



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

251210

(11) B<sub>1</sub>

(61)

(23) Výstavní priorita

(22) Přihlášeno 12 03 82

(21) PV 1728-82

(89) WP 159844, DD

(32)(31)(33) 19 05 81 (WP C 12 K/230 054) DD

(51) Int. Cl.<sup>v</sup>

C 12 N 1/00

(40) Zveřejněno 16 01 85

(45) Vydáno 25.04.88

(75)

Autor vynálezu

REISSERODT ROLF dr.,

RISCHE HELMUT prof. dr., WERNIGERODE,

WITTE WOLFGANG dr., ELEND,

ZIESCHE KURT MUDr., WERNIGERODE,

DÜNNHAUPT KLAUS dipl. biol., WERNIGERODE (DD)

(54)

Bakteriologická živná půda s bílkovinným hydrolyzátem  
kyselinou sírovou

Bakteriologické živné půdy s kyselino-sírovými hydrolyzáty bílkovin se používají k pěstování bakterií, pro obecnou i speciální bakteriologickou diagnostiku, pro biochemické úkoly a pro výzkum v bakteriologické genetice. Cílem řešení jsou bakteriologické živné půdy se sníženým obsahem balastových látek a vysokomolekulárních proteinů, které při ekonomicky výhodných podmínkách umožňují plně pokrýt potřebu živných látek a lépe kontrolovat efektivnost výměny látek. Díky využívání kyselino-sírových hydrolyzátů bílkoviny z kaseinu nebo podobných bílkovinných produktů čistého produktu, nebo v kombinaci s glukózou, vitamíny a mikroelementy, nebo s peptony, extraktem droždí nebo masným extraktem, nebo kombinací těchto živných látek lze snadno snížit obsah balastových látek v hotové živné půdě. Živné půdy lze přímo nebo jako dílčí složku používat ve známých selektivních živných půdách, živných půdách pro speciální epidemiologické laboratorní metody nebo pro vědecké výzkumy. Tyto živné půdy jsou vhodné pro řešení biotechnologických problémů jako například, výroba vakcín nebo antibiotik.

## Бактериологические питательные среды с сернокислыми гидролизатами белка

### а/ Область применения изобретения

Бактериологические питательные среды с сернокислыми гидролизатами белка используются для выращивания бактерий, для общей и специальной бактериологической диагностики, для биохимических задач, как например, изолирование продуктов обмена веществ, и для исследований в бактериологической генетике.

### б/ Характеристика известных технических растворов

Используемые до сих пор питательные среды для выращивания бактерий, для бактериологической диагностики и для изолирования бактериальных токсинов и антигенов содержат в основном высокомолекулярные протеины, как например, энзиматически расщепленные белки /пептоны/, полученные путем автолиза дрожжей экстракты или мясные экстракты или мясные бульоны в качестве основных питательных веществ. Доля низкомолекулярных питательных веществ, таких как аминокислоты, в таких продуктах является относительно низкой, так что для быстрого и хорошего роста бактерий необходимо соответствующее использование высокого количества всех питательных веществ. Известно, что высокомолекулярные протеины и балластные вещества, как они присутствуют в пептонах, могут оказывать токсическое влияние на бактерии, с другой стороны, такое большое количество балластных веществ воздействует ингибирующим образом на рост бактерий. Изолирование бактериальных токсинов и антигенов испытывает отрицательное воздействие, например, за счет высокой доли балластных веществ и доли высокомолекулярных протеинов. Бактериологические питательные среды для названных областей использования изготавливаются также путем добавления отдельных аминокислот, однако для большинства областей применения они в этой форме слишком дороги. Используемые до сих пор для аналогичных целей, полученные путем солянокислого гидролиза гидролизаты белка содержат вследствие их изготовления большие количества NaCl, что воздействует на содержание числа ионов готовых питательных сред, а также обуславливает более высокое содержание остаточных пептидов, чем при сернокислом гидролизе /гидролиз под давлением/ полученных гидролизатов.

