



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 77052

(13) U

(51) МПК

G01N 33/483 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 08779**

(22) Дата подання заявки: **16.07.2012**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.01.2013**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.01.2013, Бюл.№ 2**

(72) Винахідник(и):

**Рухляда Валентин Васильович (UA),  
Андрійчук Андрій Віталійович (UA),  
Данкович Роман Степанович (UA),  
Зайцев Олександр Олександрович (UA)**

(73) Власник(и):

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ  
МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ  
С.З. ГЖИЦЬКОГО,  
вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010 (UA)**

## (54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ОХРАТОКСИНУ А

(57) Реферат:

Спосіб отримання охратоксину А включає використання як продуцента культуру гриба *Aspergillus ochraceus*, яку вносять у попередньо підготовлене зерно пшениці, культивування, інактивування вегетативних форм гриба та екстракцію охратоксину хлороформом з ортофосфорною кислотою, упарювання хлороформних екстрактів і визначення в ньому охратоксину А хроматографічним шляхом. Як продуцент охратоксину А в способі використовують культуру гриба *Aspergillus ochraceus* штам № 7.

UA 77052 U



Корисна модель належить до галузі мікології, зокрема до методів виділення і дослідження токсичних метаболітів плісневих грибів, що уражають переважно корми рослинного походження. Корисна модель може бути використана для дослідження здатності *Aspergillus ochraceus* продукувати охратоксини, з метою використання охратоксинів в наукових експериментах, а також в біологічних, медичних, ветеринарних установах, котрі займаються дослідженням мікроскопічних грибів та їх вторинних метаболітів, у біотехнологічній промисловості - для отримання охратоксинів, які можуть використовуватись як стандарти при визначенні вмісту охратоксинів хроматографічними методами у кормах для тварин, харчових продуктах, в органах і тканинах тощо.

В процесі своєї життєдіяльності мікроскопічні гриби виділяють мікотоксини - вторинні низькомолекулярні метаболіти, які мають виражений токсичний вплив. Охратоксини - це група структурно-споріднених сполук, а саме ізокумаринів, зв'язаних пептидним зв'язком з L-фенілаланіном. Охратоксин А - це 5-хлорізокумарин, зв'язаний пептидним зв'язком з L-фенілаланіном. Основними продуцентами охратоксину А є *Aspergillus ochraceus* і *Penicillium viridicatum*. Зазначені плісневі гриби, за сприятливих умов, уражають корми рослинного походження і в процесі своєї життєдіяльності виділяють токсичні метаболіти, одним з яких є охратоксин А.

Більшість відомих на сьогодні способів отримання охратоксинів, базуються на культивуванні продуцентів охратоксинів на зерні злакових культур або твердому рисовому середовищі, з додаванням 2 % дріжджового екстракту та % фенілаланіну та з наступною екстракцією охратоксинів сумішшю хлороформу та 0,1 н. розчину ортофосфорної кислоти, реекстракції мікотоксину з хлороформу в 0,1 н. розчин натрію двовуглекислого, відділенні лужного розчину від хлороформу, підкислення його мурашиною кислотою до рН 2-3, реекстракції мікотоксину в нову порцію хлороформу, концентрації його і розділенням методом хроматографії в тонкому шарі ("Лабораторные исследования в ветеринарии. Биохимические и микологические. - Под ред. Б.И. Антонова / М.: 1991.-287 с.).

Відомий спосіб виділення охратоксину А з зернофуражу, продуктів його переробки та комбікормів (кн: "Лабораторные исследования в ветеринарии. Биохимические и микологические. - Под ред. Б.И. Антонова / М., 1991. С. 133-135"), який базується на екстракції охратоксину А сумішшю хлороформу та 0,1 н. розчину ортофосфорної кислоти, реекстракції мікотоксину з хлороформу в 0,1 н розчин натрію двовуглекислого, відділенні лужного розчину від хлороформу, підкислення його мурашиною кислотою до рН 2-3, реекстракції мікотоксину в нову порцію хлороформу, концентрації його і розділенням методом хроматографії в тонкому шарі.

Недоліком цього способу є довготривалість проведення та надмірне використання реактивів, прогнозована низька кількість отриманих мікотоксинів.

