішувачі змішують цукор, воду і мінеральні компоненти живильного середовища, потім додають інокультант і усі компоненти перемішують, а потім засипають пшеничні висівки з вологістю 15-16 %, отримане живильне середовище перемішують, після чого отриману суміш термостатують при температурі 30-36°C протягом 95-100 годин, при цьому як захисне середовище для збереження біоконсерванту використовують вуглекислий газ, що виділяється при реакції взаємодії молочної кислоти, що утвориться як продукт життєдіяльності молочнокислого стрептокока, з крейдою.

Винахід відноситься до мікробіологічної промисловості, а саме, до трофічних сумішей і сто-сується способів культивування молочнокислих бактерій, використовуваних для готування закваски для силосування кормів.

Відомі способи готування молочнокислої закваски для консервування продуктів рослинного походження, що передбачають культивування молочнокислих стрептококів і паличок на рідкому живильному середовищі, включаючому крейду, обрат і кукурудзяний екстракт.

Відомий «Спосіб готування молочнокислої закваски для консервування продуктів рослинного походження» (а с СРСР №492268, МПК А 23 К 3/00, БІ - 43 -75р), у якому живильне середовище містить суху молочну сироватку (34-36г/л), сухий кормовий концентрат вітаміну В<sub>12</sub> (5-7г/л) і крейду (4-6г/л), а технологія містить такі операції: підготовку сухого бактеріального концентрату, внесення молочнокислої бактерії, культивування протягом 6 годин, потім доведення рН бактеріального середовища до значення 6,3-6,5, внесен-

(13) A

(11) 58031

(19) UA

ня суміші молочнокислих бактеріальних культур і їхнє культивування протягом 9 годин, знову доведення рН бактеріального середовища до значення 6,3-6,5 і витримування протягом 3 годин, відділення біомаси, змішування з захисним середовищем і висушування. Отриманий бактеріальний концентрат вносять у живильне середовище і культивують протягом 10-16 годин до досягнення кислотності рН 4,4-4,7.

Недоліком цих живильних середовищ є висока вартість їх, а також складна технологія готування молочнокислих заквасок.

Відомий «Спосіб культивування молочнокислих чи пропіоновокислих бактерій» (а с СРСР №1711788, МПК А 23 К 3/00, БІ - 6 - 92р), у якому використане живильне середовище наступного складу, г/л: рибне борошно (10,0), пептон (5,0), глюкоза (20,0), лактоза (20,0),  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  (2,0), крохмаль н/раств (10,0),  $\text{CaCO}_3$  (5,0),  $\text{NaCl}$  (5,0), вода (до 1л).

Відомий також «Спосіб культивування молочнокислих і пропіоновокислих бактерій» (а с СРСР №1769837, МПК А 23 К 3/00, БІ-39-92р), у якому живильне середовище містить джерела вуглецю, азоту, мінеральні солі і відхід виробництва розеофунгіна у виді гідролізата міцелію продуцента.

Незважаючи на високий бактеріальний титр одержуваних заквасок по двох вищевказаних способах, ці способи і склади характеризуються складною технологією одержання і високими вартісними показниками кінцевого продукту.

Найбільш близько до технічної суті і результату, що досягається, і обраної як прототип є технологія виробництва сухих бактеріальних заквасок для силосування кормів по ОСТ 64-042-87, Закваски бактеріальні для силосування кормів сухі ТУ, яка використовує в якості основного живильного сухого середовища екстракт із відвару зеленої кукурудзи й утримуюча наступні технологічні операції - завантаження в реактор живильного середовища, перемішування і стерилізацію рідкого живильного середовища при 110°C, інокулювання живильного середовища пересадною культурою молочнокислих бактерій, термостатування і перемішування інокулянта і живильного середовища, центрифугування рідкої бактеріальної закваски з метою одержання бактеріальної пасти, вакуумне сушіння бактеріальної пасти, внесення захисного середовища - порошку сухого молока - для збільшення терміну збереження висушеної бактеріальної пасти.

Недоліком прототипу є складність і висока вартість технології культивування молочнокислих бактерій типу *Streptococcus lactis diastaticus* (АМС).

Задачею винаходу є розробка нової технології вирощування молочнокислих бактерій АМС із використанням пшеничних висівок як основного інгредієнта живильного середовища з досягненням технічного результату - спрощення і здешевлення технології вирощування молочнокислих бактерій АМС.

