



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **98706**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 10238**
(22) Дата подання заявки: **18.09.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **12.05.2015**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **12.05.2015, Бюл.№ 9**

(72) Винахідник(и):
Пономаренко Світлана Володимирівна (UA),
Осолодченко Тетяна Павлівна (UA),
Лук'яненко Тетяна Василівна (UA),
Менкус Олена Валерівна (UA),
Порт Олена Валерівна (UA),
Волянський Дмитро Леонідович (UA),
Батрак Олена Анатоліївна (UA)

(73) Власник(и):
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І.
МЕЧНИКОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
вул. Пушкінська, 14-16, м. Харків, 61057
(UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОЖИВНОЇ ОСНОВИ ІЗ ПАТОЧНОЇ МЕЛЯСИ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

(57) Реферат:

Спосіб одержання поживної основи із паточної меляси передбачає солянокислий гідроліз цукровмісного субстрату, сорбцією, фільтрацією та стерилізацією гідролізату. Як субстрат використовують паточну мелясу, її гідроліз проводять при концентрації HCl 4,0-7,0 % протягом 24 годин з наступним автоклавуванням при тиску 1,5 атм. протягом 1 години, після чого нейтралізують залишки кислоти соляної 50,0 % розчином NaOH до pH 7,0-7,2.

UA 98706 U

Корисна модель належить до медичної мікробіології та біотехнології, зокрема може бути використана для конструювання поживних середовищ мікроорганізмів, а саме для отримання живильної основи із промислових відходів цукрового виробництва.

Як поживні основи мікробіологічних середовищ використовуються кислотні, лужні або ферментативні гідролізати сировини тваринного або рослинного походження з високим вмістом білків (м'ясо та внутрішні органи промислових тварин, риба, соя, тощо). Білки рослинного походження, джерелом яких є недорога сировина, привертають увагу фахівців різних галузей біологічної науки, тому що дозволяє знизити ризик випадкового введення тваринних та людських патогенів. В останні роки актуальним є розробка поживних основ мікробіологічних середовищ із промислових відходів рослинного походження. Удосконалення технологічних процесів рослинних гідролізатів та конструювання на їх основі поживних середовищ з метою виділення, селекції та стабілізації біологічних властивостей мікроорганізмів, збереження життєздатності при тривалому зберіганні є актуальним та перспективним напрямком розробок. Одним із якісних параметрів кінцевого продукту є вміст амінного азоту, де для отримання бажаного технічного результату заважає висока вартість сировини.

Найближчим аналогом є живильне середовище для мікроорганізмів, яке було отримане із відходів спиртового виробництва (зернова барда) шляхом кислотного гідролізу та містить в своєму складі кислотний гідролізат зернової барди, агар-агар, дистильовану воду, натрій хлористий [1]. Паточна меляса - це продукт переробки цукрового виробництва та являє собою густу рідину насиченого темно-коричневого кольору. Рідину заливають водою у співвідношенні 1:1 та проводять гідроліз кислотою гідрохлоридною об'ємною часткою 2,0-6,0 %. Гідролізат стерилізують в автоклаві впродовж 1,0-2,0 годин при тиску 1,0-2,0 атм. Одержану суспензію фільтрують, розводять водою 1:1, освітлюють активованим вугіллям з розрахунку 20,0 г на літр, стерилізують протягом 10-20 хвилин при $t=100^{\circ}\text{C}$, фільтрують через склотканину, повторно стерилізують протягом 10-20 хвилин при $t=100^{\circ}\text{C}$.

Паточна меляса (далі ПМ) є відходом цукрового виробництва. Вміст сухої речовини в ній складає (75,0-84,0) %, з яких (14,0-18,0) % протеїни, (55,0-68,0) % різноманітні цукри, що зумовлює вельми обмежені терміни її зберігання. Ця субстанція потребує швидкої утилізації та використовується для культивування та дріжджів в харчовій промисловості. Придатність для виробництва поживних основ мікробіологічних середовищ зумовлює нутритивна цінність ПМ, що визначається наявністю цукрів, целюлози, різноманітних вуглецевих сполук та протеїнів тощо.

