



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **84665**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 1/20** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 05788**

(22) Дата подання заявки: **07.05.2013**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.10.2013**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.10.2013, Бюл.№ 20**

(72) Винахідник(и):

**Васильєва Наталія Юріївна (UA),  
Коротаєва Надія Володимирівна (UA),  
Ліманська Наталія Вікторівна (UA),  
Іваниця Володимир Олексійович (UA)**

(73) Власник(и):

**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА,  
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082 (UA)**

## (54) СПОСІБ СТАБІЛІЗАЦІЇ pH ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

(57) Реферат:

Спосіб стабілізації pH поживних середовищ для культивування молочнокислих бактерій включає приготування поживних середовищ, при якому до них додають усі необхідні для росту молочнокислих бактерій мінеральні речовини (ацетат натрію, цитрат амонію, сульфат магнію) та бурякову мелясу.

**UA 84665 U**



Корисна модель належить до біотехнології, а саме до складу поживних середовищ для культивування молочнокислих бактерій, з метою виробництва нових антимікробних препаратів на основі бактерій та бактріоцинів і може використовуватися в сільському господарстві. Також ця корисна модель може бути використана у мікробіології для культивування молочнокислих бактерій без значного зниження рН середовища і може бути використана в науково-дослідній і практичній роботі.

В теперішній час існує достатня кількість поживних середовищ для культивування мікроорганізмів. Як правило, поживні середовища складаються з білкової та вуглеводної основи, а також додаткових компонентів, які підсилюють ріст мікроорганізмів: вітамінів, амінокислот, мінеральних компонентів. Для приготування білкової основи найчастіше використовують м'ясні, рибні бульйони або білкові гідролізати. Основним джерелом сировини для виробництва таких бульйонів є м'ясо, кров, серце тварин, риба і т.п. [Білкові гідролізати у виробництві поживних середовищ. - М.: ВНДІ систем управління, 1990.-50 с.].

Поживні середовища для культивування лактобацил також потребують складних органічних і додаткових компонентів. Складні потреби цих мікроорганізмів змушують дослідників використовувати відомі та перевірені поживні середовища для їх культивування. Є великий перелік поживних середовищ, які використовують для культивування лактобактерій, проте не завжди штучне середовище відповідає поживним потребам даного мікроорганізму.

Так, наприклад класичне середовище MRS, яке широко використовують на практиці, не завжди оптимальне щодо органічного азоту, джерел марганцю, магнію, фосфору. Крім цього, у більшості випадків на середовищі MRS не вдається наростити біомасу вище  $1,0 \times 10^9$  клітин/мл. Також, це середовище дороге і, як правило, імпортного виробництва, тому недоступно широкій мережі практичних лабораторій.

У зв'язку з цим розробка простих, недорогих, поживних середовищ для культивування бактерій, які ще були б спроможні підтримувати рН середовища на необхідному рівні, вельми актуальна.

В теперішній час проводяться дослідження по можливості використання продуктів відходу або побічних продуктів промислового виробництва як субстрати для поживних середовищ, на яких культивують лактобактерії.

Відомий спосіб вирощування молочнокислих бактерій з використанням сироватки [Свириденко Г.М. Сухая питательная среда для приготовления закваски молочнокислых микроорганизмов из сухих бактериальных концентратов / RU2301829 // Г.М. Свириденко, М.Б. Захарова, Ю.Я. Свириденко, Г.Д. Перфильев, Т.В. Комарова.-2005.-8 с.]. Недоліком цього способу вирощування молочнокислих бактерій є складний процес приготування середовища, який включає момент нагрівання сироватки, витримання її при температурі 95 °C та послідовного освітлення.

Відомий спосіб вирощування молочнокислих бактерій з використанням меляси [Рыженко В.А. Трофическая смесь "Биосил" / RU 2266957 // В.А. Рыженко.-2005.-7 с.].

Недоліком цього способу вирощування молочнокислих бактерій є додаткове використання житніх висівок та крейди, що підвищує непрозорість середовища та ускладнює процес контролю за ростом мікроорганізмів.

