



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 97598

(13) U

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 10237**

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

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.03.2015**

(46) Публікація відомостей **25.03.2015, Бюл.№ 6**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Осолодченко Тетяна Павлівна (UA),
Пономаренко Світлана Володимирівна
(UA),
Литвиненко Оксана Анатолівна (UA),
Лук'яненко Тетяна Василівна (UA),
Менкус Олена Валерівна (UA),
Порт Олена Валерівна (UA),
Штикер Любов Григоріївна (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 ФЕРМЕНТОЛІЗАТУ ПОЖИВНОЇ ОСНОВИ ІЗ ЗЕРНОВОЇ БАРДИ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

(57) Реферат:

Спосіб одержання поживної основи із зернової барди, що включає ферментативний гідроліз субстрату, фільтрацію та стерилізацію гідролізату, ферментативний гідроліз субстрату проводять панкреатином у концентрації 1,0-1,75 г/л, після чого гідролізат автоклавують при 1,0-2,0 атм протягом 20-30 хв., після чого отриманий стерильний гідролізат фільтрують, нейтралізують розчин до рН 6,8-7,4 розчином лужних речовин, додають агар до концентрації 20-25 г/л.

UA 97598 U

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

В якості поживних основ мікробіологічних середовищ традиційно 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). Основним якісним параметром кінцевого продукту є вміст амінного азоту. Головною причиною, яка заважає отриманню бажаного технічного результату є відносно висока вартість сировини.

Найближчим аналогом запропонованого методу є спосіб одержання живильної основи із зернової барди [1], що передбачає використання як вихідної сировини відходів спиртового виробництва. Зернова барда - це продукт переробки спиртового виробництва та являє собою густу рідину насиченого темно-жовтого кольору зі шматочками пшениці (розчавлене зерно). В запропонованому способі використовують кислотний гідроліз, що потребує значних витрат електроенергії, тоді як запропонований нами спосіб дозволяє проводити гідроліз сировини ферментами навіть при кімнатній температурі.

До суттєвих ознак цього способу, що співпадають з ознаками заявленої корисної моделі, належать: використання сировини, що містить різноманітні протеїни, цукри, та вітаміни; проведення ферментативного гідролізу [2, 3], застосовані засоби стерилізації та очищення кінцевого продукту, а саме стерилізація в автоклаві при тиску (1,0-1,2) атм, фільтрація.

До причин, що заважають отриманню бажаного технічного результату, слід віднести недостатньо високий рівень технологічного процесу та відповідно, промислової придатності, зумовлений особливостями обраної сировини та засобами гідролізу, тому застосування цього технічного рішення обмежується виробництвом в лабораторних умовах незначних обсягів продукту.

Зернова барда (далі ЗБ) є 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. Суха зернова барда має значно триваліші строки зберігання та використовується, головним чином, у виробництві тваринних комбікормів. При цьому постійне зростання обсягів виробництва в світі 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 ЗБ.

Придатність для виробництва поживних основ мікробіологічних середовищ зумовлює нутритивна цінність ЗБ, що визначається наявністю протеїнів та різноманітних вуглецевих сполук тощо.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити поживну основу для мікробіологічних середовищ, в якому за рахунок підбору оптимальних параметрів обробки ЗБ забезпечити отримання субстрату, здатного забезпечити стандартні ростові якості мікробів, виділених із клінічного матеріалу, зменшити витрати фінансових та енергетичних ресурсів на отримання високоякісних промислових та аналітичних поживних середовищ.

Поставлена задача вирішується шляхом застосування способу одержання поживної основи із зернової барди, що включає ферментативний гідроліз субстрату, фільтрацію та стерилізацію гідролізату та відрізняється тим, що ферментативний гідроліз субстрату проводять панкреатином у концентрації 1,0-1,75 г/л, після чого гідролізат автоклавують при 1,0-2,0 атм протягом 20-30 хв., після чого отриманий стерильний гідролізат фільтрують, нейтралізують розчин до рН 6,8-7,4 розчином лужних речовин, додають агар до концентрації 20-25 г/л.

До суттєвих ознак рішення, що заявляється, належить використання в якості субстрату зернової барди, використання ферментативного гідролізу з застосуванням панкреатину, наступною стерилізацією, фільтрацією та повторною стерилізацією.

Приклад 1. Підбір оптимальної концентрації панкреатину для гідролізу.

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

Таблиця 1

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

Концентрація панкреатину г/л	Експозиція/год.	Аміний азот, мг % (M±m)
1,0	5	226,7±14,8
	6	231,4±15,6
	7	234,6±15,8
	8	235,8±16,6
1,25	5	245,8±14,7
	6	256,3±16,2
	7	263,9±16,7
	8	269,6±15,6
1,5	5	289,6±17,5
	6	299,7±21,6
	7	291,3±18,7
	8	289,9±19,4
1,75	5	290,5±20,5
	6	289,6±19,8
	7	289,3±18,9
	8	288,9±21,2

Наведені дані свідчать про те, що отримання бажаного технічного результату можливо в діапазоні концентрації панкреатину 1,0-1,75 г/л протягом 6-8 год., що забезпечує вміст амінного азоту в гідролізаті (289-299) мг/%. Застосування концентрацій вище ніж 2,0 % недоцільно у зв'язку з суттєвим уповільненням дозозалежного зростання рівня амінного азоту при подальшому збільшенні концентрації ферменту. Тривалість експозиції 6-8 години є оптимальною для гідролізу цього роду субстрату та, з урахуванням продовження гідролітичного процесу на тлі подальшого автоклавування при тиску 1,0-2,0 атм протягом 20-30 хв., забезпечує достатній вміст амінного азоту в отриманому продукті.

