



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **98199** (13) **U**
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|---|--|
| (21) Номер заявки: u 2014 10236 | (72) Винахідник(и): Менкус Олена Валерівна (UA), Пономаренко Світлана Володимирівна (UA), Осолодченко Тетяна Павлівна (UA), Лук'яненко Тетяна Василівна (UA), Порт Олена Валерівна (UA), Штикер Любов Григоріївна (UA) |
| (22) Дата подання заявки: 18.09.2014 | |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.04.2015 | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.04.2015, Бюл.№ 8 | (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 ПАТОЧНОЇ МЕЛЯСИ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

(57) Реферат:

Спосіб одержання поживної основи включає ферментативний гідроліз субстрату, фільтрацію та стерилізацію гідролізату. Як субстрат використовують паточну мелясу, її гідроліз проводять при вмісті масової частки 0,5-2,0 г/л панкреатину протягом 5-10 годин з наступним автоклавуванням при тиску 1,0-2,0 атм. протягом 30-60 хвилин, після чого проводять фільтрацію, доводять рН 6,8-7,4 розчином NaOH, додають агар з масовою часткою 20,0-25,0 г/л.

UA 98199 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 цукрового виробництва.

5 Як поживні основи 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, що заважає отриманню бажаного технічного результату, є відносно висока вартість сировини.

10 Найближчим аналогом запропонованого способу є одержання живильної основи із рослинної сировини [1], що передбачає використання як вихідної сировини відходів харчової промисловості. Паточна меляса - це продукт переробки цукрового виробництва, який являє собою рідину насиченого темно-жовтого кольору.

15 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 ферментативного гідролізу [2, 3]; застосовані засоби стерилізації та очищення кінцевого продукту, а саме стерилізація в автоклаві при тиску (1,0-1,2) атм та фільтрація.

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

25 Паточна меляса (далі ПМ) є відходом цукрового виробництва. Вміст сухої речовини в ній складає (10,0-14,0) %, з яких (16,0-20,0) % протеїни, (35,0-78,0) % різноманітні цукри; вказане і зумовлює вельми обмежені терміни її зберігання. В натуральному вигляді ця субстанція використовується в технології виробництва дріжджів.

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

30 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 мікроорганізмів, виділених із клінічного матеріалу.

35 Поставлена задача вирішується шляхом застосування способу одержання поживної основи із паточної меляси, що включає ферментативний гідроліз субстрату, фільтрацію та стерилізацію гідролізату, в якому, згідно з корисною моделлю, ферментативний гідроліз субстрату проводять панкреатином у концентрації 0,5-2,0 г/л, після чого гідролізат автоклавують при 1,0-2,0 атм протягом 30-60 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/.

40 До суттєвих ознак рішення, що заявляється, належить використання як субстрату ПМ, проведення її ферментативного гідролізу з застосуванням панкреатину - 0,5-2,0 г/л протягом 5-10 год. з наступною стерилізацією в автоклаві при тиску 1,0-2,0 атм протягом 30-60 хв., фільтрацією та повторною стерилізацією 20-30 хв. при $t=120^{\circ}\text{C}$.

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

45

Таблиця 1

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

| Концентрація панкреатину г/л | Експозиція/год. | Аміний азот, мг % (M±m) |
|------------------------------|-----------------|-------------------------|
| 1,0 | 5 | 267,7±16,7 |
| | 6 | 268,7±15,8 |
| | 8 | 269,5±16,4 |
| | 10 | 269,8±16,8 |
| 1,25 | 5 | 289,9±19,9 |
| | 6 | 285,8±18,5 |
| | 8 | 288,7±17,6 |
| | 10 | 286,3±17,1 |
| 1,5 | 5 | 280,4±16,5 |
| | 6 | 282,4±17,8 |
| | 8 | 281,1±18,2 |
| | 10 | 280,9±17,4 |
| 1,75 | 5 | 281,5±19,4 |
| | 6 | 278,6±19,1 |
| | 8 | 277,6±18,2 |
| | 10 | 279,2±18,4 |

Наведені данні свідчать про те, що отримання бажаного технічного результату можливо при концентрації панкреатину 0,5-2,0 г/л протягом 5-10 год., що забезпечує вміст амінного азоту в гідролізаті (285-289) мг/%. Застосування концентрацій вище, ніж 0,5 %, недоцільно у зв'язку з суттєвим уповільненням дозозалежного зростання рівня амінного азоту при подальшому збільшенні концентрації ферменту. Тривалість експозиції 5-10 годин 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 30-60 хв., забезпечує достатній вміст амінного азоту в отриманому продукті.