Поставлена задача зважується в першому варіанті тим, що в «Способі культивування молочнокислих бактерій на трофічній суміші «ГПП»,

якій включає завантаження в ємність компонентів живильного середовища, їхнє перемішування, інокулювання живильного середовища пересадною культурою молочнокислих бактерій, перемішування інокулянта і живильного середовища, вивантаження інокулюваного живильного середовища у тару, термостатування і введення захисного середовища, основою живильного середовища є пшеничні висівки (42-50мас %) з вологістю 15-16%, що завантажують у змішувач, а потім додають воду (до 100мас %), інокулювану суміш термостатують при температурі 30-36°C в плин 90-100 годин, при цьому як захисне середовище для збереження використовують вуглекислий газ, що утвориться при сублімації «сухого льоду», шматочки якого вводять у ємність для збереження.

В другому варіанті поставлена задача зважується тим, що в «Способі культивування молочнокислих бактерій на трофічній суміші «ЛАКТИС», що включає завантаження в ємність компонентів живильного середовища, їхнє перемішування, інокулювання живильного середовища пересадною культурою молочнокислих бактерій, перемішування інокулянта і живильного середовища, вивантаження інокулюваного середовища в тару, термостатування і захист силосної закваски захисним середовищем, у живильне середовище на основі пшеничних висівок додатково введені цукор, крейда, ацетат натрію, сульфат марганцю і вода, при цьому живильне середовище містить зазначені компоненти при наступному співвідношенні, мас %

|                  |          |
|------------------|----------|
| висівки пшеничні | 45-50,   |
| цукор            | 3,0-3,5, |
| крейда           | 1,0-2,0, |
| ацетат натрію    | 1,0-2,0, |
| сульфат марганцю | 0,1-0,2, |
| вода             | інше,    |

при цьому спочатку в змішувачі змішують цукор, воду і компоненти живильного середовища, потім додають інокулянт і усі компоненти перемішують, а далі засинають пшеничні висівки з вологістю 15-16%, отримане живильне середовище перемішують, після чого отриману суміш термостатують при температурі 30-36°C в плин 95-100 годин, при цьому як захисне середовище для збереження використовують вуглекислий газ, що виділяється при реакції взаємодії молочної кислоти, що утвориться як продукт життєдіяльності молочнокислого стрептокока, із крейдою.

Істотними ознаками, які збігаються з прототипом, є

- а) у першому і в другому варіантах завантаження в ємність компонентів живильного середовища,
- перемішування компонентів живильного середовища,
- інокулювання живильного середовища пересадною культурою молочнокислих бактерій,
- перемішування інокулянта і живильного середовища,
- вивантаження інокулюваного живильного середовища у тару,
- термостатування і введення захисного середовища (у першому варіанті) чи захист силосної

закваски захисним середовищем (у другому варіанті)

Відмітними від прототипу істотними ознаками винаходу, який заявляється, є наступні ознаки

а) у першому варіанті основою живильного середовища є пшеничні висівки (42-50мас %) з вологістю 15-16%,

пшеничні висівки завантажують у змішувач, до пшеничних висівок додають воду (до 100мас %),

отримане живильне середовище інокують і перемішують,

отриману суміш термостатують при температурі 30-36°C в плин 95-100 годин,

як захисне середовище для збереження використовують вуглекислий газ, що утвориться при сублімації «сухого льоду», шматочки якого вводять у ємність для збереження,

б) у другому варіанті живильне середовище, утримуюче висівки пшеничні,

цукор,

крейда,

ацетат натрію,

сульфат марганцю,

вода,

а також процентне співвідношення зазначених компонентів, мас %

висівки пшеничні 45-50,

цукор 3,0-3,5,

крейда 1,0-2,0,

ацетат натрію 1,0-2,0,

сульфат марганцю 0,1-0,2,

вода інше,

у змішувачі змішують цукор, воду і мінеральні компоненти живильного середовища,

додають інокулянт і усі компоненти перемішують, засинають пшеничні висівки з вологістю 15 - 16%, отримане живильне середовище перемішують,

живильну суміш термостатують при температурі 30 - 36°C в плин 95 - 100 годин,

як захисне середовище для збереження біоконсерванта використовують вуглекислий газ, який виділяється при реакції взаємодії молочної кислоти, що утвориться як продукт життєдіяльності молочнокислого стрептокока, із крейдою

Новим у способі, що заявляється, є живильне середовище для вирощування молочнокислих бактерій на основі пшеничних висівок і мінімальної кількості технологічних операцій для одержання силосної закваски. До достоїнств способу, що заявляється, варто віднести також мінімальні енергетичні витрати (тільки на підтримку оптимальної температури – 30–36°C) і мінімум необхідного устаткування (термокамера відповідного обсягу). При цьому виключаються такі енергоємні операції по прототипі, як сушіння кукурудзяного відвару і молока, стерилізація середовища, вакуумне сушіння отриманої закваски, а також використання дорогого порошку сухого молока як захисного середовища для збільшення терміну збереження бактеріальної пасти.

