



OPIS PATENTOWY

84577

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 14.04.72 (P. 154723)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 31.05.73

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1976

MKP C12k 1/06

Int.Cl.² C12K 1/06

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Mirosław Urbański, Teresa Melnarowicz, Teresa Borowiak, Janina Kuźdrzał, Irena Mydlowska, Joanna Iwanowska, Anna Walczak, Irena Spindler

Uprawniony z patentu: Gorzowskie Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego, Gorzów Wielkopolski (Polska)

Sposób otrzymywania podłoża do hodowli bakterii

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania podłoża do hodowli bakterii.

Dotychczasowy stan techniki. Do hodowli drobnoustrojów używa się wielu różnych podłoży tak podstawowych, jak i specjalnych wzbogaconych. Podłoża te wykonuje się różnymi metodami przy użyciu najczęściej jako składnika podstawowego białka zwierzęcego, w szczególności mięsa wołowego. Podłoża wykonane w oparciu o białka roślinne mają swoje zastosowanie, lecz ich przydatność jest bardziej ograniczona, niż podłoża wykonanych w oparciu o białko zwierzęce. Szczególnie odnosi się to do bakterii chorobotwórczych. Najczęściej używa się podłoży wykonanych przez gotowanie mięsa i otrzymywanie z niego tak zwanych wyciągów, z których sporządza się buliony przez małe rozcieńczenie wodą i dodanie peptonu, chlorku sodu i ustalenie pH.

Dość często trzeba takie podłoża wzbogacać krwią, surowicą lub innymi związkami tak organicznymi, jak i nieorganicznymi w celu uzyskania lepszych wzrostów, jak również selektywności w odniesieniu do ściśle określonych grup bakterii.

Znane i opisywane podłoża wykonuje się, przeprowadzając hydrolizę białka enzymami, zawartymi w jednym narzędziu np. trzustce. Do podłoży takich można zaliczyć bulion Hottingera i bulion Hartleya. W przypadku bulionu Hottingera używa się mięso i zmieloną świeżą trzustkę. Hydroliza zachodzi w czasie kilku dni. Również bulion Hartleya

2

uzyskuje się przy wykonywaniu wyciągu z trzustki, prowadząc hydrolizę w okresie 6 godzin.

Przy znanych sposobach otrzymywania wyciągów mięsnych straty białka po wykonaniu podłoży wynoszą około 90 procent.

W przypadku otrzymywania podłoża sposobem według wynalazku straty białka są minimalne, a podłoże spełnia żądane warunki.

Istota wynalazku. Celem wynalazku było opracowanie technologii otrzymywania podłoża do hodowli bakterii z możliwością długotrwałego przechowywania w postaci koncentratu.

Cel ten osiągnięto przez długoletnie prace doświadczalne nad doбором surowca, jak i składników naturalnych, zawierających enzymy. Prace pozwoliły na ustalenie, że najkorzystniejsze wyniki otrzymano przez działanie na elementy upostaciowane krwi zestawem enzymów, zawartych w zmielonym żołądku wieprzowym dodanym w ilości 15—25 procent, w rozartej trzustce wieprzowej dodanej w ilości 8—12 procent oraz w śluzówce jelita cienkiego świni dodanej w ilości 2—4 procent, w stosunku do wagi elementów upostaciowanych krwi.

Hydrolizę przeprowadza się w temperaturze 37°—41°C w środowisku o pH=8,0—8,2 w czasie 72—96 godzin. Po tym czasie hydrolizat poddaje się zakwaszeniu do pH=4,5.

Elementy upostaciowane krwi są bezużytecznym białkiem po odwirowaniu potrzebnej do innych celów surowicy.

Podłoże, wykonane w oparciu o elementy upostaciowane krwi, jak stwierdzono, posiada 18 aminokwasów oraz sole mineralne. Pozwala to na stosowanie go bez specjalnych dodatków wzbogacających do ustalenia lepszych wzrostów.

Hydroliza enzymatyczna, przeprowadzona przy powyższym doborze jakościowym i ilościowym, pozwoliła na uzyskanie podłoża do hodowli bakterii w postaci koncentratu, który nadaje się do normalnego przechowywania i wykazuje przydatność przez okres ponad dwu lat.

Wykonując cały szereg doświadczeń, stwierdzono, że elementy upostaciowane krwi, poddane hydrolizie enzymatycznej dają produkt końcowy, który w wielu przypadkach jest lepszy od produktów końcowych, otrzymanych przez hydrolizę mięsa, czy też innego białka. Zaletą jest otrzymywanie produktu końcowego jako ekstraktu, który po wielokrotnym rozcieńczeniu wodą od 1:5 do 1:20 w zależności od potrzeb, spełnia taką rolę, jak większość

podłoży, wykonanych w oparciu o mięso zwierzęce, które to najczęściej rozcieńcza się wodą w stosunku 1:2.