Спосіб, умови ферментації, фільтрації та повторної стерилізації можуть варіювати в різних варіантах виконання. Вибрані нами параметри (а саме: ферментація протягом 6-8 годин, фільтрація та автоклавування протягом 20-30 хв. при тиску 1,0-2,0 атм) дозволяють отримати рідку живильну основу з вмістом амінного азоту 289-299 мг%, придатну до зберігання при температурі +4 °С протягом 60 діб.

Приклад 2. Отримання поживної основи.

До 700-1000 мл зернової барди додавали панкреатин у концентрації 1,0-1,75 г/л, залишали у термостаті при 37 °С на 24 години, після цього отриманий гідролізат стерилізують в автоклаві при 1,0-2,0 атм протягом 20-30 хв., фільтрують, доводять рН розчину до 6,8-7,4 розчином лугу або кислоти. Для доведення рН можуть бути використані гідроокис натрію, гідроокис калію, розчин амоніаку, гідрохлорна або оцтова кислоти. Після нейтралізації розчину до нього додають агар до концентрації 20-25 г/л.

Одержана таким чином основа являла собою прозору рідину жовтого кольору, що містила 302,0 мг % загального азоту, 299,0 мг % амінного азоту, 5,7 мг/мл Fe²⁺, 0,6 % NaCl.

Приклад 3. Одержання та характеристика якісних параметрів поживного середовища, виготовленого з використанням отриманої живильної основи.

100 мл основи розводили дистильованою водою до вмісту амінного азоту 120-140 мг %, додавали 2,0 % агару, стерилізували 20-30 хвилин при тиску 1,0-2,0 атм, проводили контроль вмісту амінного азоту та рН.

Перевірку ростових якостей отриманого середовища здійснювали за методикою 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. 2).

Таблиця 2

Ростові якості середовища на основі ферментолізу із зернової барди

Тест-штами	Ступінь росту КУО/мл при розведенні	
	10 ²	10 ¹
Staphylococcus aureus ATCC 25923	59,9±0,8	5,9±0,7
Staphylococcus aureus ATCC 6538	62,7±0,5	6,2±0,4
Escherichia coli ATCC 25922	56,6±0,9	5,6±0,2
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	67,5±0,8	6,7±0,8
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	69,3±0,9	6,9±0,6
Proteus vulgaris ATCC 4636	Зливний ріст	6,1±0,4
Bacillus subtilis ATCC 6633	65,2±0,7	6,5±0,5
Candida albicans ATCC 885-653	58,7±0,8	5,8±0,7

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

Таблиця 3

Продуктивність живильного середовища на основі ЗБ в порівнянні з ПА

Тест-штами мікроорганізмів та клінічні ізоляти	Кількість клітин, млрд/мл, М±m	
	ПА	Середовище на основі ЗБ
1	2	3
Staphylococcus aureus ATCC 25923	63,6±0,4	63,9±0,6
Staphylococcus aureus ATCC 6538	64,6±0,2	63,4±0,8
Escherichia coli ATCC 25922	51,7±0,9	52,2±0,5
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	65,7±0,9	63,5±0,2
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	67,1±0,9	64,8±0,8
Proteus vulgaris ATCC 4636	зливний ріст	зливний ріст
Bacillus subtilis ATCC 6633	67,9±0,7	68,1±0,6
Candida albicans ATCC 885-653	63,2±0,8	63,7±0,7
Staphylococcus aureus 94 (клінічний)	65,9±0,8	68,2±0,5
Escherichia coli 45 (клінічний)	51,4±0,7	51,7±0,8
Pseudomonas aeruginosa 93 (клінічний)	69,5±0,9	71,2±0,3
Pseudomonas aeruginosa 46 (клінічний)	77,4±1,5	77,2±1,4
Candida albicans 239 (клінічний)	62,3±1,1	63,5±1,2

Наведені дані свідчать, що середовище на основі ферментолізу зернової барди може бути використано для культивування Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, 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., Волинська 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.

2. Омарова Э.Б., Меджидов М.М., Султанов З.З. Способ получения стимулятора роста микроорганизмов из кормовых дрожжей. Патент № 2227153. Бюл. Изобр. полезные модели. М., 2004, - № 11 (3 ч). - С. 516.

3. Максимова Е.М. Разработка технологии утилизации белковых отходов методом ферментативного гидролиза / Е.М. Максимова // Вестник МГТУ. - 2006. - том 9. - № 5. - С. - 875-879.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб одержання поживної основи із зернової барди, що включає ферментативний гідроліз субстрату, фільтрацію та стерилізацію гідролізату, який **відрізняється** тим, що ферментативний гідроліз субстрату проводять панкреатином у концентрації 1,0-1,75 г/л, після чого гідролізат автоклавують при 1,0-2,0 атм протягом 20-30 хв., після чого отриманий стерильний гідролізат фільтрують, нейтралізують розчин до рН 6,8-7,4 розчином лужних речовин, додають агар до концентрації 20-25 г/л.
- 10

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