



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **80008**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 1/20** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 13237**

(22) Дата подання заявки: **20.11.2012**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **13.05.2013**

(46) Публікація відомостей **13.05.2013, Бюл.№ 9**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Осолодченко Тетяна Павлівна (UA),  
Волянська Наталя Петрівна (UA),  
Кучма Ірина Юріївна (UA),  
Лук'яненко Тетяна Василівна (UA),  
Волянський Андрій Юрійович (UA),  
Максютенко Людмила Анатолівна (UA),  
Завада Надія Петрівна (UA),  
Менкус Олена Валерівна (UA),  
Овчаренко Сергій Валентинович (UA),  
Пилюгін Сергій Васильович (UA),  
Парусова Ярослава Юріївна (UA),  
Парусов Антон Володимирович (UA),  
Гушилик Борис Іванович (UA),  
Гайдучок Ігор Григорович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ  
МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І.  
МЕЧНИКОВА НАМН УКРАЇНИ",  
вул. Пушкінська, 14, м. Харків, 61057 (UA)**

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОЖИВНОЇ ОСНОВИ ІЗ ЗЕРНОВОЇ БАРДИ

(57) Реферат:

Спосіб одержання поживної основи із зернової барди, що включає солянокислий гідроліз білоквмісного субстрату, сорбцією, фільтрацією та стерилізацією гідролізату. Як білковий субстрат використовують зернову барду.

**UA 80008 U**



Корисна модель належить до медичної мікробіології та біотехнології, зокрема до конструювання поживних середовищ для культивування мікроорганізмів, а саме є способом отримання живильної основи із промислових відходів спиртового виробництва.

Традиційно як поживні основи мікробіологічних культуральних середовищ використовують кислотні, лужні або ферментативні гідролізати сировини тваринного або рослинного походження з високим вмістом білків (м'ясо та внутрішні органи промислових тварин, риба, соя тощо). Основним якісним параметром кінцевого продукту є вміст амінного азоту. Основною причиною, що заважає отриманню бажаного технічного результату, є відносно висока вартість сировини.

Найближчим аналогом є спосіб одержання живильної основи із препарату крові [1], що передбачає використання як вихідної сировини еритроцитарної маси з простроченим терміном дії. Невеликі шматочки маси ретельно подрібнюють у фарфоровій ступці, одержаний матеріал відмивають продовж 96 годин 0,2 % розчином оцтової кислоти. Осад доводять дистильованою водою до 500,0 мл і проводять гідроліз 12н соляною кислотою. Гідролізат стерилізують в автоклаві впродовж 3-х годин при тиску 1,5 атм. Одержану суспензію фільтрують, розводять водою 1:1, освітлюють активованим вугіллям з розрахунку 20,0 г на літр, повторно стерилізують протягом 10 хвилин при  $t = 100^{\circ}\text{C}$  та фільтрують через склотканину.

До суттєвих ознак цього способу, що співпадають з ознаками способу, що заявляється належать: використання сировини, що містить білок 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 вибраної сировини. Цілком очевидно, що сфера можливого застосування даного способу обмежується виробництвом в лабораторних умовах незначних обсягів продукту. Зокрема, існує певна етична проблема, пов'язана з відношенням до процесу використання донорських матеріалів, а також необхідність враховувати імовірність негативних змін якісних параметрів препаратів крові поза межами терміну їх придатності.

Зернова барда (далі ЗБ) є основним відходом спиртового виробництва. Вміст сухої речовини в ній складає 7,5-8,5 %, з яких 26,0-30,0 % протеїни; 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 ЗБ є висушування з наступним гранулюванням та отриманням продукту з певною ринковою вартістю, відомого як DDGS (Distillers Dried Grainwith Solubles). Суха зернова барда має значно триваліші строки зберігання та використовується, головним чином, у виробництві тваринних комбикормів. При цьому постійне зростання обсягів виробництва DDGS в світі зумовлює тенденцію до зниження ринкової вартості цього продукту, [2], що в країнах з недостатньо жорстким екологічним законодавством робить економічно недоцільним впровадження цієї технології та зумовлює актуальність розробки альтернативних шляхів утилізації ЗБ.