Спосіб, умови ферментації, фільтрації та повторної стерилізації можуть варіювати в різних варіантах виконання. Обрані нами параметри (а саме: ферментація протягом 5-10 годин, фільтрація та автоклавування протягом 30-60 хв. при тиску 1,0-2,0 атм.) дозволяють отримати рідку живильну основу з вмістом амінного азоту 285-289 мг%, придатну до зберігання при температурі +4 °C протягом 120 діб.

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

Приклад 1. Отримання поживної основи.

До 1000 мл паточної м'яси додавали 0,5-2,0 г/л панкреатину, витримували протягом 5-10 годин при t=50 °C, стерилізували в автоклаві протягом 30-60 хв. при тиску 1,0-2,0 атм. Після цього вносили 20,0 г агару, перемішували 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 318,0 мг % загального азоту, 289,0 мг % амінного азоту, 5.1 мг/мл Fe²⁺, 0,6 % NaCl.

Приклад 2. 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 20-40 хв. при тиску 1,0-2,0 атм, проводили контроль вмісту амінного азоту та pH.

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. 2).

Таблица 2

Ростові якості середовища на основі ферментолізу із паточної меляси

| Тест-штами | Ступінь росту КУО/мл при розведенні | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| | 10 ² | 10 ¹ |
| Staphylococcus aureus ATCC 25923 | 61,4±0,7 | 6,1±0,7 |
| Staphylococcus aureus ATCC 6538 | 60,4±0,7 | 6,0±0,5 |
| Escherichia coli ATCC 25922 | 58,8±0,9 | 5,8±0,4 |
| Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 | 68,7±0,9 | 6,8±0,8 |
| Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 | 67,9±0,7 | 6,7±0,5 |
| Proteus vulgaris ATCC 4636 | Зливний ріст | 6,0±0,3 |
| Bacillus subtilis ATCC 6633 | 68,5±0,8 | 6,8±0,6 |
| Candida albicans ATCC 885-653 | 69,8±0,5 | 6,9±0,8 |

Дані, наведені в табл. 3, свідчать про достатньо високий рівень продуктивності отриманого середовища при культивуванні окремих видів бактерій а також грибів роду Candida.

5

Таблица 3

Продуктивність живильного середовища на основі ПМ в порівнянні з ПА

| Тест-штами мікроорганізмів та клінічні ізоляти | Кількість клітин, млрд/мл, М±m | |
|--|--------------------------------|-------------------------|
| | ПА | Середовище на основі ПМ |
| 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 | 67,8±0,8 | 66,5±0,7 |
| Candida albicans ATCC 885-653 | 69,7±0,8 | 69,5±0,7 |
| Staphylococcus aureus 94 (клінічний) | 64,5±0,5 | 64,2±0,3 |
| Escherichia coli 45 (клінічний) | 60,3±0,6 | 59,8±0,9 |
| Pseudomonas aeruginosa 93 (клінічний) | 61,4±0,6 | 60,9±0,5 |
| Candida albicans 148 (клінічний) | 71,7±1,3 | 70,9±1,5 |
| Candida albicans 164 (клінічний) | 72,4±1,6 | 73,7±1,3 |
| Candida albicans 239 (клінічний) | 72,7±1,5 | 73,7±1,4 |

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

10 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.

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

20 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

25 Спосіб одержання поживної основи, що включає ферментативний гідроліз субстрату, фільтрацію та стерилізацію гідролізату, який **відрізняється** тим, що як субстрат використовують паточну мелясу, її гідроліз проводять при вмісту масової частки 0,5-2,0 г/л

панкреатину протягом 5-10 годин з наступним автоклавуванням при тиску 1,0-2,0 атм. протягом 30-60 хвилин, після чого проводять фільтрацію, доводять рН 6,8-7,4 розчином NaOH, додають агар з масовою часткою 20,0-25,0 г/л.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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

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