Інформації, щодо використання продуктів переробки ПМ як живильної основи середовищ для культивування бактерій, грибів у т.ч. таких, що мають медичне значення, в доступних джерелах інформації не виявлено.

До суттєвих ознак цього способу, що співпадають з ознаками корисної моделі, що заявляється належать: використання сировини, що містить різноманітні цукри і протеїни та позиціонується як відходи; проведення солянокислого гідролізу; застосовані засоби стерилізації та очищення кінцевого продукту, а саме двократна стерилізація в автоклаві при тиску (1,0-1,5) атм, адсорбція активованим вугіллям в пропорції 20,0 г на літр та фільтрація.

До причин, що заважають отриманню бажаного технічного результату, слід віднести недостатньо високий рівень технологічності, та відповідно, промислової придатності, зумовлений особливостями обраної сировини. Цілком очевидно, що сфера можливого застосування обмежується виробництвом в лабораторних умовах незначних обсягів продукту.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити поживну основу для мікробіологічних середовищ, в якому за рахунок підбору оптимальних параметрів обробки ПМ забезпечити отримання субстрату, здатного забезпечити стандартні ростові якості мікробів.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

До густої рідини з паточної меляси додають соляну кислоту в кількості, що забезпечує кінцеву концентрацію у суміші від 4,0 % до 7,0 % і витримують протягом однієї доби. Отриманий гідролізат автоклавують при тиску 1,0-2,0 атм протягом 1-1,5 години, після чого залишки соляної кислоти нейтралізують розчином 50,0 % NaOH до pH 7,0-7,2. До отриманої субстанції додають адсорбент (активоване вугілля із розрахунку 20,0 г/л), фільтрують та повторно стерилізують в автоклаві протягом 20-40 хв. при тиску 1,0-2,0 атм.

До суттєвих ознак корисної моделі, що заявляється належить використання як субстрату ПМ, проведення її солянокислого гідролізу при концентрації HCl (3,0-7,0) протягом 24-48 годин з наступною стерилізацією в автоклаві при тиску 1,0-2,0 атм протягом 0,5-1,5 години, адсорбцією, фільтрацією та повторною стерилізацією.

Тривалість експозиції 24 години є оптимальною для гідролізу цього роду субстрату та, з урахуванням продовження гідролітичного процесу на тлі подальшого автоклавовання при тиску

1,5 атм протягом 1 години, забезпечує достатній вміст амінного азоту в отриманому проміжному продукті. Крім того, стерилізація суміші перед проведенням сорбції дозволяє зменшити необхідну кількість сорбенту.

Спосіб, умови та тривалість адсорбції, фільтрації та повторної стерилізації можуть варіювати в різних варіантах виконання. Обрані нами параметри (а саме: сорбція активованим вугіллем з розрахунку 20,0 г/л, фільтрування та автоклавовання протягом 20-40 хв. при тиску 1,0-2,0 атм.) дозволяють отримати рідку живильну основу з вмістом амінного азоту (279-299) мг%, придатну до зберігання при температурі +4 °С протягом 120 діб.

Дані, що підтверджують можливість здійснення корисної моделі наведено в прикладах.

Приклад 1. Отримання поживної основи.

До 1000 мл паточної меляси додавали 80-120 мл 36,6 % кислоти гідрохлорної, витримували протягом 24-48 год., стерилізували в автоклаві протягом 1,0-1,5 год. години при тиску 1,0-2,0 атм. та нейтралізували внесенням 50,0 % NaOH до рН 7,2. Після цього вносили 20,0 г активованого вугілля, перемішували, витримували 24-48, фільтрували крізь склотканини фільтр та стерилізували в автоклаві 20-40 хв. при тиску 1,0-2,0 атм.