Inną zaletą opracowanego podłoża jest to, że kontrolując jego przydatność do hodowli bakterii przez okres ponad dwu lat, nie traci ono nic ze swej wartości użytkowej. Zaletą podłoża wykonanego na drodze hydrolizy enzymatycznej elementów upostaciowanych krwi jest również i to, że do rozcieńczonego już hydrolizatu nie potrzeba dodawać peptonu w celu jego wzbogacenia, a tylko należy korygować pH i dodawać chlorek sodu.

Wykonując badania na zawartość azotu aminowego i białkowego stwierdzono dużą koncentrację szczególnie azotu aminowego w ekstrakcie w porównaniu do bulionu wołowego peptonowego i 1 procentowej wody peptonowej, a nawet ekstraktu, otrzymanego na drodze hydrolizy enzymatycznej mięsa wołowego.

Otrzymane wyniki ilustruje poniższa tabela 1.

Tabela 1

Lp.		Azot aminowy w procentach objętościowych	Azot białkowy procent, w przeliczeniu na wagę 1 ml
1	Hydrolizat enzymatyczny z elementów upostaciowa- nych krwi (ekstrakt)	0,546	1,053
2	Hydrolizat enzymatyczny z mięsa wołowego (ekstrakt)	0,507	1,318
3	Bulion wołowy peptonowy	0,0210	0,1905
4	Woda peptonowa 1 pro- centowa	0,0490	0,0687

Jak już zaznaczono, ekstrakt otrzymany na drodze hydrolizy enzymatycznej elementów upostaciowanych krwi można przechowywać przez dłuższy okres czasu, w którym to nie traci on swych wartości użytkowych.

Poniższa tabela 2 ilustruje zawartość azotu aminowego i białkowego w zależności od czasu przechowywania w temperaturze pokojowej przez okres 10 miesięcy.

Tabela 2

Lp.	Seria hydrolizatu (elementy upostacio- wane krwi)	Czas przechowywania	Azot aminowy w % objętościowych	Azot białkowy w % w przeli- czeniu na wagę 1 ml
1	14	po wykonaniu	0,622	1,161
2	14	po 6-ciu tyg. leżakowania	0,637	1,248
3	13	po wykonaniu	0,546	1,053
4	13	po 10-ciu mies. leżakowania	0,721	1,236
5	12	po wykonaniu	0,485	1,054
6	12	po 10-ciu mies. przechowywania	0,507	1,414

Najbardziej zaskakujące wyniki otrzymano poprzez badania porównawcze wzrostu różnych bakterii na podłożu rozcieńczonym wodą, otrzymanym z ekstraktu hydrolizy enzymatycznej upostaciowa-

nych elementów krwi w odniesieniu do wzrostu na bulionie peptonowym wołowym.

Ilustruje to tabela 3.

Tabela 3

Lp.	Rodzaj bakterii	Ilość komórek bakteryjnych w ml w 1 ml po 18 godzinach inkubacji	
		bulion wołowy peptonowy	podłoże wykonane z enzymatycznego ekstraktu elementów upostaciowanych krwi rozcieńczone wodą 1:10 bez peptonu z dodatkiem NaCl (0,5%)
1	gat. <i>Pasteurella multocida</i>	0,8—2,5	5—9
2	<i>E. coli</i>	0,5—1,2	2—4
3	<i>Streptococcus</i>	0,1—0,5	0,1—0,5
4	<i>Corynebacterium</i>	0,5—0,7	1—2
5	<i>Salmonella</i>	0,5—1	2—3

Wykonując badania przydatności ekstraktu po dwuletnim przechowywaniu w temperaturze pokojowej nie stwierdzono, by ten czasokres wpływał ujemnie na wartość ekstraktu i podłoży z niego wykonywanych, odnośnie wzrostu bakterii. W tabeli 3 nie podano innych rodzajów, czy gatunków drobnoustrojów, które używano do badań przydatności wyżej omawianego podłoża, wyniki wzrostu bakterii były również lepsze niż na bulionie wołowym peptonowym i to w rozcieńczeniach wyższych.

Przykład I

1000 gram elementów upostaciowanych krwi miele się przez maszynkę do mięsa, dodając do nich 2000 mililitrów wody wodociągowej i gotuje w naczyniu na małym ogniu przez 15—20 minut. Następnie oziębia się do temperatury 37—40 stopni Celsjusza, ustala pH na 8,0—8,2 10 procentowym ługiem sodowym, w dalszej kolejności dodaje się 200 gram zmielonego żołądka świńskiego, 100 gram roztartej w mózdzierzu trzustki wieprzowej, 20 gram śluzówki z jelita cienkiego świni, 25 mililitrów chloroformu i 25 mililitrów toluenu.

Po dodaniu i zmieszaniu wszystkich składników i ochłodzonych do temperatury 37—40 stopni Celsjusza elementów upostaciowanych krwi z wodą, całość wstawia się do termostatu o temperaturze 37 stopni Celsjusza na 72 godziny, codziennie kilka razy lekko mieszając, jak również sprawdzając pH i w razie konieczności doprowadzając do pH=8,0—8,2 10 procentowym ługiem sodowym. Po około 72 godzinach trzymania w termostacie, hydrolizat zakwasza się 10 procentowym kwasem solnym do pH=4,5.