Найбільш близьким по суті до способу, що заявляється, є спосіб одержання охратоксину А з використанням штаму гриба *Aspergillus ochraceus* 740 / ПУ на винахід №10475 А /

Спосіб включає культивування гриба з метою накопичення охратоксину А: у вірусологічні матраци ємністю 1000 см<sup>3</sup> поміщають 100 г пшениці, додають 80 см<sup>3</sup> водопровідної води, закривають ватно-марлевым корком, обв'язують пергаментним папером і стерилізують в автоклаві при 1 атм 1 год. Як інокулом використовують 10-ти добову культуру гриба *Aspergillus ochraceus*, штам 740, вирощену при 30 °С на агарі Чапека. Потім додають в пробірку 5 см<sup>3</sup> стерильної водопровідної води і піпеткою зіскоблюють міцелій з поверхні культури, при цьому старанно перемішуючи з водою елементи гриба.

Отриману водну суспензію вносять в матрац зі стерильною пшеницею, старанно струшують і поміщають в термостат при 30 °С на 15 діб. Після закінчення культивування зерно з культурою грибів знешкоджують шляхом автоклавування протягом 20 хв. при 0,5 атм.

Після цього відбирають наважку масою 50 г, яку переносять в колбу ємністю 500 мл. В колбу вносять 25 мл 0,1 М розчину ортофосфорної кислоти та 250 мл хлороформу. Екстрагують мікотоксин, струшуючи вміст колби на шутель-апараті протягом 30 хв. або настоюванням протягом 12 год.

Екстракт відділяють від зерна фільтрацією через паперовий фільтр. Фільтрат переносять в ділильну лійку ємністю 500 мл, додають 200 мл 0,1 н розчину натрію двовуглекислого, вміст добре перемішують. Після розділення суміші шар хлороформу видаляють, водний залишок підкислюють мурашиною кислотою до рН 2-3 і додають 50 мл хлороформу, який після відділення об'єднують з першою порцією і випарюють до густого залишку за температури не вище 60 °С. Залишок екстракту в фарфоровій чашці використовують для кількісного визначення вмісту охратоксину А (за допомогою хроматографічних методів дослідження).

Вміст охратоксину А в п'ятнадцятидобовій культурі коливається в межах 1,5-2,1 г/кг.

Заявлений спосіб і найближчий аналог мають суттєві спільні ознаки: спосіб включає використання як продуцента культуру гриба *Aspergillus ochraceus*, яку вносять у попередньо підготовлене зерно пшениці, культивування при температурі 30 °С, протягом 14 днів, інактивування вегетативних форм гриба здійснюють автоклавуванням. Екстракцію охратоксину А проводять хлороформом з ортофосфорною кислотою, з наступним упарюванням хлороформних екстрактів до густого залишку і визначенням в ньому охратоксину А методом рідинної хроматографії.

Недоліком цього способу є низька кількість отриманого охратоксину А та недостатній режим автоклавування нативної культури, що може спричинити ураження грибами лабораторії та людей, які у ній працюють.

Запропонований нами спосіб усуває недоліки найближчого аналога і забезпечує швидке і ефективне отримання охратоксинів. Цей спосіб є нескладний у виконанні, не потребує дорогих матеріалів. Він не вимагає складного спеціального обладнання, інструментарію, ним може оволодіти працівник без спеціальної освіти.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити зручний, ефективний, економічно вигідний і нескладний у практичному використанні спосіб отримання охратоксину А.

Поставлена задача вирішується тим, що як продуцент охратоксину А в способі використовують 10 денну культуру *Aspergillus ochraceus* штам № 7 вирощену на агарі Чапека при  $t=29\text{ }^{\circ}\text{C}$ , яку попередньо суспендують у 20 см<sup>3</sup> розчину середовища Чапека без агар-агару, що вносять у 100 г пшениці з додаванням 80 см<sup>3</sup> розчину, що вміщує глюкозу, натрію нітрат, магнію сульфат, калію хлорид, заліза (II) сульфат, калію-фосфат двозаміщений та дистильовану воду.

В процесі росту *Aspergillus ochraceus* штам № 7 (протягом 14 діб при температурі 29 °С) на описаному субстраті гриби виділяють охратоксини. Після 14 днів культивування зерно з культурою грибів і накопиченими охратоксинами інактивують автоклавуванням (при 1 атм 1 год.) з метою знищення вегетативних форм грибів. За таких умов мікотоксини не руйнуються. Після автоклавування в колбу вносять 100 г субстрату, додають 50 мл 0,1 М розчину ортофосфорної кислоти та 500 мл хлороформу. Екстрагують мікотоксин, струшуючи вміст колби на шутель-апараті протягом 30 хв. або настоюванням протягом 12 год.