У зв'язку з вищевикладеним можна затверджувати, що задача, поставлена в дійсному винаході - розробка нової технології вирощування

молочнокислих бактерій АМС із використанням пшеничних висівок як основного інгредієнта живильного середовища - виконується з досягненням технічного результату - спрощення і здешевлення технології вирощування молочнокислих бактерій АМС.

Між істотними ознаками винаходу, що заявляється, і технічним результатом, який досягається, існує наступний причинно-наслідковий зв'язок.

Спрощення і здешевлення технології культивування молочнокислих бактерій на основі трофічних сумішей досягається саме завдяки використанню вищевказаних трофічних сумішей «ЛАКТИС» і «ГПП» як живильного середовища для вирощування силосної закваски, що самі по собі мають більш низьку вартість, чим відомі живильні суміші, але, саме головне, використання цих трофічних сумішей дозволяє до межі спростити технологію готування силосної закваски і знизити до мінімуму енергетичні витрати, у порівнянні з відомими способами.

Розглянемо компоненти живильної суміші і технологію одержання бактеріальної закваски по першому варіанту способу.

Висівки пшеничні є основним і єдиним компонентом живильного для середовища культивування стрептокока - джерелом білків, вуглеводів, амінокислот, вітамінів, мікро- і макроелементів.

Будучи відходом борошномельної промисловості, пшеничні висівки у багато разів дешевше сухого кукурудзяного екстракту, застосовуваного в даний час як основний компонент середовища при виробництві силосних заквасок.

Трудовитрати по готуванню живильної суміші «ГПП» - 1 робочий день (зміна) на 250кг закваски.

Використовуване устаткування для готування живильної суміші «ГПП» - змішувач на 250кг і термокамера на 4,0тн - набагато простіше устаткування, використовуваного для готування закваски АМС (реактор, центрифуга, вакуумна сушарка).

Крім того, при одержанні живильних середовищ АМС використовується рідке середовище, що знаходиться в реакторі, унаслідок чого важко одержати титр бактерій більш  $1 \times 10^9$ , через що застосовується центрифугування.

А живильна суміш «ГПП» є більш щільним середовищем (приблизно 50% вологості), тому бактеріальний титр досягає величини до  $(5-10) \times 10^9$ , тому операції центрифугування і вакуумного сушіння виключені з технологічного процесу готування закваски.

З огляду на високий бактеріальний титр і низьку собівартість готування живильної суміші «ГПП», виробник рекомендує вносити на 1тн зеленої маси до 50г ( $50 \times 10^{10}$  млрд. бактерій), тобто в 250 разів більше бактерій, чим у рекомендаціях із застосування закваски АМС (2г/тн), унаслідок чого надійність живильної суміші «ГПП», що силосує, у багато разів вище, ніж закваски АМС.

Приклад 1 (перший варіант способу)

Живильне середовище «ГПП» для культивування силосної бактеріальної закваски готують у такий спосіб.

Для виготовлення 100кг суміші у змішувач наливають водопровідну воду в кількості 50–58

літрів, у залежності від вологості пшеничних висівок

У воду засинають пшеничні висівки у кількості 42-50кг (велика доза для більш вологих висівок) і додають інокулянт пересадної культури молочнокислих бактерій типу *Streptococcus lactis diastaticus* (АМС)

Суміш перемішують, розфасовують у споживчу тару і переносять у термостат на 95-100 годин з постійною температурою 30-36°C

У процесі термостатування стрептокок розмножується в кількості  $5 \times 10^9$ – $1 \times 10^{10}$  живих кліток у 1м інокулюваної суміші

Через 4 доби термостатування отриманий концентрат силосної закваски «ГПП» готовий до використання при силосуванні культур

Для збереження силосної закваски необхідно ввести захисне середовище, у якому якої використовують вуглекислий газ, що утворюється при сублімації «сухого льоду» - твердої вуглекислоти ( $\text{CO}_2$ ), шматочки якого вводять у ємність для збереження силосної закваски

Витрата концентрату 50м на 1тн силосуємої зеленої маси

Ця величина закваски обрана з метою підвищення надійності закваски, що силосує, хоча розрахунки показують, що цілком достатньо 2-5г отриманої закваски

Розглянемо компоненти живильної суміші і технологію одержання бактеріальної закваски по другому варіанті способу

Висівки пшеничні є основним живильним компонентом суміші і джерелом білків, вуглеводів, амінокислот, вітамінів, мікро- і макроелементів

Будучи відходом борошномельної промисловості, пшеничні висівки у багато разів дешевше сухого кукурудзяного екстракту, застосовуваного в даний час як основний компонент середовищ при виробництві силосних заквасок