Następnie zakwaszony hydrolizat doprowadza się do wrzenia, gotując 15—30 minut. Po zagotowaniu hydrolizat chłodzi się do temperatury około 60 stopni Celsjusza i przesącza przez watę. Po prze-filtrowaniu pozostawia się hydrolizat w chłodnym miejscu na 24 godziny. Po tym czasie uzupełnia się ubytek hydrolizatu wodą do pierwotnej objętości, doprowadza się pH hydrolizatu do 7,6 i przesącza przez bibułę. Następnie rozlewa się hydrolizat do jałowych naczyń, szczelnie zamyka korkami lub kapslami gumowymi i sterylizuje w autoklawie w temperaturze 120 stopni Celsjusza przez 30 minut. Po sterylizacji hydrolizat wstawia się możliwie w

chłodne miejsce do leżakowania na okres sześciu tygodni. Przed użyciem hydrolizat przesącza się i rozcieńcza się wodą w zależności od potrzeb.

Badania kontrolne hydrolizatu wykazały zawartość następujących ilości azotu aminowego w procentach objętościowych i azotu białkowego w przeliczeniu na wagę 1 mililitra:

azot aminowy w procentach objętościowych —0,507
azot białkowy procent w przeliczeniu na wagę 1 mililitra —1,414

Przykład II

1000 gram elementów upostaciowanych krwi miele się przez maszynkę do mięsa, dodając do nich 3000 mililitrów wody wodociągowej i gotuje w naczyniu na małym ogniu przez 15—20 minut. Następnie oziębia się do temperatury 37—40 stopni Celsjusza, ustala pH na 8,0—8,2 10 procentowym ługiem sodowym, w dalszej kolejności dodaje się 90 gram zmielonego żołądka świńskiego, 50 gram roztartej w mózdzierzu trzustki wieprzowej, 10 gram śluzówki z jelita cienkiego świni, 25 mililitrów chloroformu i 25 mililitrów toluenu.

Po dodaniu i zmieszaniu wszystkich składników i ochłodzonych do temperatury 37—40 stopni Celsjusza elementów upostaciowanych krwi z wodą, całość wstawia się do termostatu o temperaturze 37 stopni Celsjusza na 72 godziny, codziennie kilka razy lekko mieszając, jak również sprawdzając pH i w razie konieczności doprowadzając do pH=8,0—8,2 10 procentowym ługiem sodowym.

Po około 72 godzinach trzymania w termostacie, hydrolizat zakwasza się 10 procentowym kwasem solnym do pH=4,5. Następnie zakwaszony hydrolizat doprowadza się do wrzenia gotując 15—30 minut. Po zagotowaniu hydrolizat chłodzi się do temperatury około 60 stopni Celsjusza i przesącza przez watę. Po prze-filtrowaniu pozostawia się hydrolizat w chłodnym miejscu na 24 godziny. Po tym czasie uzupełnia się ubytek hydrolizatu wodą do pierwszej objętości, doprowadza się pH hydrolizatu do 7,6 i przesącza przez bibułę. Następnie rozlewa się hydrolizat do jałowych naczyń, szczelnie zamyka korkami lub kapslami gumowymi i sterylizuje w autoklawie w temperaturze 120 stopni Celsjusza przez 30 minut. Po sterylizacji hydrolizat wstawia się możliwie chłodnym miejscu

do leżakowania na okres sześciu tygodni. Przed użyciem hydrolizat przesącza się i rozcieńcza się wodą w zależności od potrzeb.

Badania kontrolne hydrolizatu wykazały zawartość następujących ilości azotu aminowego w procentach objętościowych i azotu białkowego w przeliczeniu na wagę 1 mililitra:

azot aminowy w procentach objętościowych — 0,042
azot białkowy procent w przeliczeniu na wagę 1 mililitra — 0,283

Jak z powyższych przykładów i wyników widać do szczególnych zalet podłoża otrzymanego sposobem według wynalazku należy ekonomiczny dobór składników, możliwość wielokrotnego rozcieńczania wodą i długotrwała przydatność preparatu bez za-

bezpieczenia specjalnych warunków leżakowania, co było założeniem badań nad rozwiązaniem według wynalazku.

Zastrzeżenie patentowe

5 Sposób otrzymywania podłoża do hodowli bakterii na drodze hydrolizy enzymatycznej produktów białkowych, **znamienny tym**, że do elementów upostaciowanych krwi dodaje się zmielony żołądek
10 wieprzowy w ilości 15—25 procent, roztartą trzustkę wieprzową w ilości 8—12 procent, śluzówkę jelita cienkiego w ilości 2—4 procent w stosunku do wagi elementów upostaciowanych krwi i przeprowadza hydrolizę w temperaturze 37°—41°C, w
15 środowisku o pH=8,0—8,2, w czasie 72—96 godzin.