Нутритивна цінність ЗБ, що зумовлює її придатність для виробництва поживних основ мікробіологічних середовищ, визначається наявністю білків (у т. ч. таких, що містять есенціальні амінокислоти лізин та метіонін), целюлози, а також вітамінів групи В, токоферолів та ергостерину, тощо.

Відомо використання DDGS як джерела вуглеводів при культивуванні грибів роду *Trichoderma* та *Aspergillus* для отримання позаклітинних целюлолітичних ферментів, зокрема ксілонази [3]. Інформації, щодо використання ЗБ 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 поставлено задачу розробити поживну основу для мікробіологічних культуральних середовищ, в якому за рахунок підбору оптимальних параметрів обробки ЗБ забезпечити отримання субстрату, здатного забезпечити стандартні ростові якості мікробів.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

До зернової барди додають соляну кислоту в кількості, що забезпечує кінцеву концентрацію у суміші від 2,0 до 7,0 % (переважно 4,0-6,0 %), і витримують протягом однієї доби. Отриманий гідролізат автоклавують при тиску 1,5 атм протягом 1 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 хв. при тиску 1 атм.

До суттєвих ознак рішення, що заявляється належить використання як субстрату ЗБ, проведення її солянокислого гідролізу при концентрації HCl 4,0-7,0 протягом 24 годин з наступною стерилізацією в автоклаві при тиску 1,5 атм протягом 1 години, адсорбцією, фільтрацією та повторною стерилізацією.

Оптимальна концентрація соляної кислоти визначалася за рівнем амінного азоту в отриманому гідролізаті (табл. 1).

Таблиця 1

Кількість амінного азоту в гідролізаті ЗБ, отриманому при використанні різних концентрацій HCl

Концентрація соляної кислоти, %	Аміний азот, мг % (M±m)
2,0	232,8±17,7
3,0	245,3±15,3
4,0	269,4±21,5
5,0	271,5±22,3
6,0	272,3±20,6
7,0	272,4±21,8

Наведені дані свідчать про те, що отримання бажаного технічного результату можливо в діапазоні концентрацій HCl 4,0-7,0 %, що забезпечують вміст амінного азоту в гідролізаті 247-294 мг %. Застосування концентрацій, вищих ніж 7,0 % недоцільно у зв'язку з суттєвим уповільненням дозозалежного зростання рівня амінного азоту при подальшому збільшенні концентрації цього гідролітичного агента. Крім того, надмірна кількість HCl в процесі подальшої нейтралізації утворює надмірну кількість NaCl. В межах вибраних параметрів концентрація NaCl в гідролізаті після нейтралізації становила 0,5-0,8 %, що є прийнятною для більшості поживних середовищ. Застосування концентрацій HCl, нижчих ніж 4,0 %, не забезпечує достатнього рівня гідролітичної активності.

Тривалість експозиції 24 години є оптимальною для гідролізу цього роду субстрату та, з урахуванням продовження гідролітичного процесу на тлі подальшого автоклавовування 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 КМ. Вибрані нами параметри (а саме: сорбція активованим вугіллем з розрахунку 20,0 г/л, фільтрування через склотканину та автоклавовування протягом 20 хв. при тиску 1 атм.) дозволяють отримати рідку живильну основу з вмістом амінного азоту 247-294 мг %, придатну до зберігання при температурі +4 °C протягом 60 діб.

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

ПРИКЛАД 1. Отримання поживної основи.

До 1000 мл зернової барди додавали 130 мл 38,0 % соляної кислоти, витримували протягом однієї доби, стерилізували в автоклаві протягом 1 години при тиску 1,5 атм. та нейтралізували внесенням 50,0 % NaOH до pH 7,2. Після цього вносили 20,0 г активованого вугілля, перемішували, витримували протягом доби, фільтрували крізь склотканинний фільтр та стерилізували в автоклаві 20 хв. при тиску 1 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 культурального середовища, виготовленого з використанням отриманої поживної основи.

100 мл основи розводили дистильованою водою до вмісту амінного азоту 120 мг %, додавали 2,0 % агару, стерилізували 30 хвилин при тиску 1,0 атм, проводили контроль вмісту амінного азоту та pH.