Екстракт відділяють від субстрату фільтрацією через паперовий фільтр на лійці Бюхнера під від'ємним тиском. Фільтрат переносять в ділильну лійку ємністю 2000 мл, додають 400 мл 0,1 н розчину натрію двовуглекислого, вміст добре перемішують. Після розділення суміші шар хлороформу зливають через нижній край ділильної лійки, а водний залишок підкислюють мурашиною кислотою до рН 2-3 і додають 100 мл хлороформу, який після відділення об'єднують з першою порцією і випарюють у скляному дистиляційному апараті до густого залишку за температури не вище 60 °С. Залишок екстракту в колбі використовують для кількісного визначення вмісту охратоксину А (за допомогою хроматографічних методів дослідження).

Технічний результат заявленого способу забезпечується внаслідок ретельного виконання всіх етапів способу, які відрізняються від найближчого аналога.

У вірусологічні матраци ємністю 1000 см<sup>3</sup> поміщають 100 г пшениці, додають 80 см<sup>3</sup> рідини наступного складу: глюкоза - 30 г, натрію нітрат - 2 г, магнію сульфат - 0,5 г, калію хлорид - 0,5 г, заліза (II) сульфат - 0,01 г, калію-фосфат двозаміщений - 1г, H<sub>2</sub>O дистильована до 1 л). закривають ватно-марлевою пробкою, обв'язують пергаментним папером і стерилізують в автоклаві при 1 атм 1 год. Як інокулюм використовують 10 денну культуру *Aspergillus ochraceus* штам №7, вирощену при 29 °С на агарі Чапека. При цьому міцелій гриба знімають з середовища Чапека мікологічним гачком і вносять у 10 мл стерильного розчину середовища Чапека без агар-агару. Останнє додають у матрац зі стерильним зерном пшениці. Матрац старанно струшують, поміщають в термостат при 29 °С на 14 діб.

Після закінчення культивування нативну культуру знешкоджуємо автоклавуванням при 1 атм протягом 1 год. Після цього в колбу вносимо 50 мл 0,1 М розчину ортофосфорної кислоти та 500 мл хлороформу. Екстрагуємо охратоксин А струшуючи його на шутель-апараті протягом 30 хв. Екстракт фільтруємо через паперовий фільтр, переносимо в ділильну лійку ємністю 1000 мл, додають 400 мл 0,1 н розчину натрію двовуглекислого, вміст добре перемішуємо. Після розділення суміші шар хлороформу зливаємо у фарфорову чашку, а водний залишок повторно обробляємо 100 мл хлороформу, який після відділення об'єднуємо з першою порцією і випарюємо до сухого стану за температури не вище 60 °С.

Залишок екстракту в фарфоровій чашці використовуємо для кількісного визначення вмісту охратоксину А за допомогою хроматографічних методів дослідження.

Наведені інформаційні відомості пояснюють одержання технічного результату заявленого способу. Таким чином, запропонований нами спосіб усуває недоліки найближчого аналога і забезпечує отримання охратоксину А в досить значних кількостях.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку знайдено технічне рішення /ПУ на винахід № 10475 А /, що містить найбільшу кількість суттєвих ознак, спільних із заявленим рішенням: спосіб включає використання як продуцента культуру гриба *Aspergillus ochraceus*, яку вносять у попередньо підготовлене зерно пшениці, культивування при температурі 30 °С протягом 14 днів, інактивування вегетативних форм гриба автоклавуванням та екстракцію охратоксину хлороформом з ортофосфорною кислотою, упарюванням хлороформних екстрактів до густого залишку і визначенням в ньому охратоксину А хроматографічним шляхом.

Однак наявність зазначених, спільних з найближчим аналогом ознак, є недостатньою для одержання технічного результату, який забезпечує заявлений спосіб.

Технічних рішень, які за сукупністю ознак повністю б співпадали із заявленим - не виявлено.

У патентній і науково-технічній інформації не знайдено технічних рішень, у яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від найближчого аналога і забезпечують досягнення технічного результату тим, що як продуцент охратоксину А в способі використовують 10 денну культуру гриба *Aspergillus ochraceus* штам № 7, вирощену на агарі Чапека, при температурі 29 °С, яку попередньо суспензують у 20 см<sup>3</sup> розчину середовища Чапека без агар-агару, що вносять у 100 г пшениці, з 80 см<sup>3</sup> розчину, що вміщує глюкозу, натрію нітрат, магнію сульфат, калію хлорид, заліза (II) сульфат, калію-фосфат двозаміщений та дистильовану воду, культивування здійснюють при t=29 °С протягом 14 днів після чого культуру грибів у зерні з накопиченим охратоксином А інактивують автоклавуванням при 1 атмосфері протягом 1 години.

