



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **99420**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 1/20** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 10239**

(22) Дата подання заявки: **18.09.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.06.2015**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.06.2015, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):

**Пономаренко Світлана Володимирівна  
(UA),**

**Осолодченко Тетяна Павлівна (UA),**

**Лук'яненко Тетяна Василівна (UA),**

**Менкус Олена Валерівна (UA),**

**Порт Олена Валерівна (UA),**

**Литвиненко Оксана Анатолівна (UA),**

**Рябова Ірина Семенівна (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 ДРОБИНИ ЯЧМІННОЇ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

(57) Реферат:

Спосіб одержання поживної основи із дробини ячмінної, що передбачає солянокислий гідроліз білковмісного субстрату, сорбцію, фільтрацію та стерилізацію гідролізату. Як білковий субстрат використовують ячмінну дробину, а її гідроліз проводять при концентрації HCl 2,0-6,0 % протягом однієї доби з наступним автоклавуванням при тиску 1,0-2,0 атм, протягом 1,0-2,0 годин, після чого нейтралізують залишки соляної кислоти 50,0 % розчином NaOH до pH 6,8-7,4, сорбцію здійснюють активованим вугіллем у концентрації 20 г/л, вугілля відділяють фільтрацією, а продукт повторно автоклавують протягом 20 хв. при тиску 1 атм.

**UA 99420 U**



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

Як поживні основи мікробіологічних середовищ для культивування мікроорганізмів традиційно використовуються кислотні, лужні або ферментативні гідролізати сировини тваринного або рослинного походження з високим вмістом білків, вуглеводів та мінеральних сполук. 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 запропонованої корисної моделі, 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]. Дробина ячмінна - це продукт переробки пивоварного виробництва, який являє собою сухий залишок ячмінного солода після виготовлення сула. Сухий залишок ячмінного солоду ретельно подрібнюють у фарфоровій ступці, потім суміш відмивають впродовж 48 год. кислотою оцтовою з 0,2 %. Осад доводять дистильованою водою до 500,0 мл і 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  $t=100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , фільтрують через склотканину, повторно стерилізують протягом 10-20 хвилин при  $t=100\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

До суттєвих ознак цього способу, що співпадають з ознаками корисної моделі, яка заявляється, належать: використання сировини рослинного походження, що містить білок; 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 цього технічного рішення обмежується виробництвом в лабораторних умовах незначних обсягів продукту.

Дробина ячмінна (далі ДЯ) є відходом пивоварного виробництва. Вміст сухої речовини в ній складає (87,0-92,0) %, з яких (24,0-32,0) % протеїни, клітковина (13,0-17,0) %, вказане і зумовлює вельми обмежені терміни її зберігання. В натуральному вигляді ця субстанція фактично не має ринкової цінності та потребує швидкої утилізації, що створює певні технологічні та екологічні проблеми. На сьогодні найбільш ефективним та екологічним способом утилізації ДЯ є висушування з наступним гранулюванням та отриманням продукту з певною ринковою вартістю. Суха ячмінна дробина має значно триваліші терміни зберігання та використовується у виробництві тваринних комбікормів. При цьому постійне зростання обсягів виробництва в світі тваринних комбікормів зумовлює тенденцію до зниження ринкової вартості цього продукту, що в країнах з недостатньо жорстким екологічним законодавством робить економічно недоцільним впровадження цієї технології та зумовлює актуальність розробки альтернативних шляхів утилізації ДЯ.

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

В основу корисної моделі поставлена задача розробити поживну основу для мікробіологічних середовищ, де за рахунок підбору оптимальних параметрів обробки ДЯ забезпечити отримання субстрату, здатного забезпечити стандартні ростові якості мікробів при зменшеній собівартості виробництва на 30-50 %.

Поставлена задача вирішується тим, що до дробини ячмінної додають кислоту соляну в кількості 2,0-6,0 % та витримують протягом однієї доби. Отриманий гідролізат автоклавують при

тиску 1,0-2,0 атм протягом 1,0-2,0 години, після чого залишки соляної кислоти нейтралізують розчином 50,0 % NaOH до pH 6,8-7,5. До отриманої субстанції додають адсорбент (активоване вугілля із розрахунку 20,0 г/л), фільтрують та повторно стерилізують в автоклаві протягом 20 хв. при тиску 1 атм.

5 До суттєвих ознак корисної моделі, що заявляється, належить використання як субстрату ДЯ, проведення її солянокислого гідролізу при концентрації HCl 5,0 % протягом 24 годин з наступною стерилізацією в автоклаві при тиску 1,5 атм протягом 1 години, адсорбцією, фільтрацією та повторною стерилізацією. Визначають вміст амінного азоту, кількість якого повинна бути не менш 200 мг%.