с/ Цели изобретения

Основой изобретения является задача, использовать полученные путем сернокислого гидролиза казеина или других натуральных продуктов белка гидролизаты белка или в чистом виде или как добавку к пептону, экстракту дрожжей или мясному бульону как питательные среды или подходящие комбинации пептона с экстрактом дрожжей или аналогичные питательные среды или в комбинации с выраженными поставщиками энергии, такими как глюкоза. Тем самым использование этих продуктов, содержащих высокомолекулярные балластные вещества может быть значительно снижено и качество питательных сред для названных областей использования может быть улучшено.

д/ Изложение сути изобретения

Было установлено, что эта цель может быть достигнута, если гидролизаты белка, полученные с помощью сернокислого гидролиза казеина или других естественных продуктов белка использовать или для избранных примеров применения или как добавки к питательным средам, изготовленным в основном с высокомолекулярными питательными веществами. При этом возникают такие питательные среды, которые со значительно пониженной долей питательных веществ дают для бактерий показатели роста такие же или более лучшие, чем до сих пор используемые питательные среды. С редуцированием количества балластных веществ в этих питательных средах процессы обмена веществ могут быть лучше регулированы, бактериальные продукты обмена веществ могут быть легче изолированы. Такие питательные среды мы получаем из комбинации сернокислых гидролизатов белка с глюкозой или аналогично используемыми гидратами угля, витаминами и микроэлементами, с пептоном, экстрактом дрожжей, мясным экстрактом и т.п. Примеры выполнения 1-3 показывают некоторые такие основные питательные среды, таблица 1 факторы роста для отдельных видов бактерий по сравнению с используемыми до сих пор пептонными питательными средами. На основе этих новых основных питательных сред можно составить большинство питательных сред для бактериологической диагностики (напр. селективные питательные среды, питательные среды для "пестрого ряда", питательные среды для лизотопии), для биохимических исследований и для бактериальной генетики. Пример выполнения 4 дает состав селективной питательной среды, которая на основе ее лишь очень слабых селективных свойств и многообразных диагностических возможностей очень хорошо пригодна для первоначальной диагностики инфекционных возбудителей из мяса, пищевых продуктов и других материалов исследования. Пример выполнения 5 дает состав питательной среды, предназначенной для лизотопии *Staphylococcus aureus*. На этой питательной среде можно с большой точностью определить лизис фагов и тем самым лизотип.

Пример выполнения 6 показывает питательную среду для доказательства и для получения гемолизина из *E. coli*, которая может быть стандартизирована по отношению к используемым до сих пор мясным питательным бульонам. В примере выполнения 7 приведена питательная среда, пригодная для производства лизостафина из РНК штамма *Staphylococcus aureus*.

Приведенные здесь примеры могут быть расширены по смыслу. Основные питательные среды 1-3, а также комбинации с глюкозой, витаминами и микроэлементами могут быть, как в системе строительных элементов, введены в виде питательных веществ в питательные среды для различнейших областей применения (напр. также для производства вакцины, производства антибиотиков).

Пример исполнения 1

Основная питательная среда

	г/л
Пептон <sup>1)</sup>	3,0
Сернокислый гидролизат белка	4,0
Экстракт дрожжей <sup>2)</sup>	0,5-1,0
NaCl	5,0
Aqua dest.	1000 мл

<sup>1)</sup> Пептон казеина панкреатический, смешанный пептон (мясной, рыбный и желатиновый пептон), кровяной пептон и подобные.

<sup>2)</sup> Экстракт дрожжей "Брамш" (ГДР), экстракт дрожжей из кормовых дрожжей (советский препарат), автолизат дрожжей ФЕБ Имфштофферк Дессау, ГДР

Пример исполнения 2

Гидролизат белка-экстракт дрожжей-основная питательная среда

	г/л
Сернокислый гидролизат белка	4,0
Экстракт дрожжей "Брамш"	1,5
NaCl	5,0
Aqua dest.	1000 мл

Пример исполнения 3

Гидролизат белка-экстракт дрожжей-основная питательная среда

	г/л
Сернокислый гидролизат белка	4,0
Экстракт дрожжей "Брамш"	1,0
Мясной экстракт <sup>3)</sup> "хемекс" (Мюнхен, ФРГ)	1,0
NaCl	5,0
Aqua dest.	1000 мл

<sup>3)</sup> Может быть использован также мясной экстракт по Либигу или мясной бульон (говяжий, лошадиный) как растворитель вместо Aqua dest.