Корисна модель належить до галузі мікології, зокрема до методів виділення і дослідження токсичних метаболітів плісневих грибів, що уражають переважно корми рослинного походження. Корисна модель може бути використана для дослідження здатності *Aspergillus ochraceus* продукувати охратоксини, з метою використання охратоксинів в наукових експериментах, а також в біологічних, медичних, ветеринарних установах, котрі займаються дослідженням міксоміцетів та їх вторинних метаболітів.

Реалізацію заявленого способу здійснюють наступним чином: як продуцент використовують 10 добову культуру *Aspergillus ochraceus* штам №7, вирощену на агарі Чапека, при температурі 29 °С, яку попередньо вносимо у 20 см<sup>3</sup> розчину середовища Чапека без агар-агару. Останнє вносять у 100 г пшениці, з 80 см<sup>3</sup> розчину наступного складу: глюкоза - 30 г, натрію нітрат -2 г, магнію сульфат - 0,5 г, калію хлорид - 0,5 г, заліза (II) сульфат -0,01 г, калію-фосфат двозаміщений -1г, Н<sub>2</sub>О дистильована до 1 л. Описаний субстрат перед цим автоклавують (при 1 атм протягом 1 год.). Проводять культивування протягом 14 днів в термостаті при температурі 29 °С.

Після закінчення культивування нативну культуру знешкоджують автоклавуванням при 1 атм протягом 1 год. Після цього проводять екстракцію охратоксину А сумішшю хлороформу та ортофосфорної кислоти. В колбу вносять субстрат з нагромадженим охратоксином А та заливають 50 мл 0,1 М розчину ортофосфорної кислоти та 500 мл хлороформу. Екстракують охратоксин А струшуючи його на шутель-апараті протягом 30 хв. Екстракт відділяють від субстрату фільтрацією через паперовий фільтр на лійці Бюхнера під від'ємним тиском. Фільтрат переносять в ділильну лійку ємністю 2000 мл, додають 400 мл 0,1 н розчину натрію двовуглекислого, вміст добре перемішують. Після розділення суміші шар хлороформу зливають через нижній край ділильної лійки, а водний залишок підкислюємо мурашиною кислотою до рН 2-3 і додають 100 мл хлороформу, який після відділення об'єднують з першою порцією і випарюють у скляному дистиляційному апараті до густого залишку за температури не вище 60 °С. Залишок екстракту в колбі використовують для кількісного визначення вмісту охратоксину А (за допомогою хроматографічних методів дослідження).

Усі дослідження необхідно проводити з дотриманням правил техніки безпеки, з використанням реактивів кваліфікації "ХЧ" або "ЧДА".

Ефективність заявленого способу підтверджена прикладом конкретного виконання корисної моделі.

В умовах лабораторії кафедри мікробіології та вірусології Білоцерківського національного аграрного університету з трупів свиней було виділено культуру грибів *Aspergillus ochraceus* штам № 7. Цей штам, в умовах лабораторії кафедри патанатомії і гістології ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького вирощували на агарі Чапека, при температурі 29 °С протягом 10 діб. Після цього культуру гриба суспензували у 20 см<sup>3</sup> розчину середовища Чапека без агар-агару. Суспензію вносили у 100 г пшениці, з додаванням 80 см<sup>3</sup> розчину такого складу: глюкоза - 30 г, натрію

нітрат -2 г, магнію сульфат - 0,5 г, калію хлорид - 0,5 г, заліза (II) сульфат - 0,01 г, калію-фосфат двозаміщений -1г, H<sub>2</sub>O дистильована до 1 л. Проводили культивування на протязі 14 днів в термостаті при температурі 29 °С...

Після закінчення культивування нативну культуру знешкоджували автоклавуванням при 1 атм протягом 1 год. Усі види робіт, пов'язані з екстракцією охратоксину А проводили у витяжній шафі. Після цього в колбу вносимо 50 мл 0,1 М розчину ортофосфорної кислоти та 500 мл хлороформу. Екстрагували охратоксин А струшуючи суміш на шутель-апараті протягом 30 хв. Екстракт відділяли від субстрату фільтрацією через паперовий фільтр на лійці Бюхнера під від'ємним тиском. Фільтрат переносили в ділильну лійку ємністю 2000 мл, додавали 400 мл 0,1 н розчину натрію двовуглекислого, вміст добре перемішували. Після розділення суміші шар хлороформу зливали через нижній край ділильної лійки, а водний залишок підкислювали мурашиною кислотою до рН 2-3 і додавали 100 мл хлороформу, який після відділення об'єднували з першою порцією і випарювали у скляному дистиляційному апараті до густого залишку за температури не вище 60 °С. Залишок екстракту в колбі використовували для кількісного визначення вмісту охратоксину А (за допомогою хроматографічних методів дослідження).