Перевірку ростових якостей отриманого середовища здійснювали за методикою [4, 5] з використанням стандартних штамів мікроорганізмів, рекомендованих для контролю якості поживних середовищ. 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 [5, 6]. Оцінка результатів проводилась через 24 години культивування(для бактерій) та через 48 годин (для грибів роду *Candida*). (табл. 2).

Таблиця 2

Ростові якості середовища на основі зернової барди

Тест-штами	Ступінь росту КУО/мл	
	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592	58,5±0,6	5,8±0,4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	57,3±0,7	5,7±0,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	53,4±0,5	5,3±0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	67,5±0,8	6,7±0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	66,3±0,6	6,6±0,4
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	13,8±0,2	немає росту
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	69,8±0,7	6,9±0,4
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	67,5±0,8	6,7±0,4

- 5 Дані, наведені в табл. 3 свідчать про достатньо високий (співставлений з аналогічним якісним параметром МПА) рівень продуктивності отриманого середовища при культивуванні окремих видів бактерій, а також грибів роду *Candida*.

Таблиця 3

Продуктивність живильного середовища на основі ЗБ в порівнянні з МПА

Стандартні штами м/о	Кількість клітин, млрд/мл, М±m	
	МПА	Середовище на основі ЗБ
1	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	60,4±0,9	59,5±0,6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	62,2±0,8	59,3±0,7
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	65,9±0,6	58,4±0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	70,2±0,9	69,9±0,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	71,6±0,7	70,5±0,8
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	зливний ріст	16,4±0,2
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	зливний ріст	16,4±0,2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	71,4±0,8	69,8±0,7
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	72,4±0,9	68,5±0,8
<i>Staphylococcus aureus</i> 94	59,2±0,9	58,5±0,7
<i>Staphylococcus aureus</i> 88	57,9±0,4	58,7±0,5
<i>Escherichia coli</i> 45	47,2±0,9	21,3±0,6
<i>Escherichia coli</i> 75	59,6±0,4	58,8±0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 93	67,3±0,9	67,4±0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 87	65,4±0,6	63,2±0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 46	66,8±0,9	64,7±0,5

- 10 Наведені дані свідчать, що середовище на основі гідролізату зернової барди може бути використано для культивування *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*.

Джерела інформації:

1. Одержання живильної основи із відходів служби крові для культивування мікроорганізмів /В.М.Ніколаєнко, Т.П. Осолодченко, СІ. Чупрінова, Л.Г. Штикер, О.І. Кравченко// Вісн. Харк. ун-ту. - 2006. - № 738. - С. 40-43.
- 15 2. Global Ethanol Production to Reach 85.2 Billion Litres in 2012 //The Renewable Fuel Association.-2012-June 26 [Електронний ресурс]: <http://www.ethanolrfa.org/news/entry/global-ethanol-production-to-reach-SS-2-billion-litres-in-2012/>
- 20 3. Enzyme production by industrially relevant fungi cultured on coproduct from corn dry grind ethanol plants. / Ximenes EA, Dien BS, Ladisch MR, Mosier N, CottaMA, Li XL.//ApplBiochemBiotechnol. - 2007. - V137-140. - P. 171-183.

4. Меджидов М.М. Справочник по микробиологическим средам. - М.: Медицина. - 2003. - 316 с.

5. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие/ Под ред. А.С. Лабинской. Л.П. Блинковой, А.С. Ещенко. - М.: Медицина, 2004. - 576.

6. Інформаційний лист МОЗУ, 15.11.00, № 05.4.1/1670 "Бактеріологічний контроль поживних середовищ".

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

1. Спосіб одержання поживної основи із зернової барди, що включає солянокислий гідроліз білковмісного субстрату, сорбцією, фільтрацією та стерилізацією гідролізату, який **відрізняється** тим, що як білковий субстрат використовують зернову барду, 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 соляної кислоти 50,0 % розчином NaOH до pH 7,0-7,2.

15

2. Спосіб за п. 1, в якому сорбцію здійснюють активованим вугіллям при концентрації 20,0 г/л

3. Спосіб за п. 1, в якому фільтрацію здійснюють через склотканинний фільтр.

20

4. Спосіб за п. 1, в якому отриманий продукт повторно стерилізують шляхом автоклавування протягом 20 хв. при тиску 1 атм.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

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