Відоме ще одне поживне середовище, з використанням меляси для вирощування молочнокислих бактерій, до складу якого входять кукурудзяний екстракт та Tween 80, що робить його більш дорогим у використанні [Coelho L.F., de Lima C.J.B., Rodovalho C.M., Bernardo M.P., Contiero J. Lactic acid production by new Lactobacillus plantarum Imism6 grown in molasses: optimization of medium composition / Brazilian Journal of Chemical Engineering.-2011-V. 28., №. 01-PP. 27-36.].

Важливою перешкодою для культивування молочнокислих бактерій на подібних середовищах є також неможливість стабілізації рН культуральної рідини внаслідок гомо- чи гетероферментативного молочнокислого бродіння.

Відомі роботи по використанню для поживних середовищ рослинних соків - кукурудзяного, морквяного, томатного [Тимченко Л.Д. Сравнительный анализ традиционных питательных сред и новая капуста среда для культивирования лактобактерий /Л.Д. Тимченко, Н.И. Пенькова, Л.С. Катунина // Вестник Московского государственного областного университета серия "Естественные науки".-2010. - № 2. - С. 51-55 (найближчий аналог)]. Основою для таких середовищ є використання свіжих соків як добавок.

Недоліком є неможливість використання таких поживних середовищ для культивування молочнокислих бактерій у промислових обсягах та труднощі з отриманням свіжих дешевих рослинних соків протягом цілого року і також неможливість стабілізації рН культуральної рідини.

Така ситуація ускладнює використання молочнокислих бактерій як основи для створення антимікробного препарату по боротьбі з бактеріальними інфекціями рослин.

Задачею, на вирішення якої спрямована пропонована корисна модель, є стабілізація рН поживних середовищ при культивуванні молочнокислих бактерій.

5 Дана задача вирішується створенням способу стабілізації рН поживних середовищ для культивування молочнокислих бактерій, згідно якого при приготуванні поживних середовищ до них додають усі необхідні для росту молочнокислих бактерій мінеральні речовини (ацетат натрію, цитрат амонію, сульфат магнію), згідно корисної моделі, додають бурякову мелясу у концентрації 20,0 г/л, що не дозволяє рН середовищу знижуватися нижче 6,0.

10 Ознаками, що збігаються з найближчим аналогом, є використання мінеральної частини у складі поживного середовища до якого входять сульфат магнію, натрію ацетат, гідрофосфат калію чи натрію та цитрат амонію.

15 Спосіб, що пропонується, відрізняється тим, що замість органічної складової поживних середовищ, яка складається з дріжджового екстракту, глюкози, пептони і м'ясо-пептонного бульйону використовують мелясу.

Здійснюється спосіб наступним чином. Готують мінеральну основу середовища, що включає ацетат натрію, цитрат амонію, сульфат магнію згідно з прописом середовища для вирощування молочнокислих бактерій.

20 Ацетат натрію використовують для підвищення буферності середовища і сприяння підвищенню бактеріального титру закваски. Сульфат марганцю прискорює розмноження молочнокислих бактерій.

Присутність фосфатів калію або натрію необхідно як джерело фосфору, який потрібен мікроорганізмам для синтезу ряду найважливіших сполук - фосфоліпідів, коферментів, нуклеїнових кислот, АТФ та інше.

25 Потім до готового мінерального середовища додають бурякову мелясу у концентрації 17,0-20,0 г/л. Саме така концентрація меляси є оптимальною для підтримання росту молочнокислих мікроорганізмів. Ці концентрації визначили у ході досліджень, які були проведені на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. Потім середовище автоклавується у режимі 0,5 атм. і використовують для роботи. Після автоклавування рН отриманих поживних середовищ дорівнює 7,0-6,5 і при подальшому використанні змінюється незначно. Кінцеві показники рН отриманих середовищ не були нижче 6,0.

Ефективність запропонованого способу підтверджується прикладами.

Приклад № 1.

35 Як мінеральну основу для поживного середовища використовували середовище, яке містило у своєму складі сульфат магнію (0,5 г/л), гідрофосфат натрію (2,0 г/л) ацетат натрію (5,0 г/л) та цитрат амонію (2,0 г/л) - середовище № 641. У незмінному вигляді середовище містило у своїй органічній частині пептон (10,0 г/л), м'ясо-пептонний бульйон (10,0 г/л), дріжджовий екстракт (5,0 г/л) та глюкозу 20,0 (г/л). При використанні запропонованої корисної моделі ці компоненти до складу поживного середовища не вносили. Замість них використали мелясу у  
40 концентрації 20,0 г/л. Початкове рН для обох поживних середовищ - 6,5. В обидва середовища вносили однакову кількість посівного матеріалу молочнокислих бактерій і культивували при однакових умовах - у термостаті при температурі 37,0 °С. Через 60 годин культивування перевірили зміну показника рН обох середовищ та перевірили інші ростові показники. Вплив меляси на зміну показника рН середовища № 641 для культивування молочнокислих бактерій  
45 та на інші ростові показники, наведено таблиці 1.