Дані, отримані в результаті порівняння найближчого аналога та запропонованого методу наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

## Порівняльна оцінка способів екстракції охратоксинів

Найближчий аналог	Новий метод
Використання як інокулянта <i>Aspergillus ochraceus</i> 740	Використання як інокулянта <i>Aspergillus ochraceus</i> штам № 7
Для вирощування культуру гриба вносять у зерно, попередньо перемішавши їх у 5 см <sup>3</sup> стерильної водопровідної води з водою за допомогою бактеріологічного гачка	Для вирощування культуру гриба вносять у зерно, попередньо суспендувавши її у 20 мл розчину середовища Чапека без агар-агару
Посів культури гриба з метою накопичення охратоксину А проводять на зерно пшениці з додаванням 80 мл водопровідної води	Посів культури гриба з метою нагромадження охратоксину А проводять на зерно пшениці з додаванням 80 см <sup>3</sup> розчину такого складу: глюкоза -30 г, натрію нітрат -2 г, магнію сульфат - 0,5 г, калію хлорид - 0,5 г, заліза (II) сульфат - 0,01 г, калію-фосфат двозаміщений -1г, H <sub>2</sub> O дистильована до 1 л.
Культивування проводять при температурі 30 °С на протязі 14 днів	Культивування проводять при температурі 29 °С на протязі 14 днів
Після 14 днів культивування зерно з культурою грибів і накопиченим охратоксином А інактивують автоклавуванням (при 0,5 атм 0,5 год.)	Після 14 днів культивування зерно з культурою грибів і накопиченим охратоксином А інактивують автоклавуванням (при 1 атм 1 год.)
Екстракцію охратоксину А проводять хлороформом та ортофосфорною кислотою	
В п'ятнадцятидобовій культурі продуцент утворює 1,5-2,1 г/кг охратоксину А	В п'ятнадцятидобовій культурі продуцент утворює 2,8-3,2 г/кг охратоксину А

20

При порівняльній оцінці обох методів відзначено, що охратоксин А утворюється в обох випадках, проте запропонований нами спосіб дозволив отримати значно більші концентрації охратоксинів. Триваліші умови автоклавування дозволяють забезпечити кращу безпеку осіб, які проводять екстракцію охратоксину А. Результати досліджень, здійснених у прикладі конкретного виконання корисної моделі підтверджують ефективність заявленого способу.

25

Таким чином, запропонований нами спосіб екстракції охратоксину А є зручним, надійним, не складним у практичному використанні, дозволяє отримати більші концентрації охратоксину А, а тому більш ефективним, порівняно з найближчим аналогом.

30

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання охратоксину А, який включає використання як продуцента культуру гриба *Aspergillus ochraceus*, яку вносять у попередньо підготовлене зерно пшениці, культивування при

- температурі 30 °С протягом 14 днів, інактивування вегетативних форм гриба автоклавуванням та екстракцію охратоксину хлороформом з ортофосфорною кислотою, упарювання хлороформних екстрактів до густого залишку і визначення в ньому охратоксину А хроматографічним шляхом, який **відрізняється** тим, що як продуцент охратоксину А в способі
- 5 використовують 10 денну культуру гриба *Aspergillus ochraceus* штам № 7, вирощену на агарі Чапека при  $t=29^{\circ}\text{C}$ , яку попередньо суспензують у  $20\text{ см}^3$  розчину середовища Чапека без агар-агару і вносять у 100 г пшениці, з додаванням  $80\text{ см}^3$  розчину, що вміщує глюкозу, натрію нітрат, магнію сульфат, калію хлорид, заліза (II) сульфат, калію-фосфат двозаміщений та дистильовану воду, культивування здійснюють при  $t=29^{\circ}\text{C}$  протягом 14 днів після чого культуру
- 10 грибів у зерні з накопиченим охратоксином А інактивують автоклавуванням при 1атм протягом 1 години.

---

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

---

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