Одержана таким чином основа являла собою прозору рідину жовтого кольору, що містила 312,0 мг % загального азоту, 299,0 мг % амінного азоту,

5,3 мг/мл Fe^{2+} , 0,6 % NaCl.

Приклад 2. Одержання та характеристика якісних параметрів щільного поживного середовища, виготовленого з використанням отриманої живильної основи.

100 мл основи розводили дистильованою водою до вмісту амінного азоту 120-140 мг %, додавали агару з масовою часткою 2,0 %, стерилізували 30-40 хвилин при тиску 1,0-2,0 атм, проводили контроль вмісту амінного азоту та рН.

Перевірку ростових якостей отриманого середовища здійснювали з використанням стандартних штамів мікроорганізмів, рекомендованих для контролю якості поживних середовищ. Наявність росту при висіві розведення культури, що містило 10^{-7} мікробних клітин в мл, розцінювали як показник задовільної ростової якості для конкретного тест-штаму. Оцінка результатів проводилась через 24 години культивування (для бактерій) та через 48 годин (для грибів роду *Candida*), (табл. 1).

Таблиця 1

Ростові якості середовища на основі паточної меляси

Тест-штами	Ступінь росту КУО/мл при розведенні	
	10^2	10^1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592	54,5±0,6	5,4±0,2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	57,7±0,7	5,7±0,4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	51,3±0,3	5,1±0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	66,5±0,3	6,6±0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	69,8±0,6	6,9±0,5
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	немає росту	немає росту
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	65,4±0,7	6,5±0,4
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	78,6±1,2	7,8±0,4

Дані, наведені в табл. 1 свідчать, що середовище на основі кислотного гідролізу ПМ може бути використано для культивування *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

Таблиця 2

Продуктивність живильного середовища на основі ПМ в порівнянні з ПА

Стандартні штами м/о	Кількість клітин, млрд/мл, М±m	
	ПА	Середовище на основі ПМ
1	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	60,6±0,7	61,9±0,7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	62,3±0,5	63,1±0,7
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	57,3±0,4	50,3±0,6

Продовження таблиці 2

1	2	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	64,1±0,9	60,5±0,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	64,6±0,5	62,7±0,2
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	зливний ріст	зливний ріст
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	67,5±0,9	67,6±0,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	73,4±1,1	71,8±1,2
<i>Staphylococcus aureus</i> 94	63,5±0,9	64,2±0,7
<i>Candida albicans</i> 67	70,4±1,3	74,7±1,3
<i>Candida albicans</i> 148	72,5±0,8	75,6±1,4
<i>Candida albicans</i> 164	73,8±1,1	74,8±0,9
<i>Candida albicans</i> 239	71,3±1,2	75,5±1,2

Наведені дані свідчать, що середовище на основі кислотного гідролізату паточної меляси може бути використано для культивування *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

Джерела інформації:

1. Патент України на корисну модель № 80008 від 13.05.2013 "Спосіб одержання поживної основи із зернової барди" / [Текст] Осолодченко Т.П., Волянська Н.П., Кучма І.Ю., Лук'яненко Т.В., Волянський А.Ю., Максютенко Л.А., Менкус О.В., Завада Н.П. та інші. Заявник ДУ "ІМІ НАМН" (UA), заявка u201213237 (UA), МПК⁷ C12N 1/20 заявл. 20.11.2012.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання поживної основи із паточної меляси, що передбачає солянокислий гідроліз цукровмісного субстрату, сорбцією, фільтрацією та стерилізацією гідролізату, який **відрізняється** тим, що як субстрат використовують паточну мелясу, її гідроліз проводять при концентрації HCl 4,0-7,0 % протягом 24 годин з наступним автоклавуванням при тиску 1,5 атм. протягом 1 години, після чого нейтралізують залишки кислоти соляної 50,0 % розчином NaOH до pH 7,0-7,2.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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

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