Цукор у цій суміші є додатковим джерелом вуглеводів і підвищує енергетику суміші

Крейда служить для нейтралізації органічних кислот, що є відходом життєдіяльності бактерій, що придушують їхній ріст і розмноження, а також для збагачення закваски вуглекислим газом

Ацетат натрію використовується для підвищення буферності середовища

Сульфат марганцю застосовується для прискорення розвитку бактерій

Крім того, цукор, крейда, ацетат натрію і сульфат марганцю сприяють підвищенню бактеріального титру закваски

Приклад 2 (другий варіант способу)

Трофічну суміш «ЛАКТИС» готують у такий спосіб

Для виготовлення 100кг суміші в змішувач наливають водопровідну воду в кількості 50-58 літрів, у залежності від вологості пшеничних висівок

У воду засинають цукор 3-3,5кг, крейду 1-2кг, ацетат натрію 1-2кг і сульфат марганцю 0,1-0,2кг (добавки дозуються в залежності від вологості пшеничних висівок)

Воду з добавками перемішують і вводять інокулянт пересадної культури молочнокислих бак-

терій типу *Streptococcus lactis diastaticus* (АМС)

Далі засинають пшеничні висівки у кількості 42-50кг (велика доза для більш вологих висівок) Суміш перемішують

Суміш води, мінеральних добавок, інокулянта і пшеничних висівок розфасовують у споживчу тару і переносять у термостат на 95-100 годин з постійною температурою 30-36°C

У процесі термостатування стрептокок розмножується в кількості  $1 \times 10^{10}$ – $2 \times 10^{10}$  живих кліток у 1г інокулюваної суміші

Через 95-100 годин термостатування отриманий концентрат силосної закваски «ЛАКТИС» готовий до використання при силосуванні культур

При розмноженні стрептокока утворюється молочна кислота, що перешкоджає швидкому розмноженню стрептокока, тому введений раніше в суміш крейда, реагує з молочною кислотою, нейтралізуючи неї При цьому виділяється у великій кількості вуглекислий газ, використовується як захисне середовище для отриманого кінцевого продукту - біоконсерванта

Витрата концентрату 50г на 1тн силосуємої зеленої маси

Ця величина закваски обрана з метою підвищення надійності силосування, хоча розрахунки показують, що цілком достатньо 2-5г отриманої закваски

Трудовитрати по готуванню трофічної суміші «ЛАКТИС» - 1 робочий день (зміна) на 250кг закваски

Використовуване устаткування для готування трофічної суміші «ЛАКТИС» - змішувач на 250кг і термокамера на 4,0тн - набагато простіше устаткування, використовуваного для готування закваски АМС (реактор, центрифуга, вакуумна сушарка)

Крім того, при одержанні живильного середовища АМС використовується рідке середовище, що знаходиться в реакторі, унаслідок чого важко одержати титр бактерій більш  $1 \times 10^9$ , через що застосовується центрифугування для згущення бактерій в осаді (у пасті)

А трофічна суміш «ЛАКТИС» є більш щільним середовищем (приблизно 50% вологості), тому бактеріальний титр досягає величини до  $(10 - 20) \times 10^9$ , у зв'язку з чим операції центрифугування і вакуумного сушіння виключені з технологічного процесу готування закваски

З огляду на високий бактеріальний титр і низьку собівартість готування трофічних сумішей «ЛАКТИС» і «ГПП», виробник рекомендує вносити на 1тн зеленої маси до 50г закваски ( $50 \times 2 \times 10^{10}$  млрд бактерій), тобто в 500 разів більше бактерій, чим у рекомендаціях із застосування закваски АМС (2г/тн), унаслідок чого надійність трофічних сумішей «ЛАКТИС» і «ГПП», що силосують, у багато разів вище, ніж закваски АМС

А тому що вартість дози силосної закваски, отриманої на живильних сумішах «ЛАКТИС» і «ГПП» - відповідно 12,5грн/кг і 10,0грн/кг - значно нижче вартості відомої силосної закваски АМС (188грн/кг), те економічно доцільніше збільшити дозу силосних заквасок, вирощених по пропоно-

ваної технології (варіанти), чим збільшувати трудовитрати на точний і дозований розподіл закваски по всьому обсязі сипусуємої маси

З огляду на усе вищевикладене, можна зробити висновок, що задача, поставлена у винаході - розробка нової технології вирощування молоч-

нокислих бактерій АМС із використанням пшеничних висівок як основний інгредієнт живильного середовища - виконується з досягненням технічного результату - спрощення і здешевлення технології вирощування молочнокислих бактерій типу *Streptococcus lactis diastaticum* (АМС)