10 Тривалість експозиції 24 години є оптимальною для гідролізу цього субстрату та на тлі подальшого автоклавування при тиску 1,5 атм протягом 1 години, забезпечує достатній вміст амінного азоту в отриманому продукті. Крім того, стерилізація суміші перед проведенням сорбції дозволяє зменшити необхідну кількість сорбенту.

15 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 через склотканину та автоклавування протягом 20 хв. при тиску 1 атм.) дозволяють отримати рідку живильну основу з вмістом амінного азоту (267-279) мг %, придатну до зберігання при температурі +4 °C протягом 60 діб.

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

20 Приклад 1. Отримання поживної основи

До 800-1200 мл дробини ячмінної додавали 100-150 мл 36,6 % кислоти гідрохлоридної, витримували протягом однієї доби, стерилізували в автоклаві протягом 1,0-2,0 години при тиску 1,0-2,0 атм та нейтралізували внесенням 50,0 % NaOH до pH 6,8-7,4. Після цього вносили 20,0 г активованого вугілля, перемішували, витримували протягом доби, фільтрували крізь склотканини фільтр та стерилізували в автоклаві 0,5-1,0 год. при тиску 1,0-2,0 атм. Одержана таким чином основа являла собою прозору рідину жовтого кольору, що містила 305,0 мг% загального азоту, 277,0 мг% амінного азоту, 5,1 мг/мл Fe<sup>2+</sup>, 0,6 % NaCl.

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

30 100 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 pH.

Перевірку ростових якостей отриманого середовища здійснювали за стандартною методикою з використанням стандартних штамів мікроорганізмів, рекомендованих для контролю якості поживних середовищ.

35 Наявність росту при висіві розведення культури, що містило 10<sup>-7</sup> 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).

40

Таблиця 1

Ростові якості середовища на основі дробини ячмінної

Тест-штами мікроорганізмів	Ступінь росту КУО/мл при розведенні	
	102	101
Staphylococcus aureus ATCC 2592	59,9±0,6	5,9±0,4
Staphylococcus aureus ATCC 6538	56,4±0,7	5,6±0,3
Escherichia coli ATCC 25922	57,8±0,5	5,7±0,4
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	68,4±0,8	6,8±0,4
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	67,8±0,6	6,7±0,5
Proteus vulgaris NTCC 4636	12,3±0,2	немає росту
Bacillus subtilis ATCC 6633	67,5±0,8	6,7±0,4
Candida albicans ATCC 885-653	67,9±0,5	6,7±0,4

Дані, наведені в табл. 2, свідчать про достатньо високий рівень продуктивності отриманого середовища при культивуванні окремих видів бактерій, а також грибів роду Candida.

Таблиця 2

Продуктивність живильного середовища на основі ДЯ у порівнянні з ПА

Стандартні штами м/о	Кількість клітин, млрд/мл, М±m	
	ПА	Середовище на основі ДЯ
1	2	3
Staphylococcus aureus ATCC 25923	62,5±0,9	61,4±0,6
Staphylococcus aureus ATCC 6538	64,6±0,5	60,9±0,8
Escherichia coli ATCC 25922	66,9±0,7	59,9±0,6
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	70,2±0,9	68,9±0,6
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	71,6±0,7	70,5±0,8
Proteus vulgaris NTCC 4636	зливний ріст	15,4±0,2
Bacillus subtilis ATCC 6633	71,5±0,6	68,8±0,4
Candida albicans ATCC 885-653	70,4±0,8	66,7±0,4
Staphylococcus aureus 94	59,2±0,9	58,5±0,7
Staphylococcus aureus 88	57,9±0,4	59,7±0,5
Escherichia coli 45	47,5±0,9	34,6±0,6
Escherichia coli 75	58,6±0,7	55,9±0,5
Pseudomonas aeruginosa 93	69,2±0,9	68,8±0,8
Pseudomonas aeruginosa 87	67,6±0,6	64,6±0,8
Pseudomonas aeruginosa 46	68,8±0,7	67,2±0,7

Наведені дані свідчать, що середовище на основі кислотного гідролізату дробини ячмінної може бути використано для культивування *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *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), МПК<sup>7</sup> C12 N 1/20 заявл. 20. 11. 2012.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання поживної основи із дробини ячмінної, що передбачає солянокислий гідроліз білоквмісного субстрату, сорбцію, фільтрацію та стерилізацію гідролізату, який **відрізняється** тим, що як білковий субстрат використовують ячмінну дробину, а її гідроліз проводять при концентрації HCl 2,0-6,0 % протягом однієї доби з наступним автоклавуванням при тиску 1,0-2,0 атм, протягом 1,0-2,0 годин, після чого нейтралізують залишки соляної кислоти 50,0 % розчином NaOH до pH 6,8-7,4, сорбцію здійснюють активованим вугіллям у концентрації 20 г/л, вугілля відділяють фільтрацією, а продукт повторно автоклавують протягом 20 хв. при тиску 1 атм.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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