Таблиця 1

Використане середовище	рН середовища наприкінці культивування	Оптична щільність, D	Титр клітин (КУО/мл)	Наявність зон лізису
Середовище № 641	3,5	2,4	$61,0 \pm 8,6 \times 10^{14}$	++
Середовище № 641 з мелясою	6,0	1,75	$41,3 \pm 5,7 \times 10^{12}$	+

Примітка: - відсутність антагоністичної активності

± слабка чи неявна антагоністична активність

+ сильна антагоністична активність

++ дуже сильна антагоністична активність.

Отже як видно з таблиці 1, при використанні меляси рН поживного середовища практично не змінюється і залишається рівним 6,0. Показники оптичної щільності та титру клітин дещо знизилися, що пов'язано з тим, що наявність у поживному середовищі однієї меляси стримує зростання молочнокислих бактерій.

5 Зниження антимікробної активності, яку реєстрували по наявності зон лізису, безпосередньо пов'язана з зменшенням титру клітин в середовищі.

Приклад № 2.

10 Як мінеральну основу для поживного середовища використовували середовище, яке містило у своєму складі сульфат магнію (0,6 г/л), гідрофосфат калію (6,0 г/л) ацетат натрію (25,0 г/л) та цитрат амонію (2,0 г/л) - середовище № 1180. У незмінному вигляді середовище містило у своїй органічній частині пептон (10,0 г/л), дріжджовий екстракт (5,0 г/л) та глюкозу 20,0 (г/л). При використанні запропонованої корисної моделі ці компоненти до складу поживного середовища не вносили. Замість них використали мелясу у концентрації 20,0 г/л. Початкове рН для обох поживних середовищ - 7,0. В обидва середовища вносили однакову кількість посівного матеріалу молочнокислих бактерій і культивували при однакових умовах у термостаті при температурі 37,0 °С. Через 60 годин культивування перевірили зміну показника рН обох середовищ та перевірили інші ростові показники. Вплив меляси на зміну показника рН середовища № 1180 для культивування молочнокислих бактерій та на інші ростові показники наведено у таблиці 2.

20

Таблиця 2

Використане середовище	рН середовища наприкінці культивування	Оптична щільність, D	Титр клітин (КУО/мл)	Наявність зон лізису
Середовище № 1180	4,0	2,7	$174,0 \pm 17,9 \times 10^{14}$	++
Середовище № 1180 з мелясою	6,5	1,98	$114,0 \pm 4,69 \times 10^{12}$	+

Примітка: - відсутність антагоністичної активності

± слабка чи неявна антагоністична активність

+ сильна антагоністична активність

++ дуже сильна антагоністична активність.

Отже, як видно з таблиці 2, при використанні меляси рН поживного середовища практично не змінюється і залишається рівним 6,5. Зміна інших показників, які перевіряли, відповідала результатам з першого прикладу.

25 Аналізуючи сукупність відомих і відмінних ознак запропонованого способу разом з позитивним ефектом, отриманим при його використанні, можна зробити висновок, що додавання меляси стабілізує рН середовищ при вирощуванні молочнокислих бактерій на рівні 6,5-6,0, що дає можливість використовувати таке середовище для приготування мікробних препаратів для боротьби з бактеріальними інфекціями рослин не пошкоджуючи при цьому самі рослини.

30

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35 Спосіб стабілізації рН поживних середовищ для культивування молочнокислих бактерій, що включає приготування поживних середовищ, при якому до них додають усі необхідні для росту молочнокислих бактерій мінеральні речовини (ацетат натрію, цитрат амонію, сульфат магнію), який **відрізняється** тим, що додають бурякову мелясу у концентрації 17,0-20,0 г/л для підтримання рН середовища не нижче 6,0.

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601