Пример исполнения 5

Питательная среда для лизотипии стафилококков

	г/л
Пептон из казеина, панкреатический	4,0
Сернокислый гидролизат белка	6,0
Экстракт дрожжей "Брамш"	2,0
NaCl	5,0
Агар-агар	15,0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> р.а.	0,32
L-триптофан	0,064
Aqua dest.	1000 мл

Пример исполнения 4

Среда из кризоидина поджелудочной железы и глицерина (GCG)

GCG-основание

Питательный агар 11 (СИФИН) (содержит 10 г пептона панкреатического, 10 г агара для культуральных сред, 5 г NaCl)	25 г
Экстракт дрожжей (Брамш)	5 г
серноокислый гидролизат белка (ФЕБ. Берлин-Хеми)	2 г
Аммонийный цитрат железа-III	2 г
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O р.а.	3 г
Кризоидин	40 мг
Говяжья поджелудочная железа (сушеная)	8 г
Aqua dest.	1 л

Растворить и стерилизовать

2 часа на водяной бане, pH 7,3-7,5  
к нему 29 мл GCG раствора

GCG-раствор

Глицерин 2. АВ ГДР	1 л
Этанол	0,4 л
Бромтимоловый синий	11,0 г
Мочевина р.а.	50,0 г

Пример исполнения 6

Питательная среда для доказательства и для получения гемолизина из E. coli

	г/л
Серноокислый гидролизат белка	20,0
NaCl	5,0
Глюкоза 2. АВ ГДР	2,0
Мясной экстракт "хемекс" <sup>3)</sup>	20,0
Агар-агар	15,0
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O р.а.	0,29
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O р.а.	0,014
Аммонийный цитрат железа-III	0,004
Витамин В <sub>1</sub>	0,002
В <sub>6</sub>	0,002
Амид никотиновой кислоты	0,002
Aqua. dest.	1000 мл

<sup>3)</sup> См. сноску к примеру исполнения 3

Пример исполнения 7

Питательная среда для производства лизотафина из тарп. ацгец РНК

	г/л
Питательный бульон 1 (СЕВАК, ЧССР) с 5,0 г пептона и 3,0 г мясного экстракта/л	8,0
Сернокислый гидролизат белка	2,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O р.а.	5,0
NaCl	1,0
Aqua dest.	1000 мл

Заявка на патент

Бактериологические питательные среды с сернокислым гидролизатом белка отличаются тем, что полученные с помощью сернокислого гидролиза казеина или других естественных продуктов белка гидролизаты белка самостоятельно или в комбинации с другими дающими энергию питательными веществами, такими как пептоны, экстракты дрожжей, мясные экстракты, глюкоза и подобные используют как питательные вещества, к полученным таким образом новым основным питательным средам добавляют необходимые для роста специализированных бактерий пригодные факторы роста такие, как например, гемин, витамины, лецитин и подобные, используют в соотношении к общепринятым до сих пор пептонным питательным средам более бедные балластными веществами питательные среды с помощью подходящего подбора соотношения ионов и условий выращивания культуры для оптимальных процессов обмена веществ, как например, способность образования токсина или избранные задачи в бактериальной генетике, а также надстраивая на таких основных средах изготавливают с помощью пригодных селективных добавок, субстратов и индикаторов питательные среды для бактериологической диагностики или специальных эпидемиологических лабораторных методов и получают питательные среды для производства вакцины и производства антибиотиков.

Таблица 1: Факторы роста<sup>1)</sup> избранных бактериальных штаммов при росте в питательных средах по примеру исполнения 1, 2 и 3 в соотношении к росту в питательной среде, содержащей 20 г/л панкреатического пептона спустя 4 часа и 8 часов

Бактериальный штамм	Пример исполнения 1		Пример исполнения 2		Пример исполнения 3	
	4 часа	8 часов	4 часа	8 часов	4 часа	8 часов
<i>E. coli</i> 54127	1,05	1,14	1,15	1,11	1,24	1,16
<i>K. coli</i> 350033	1,16	1,14	1,20	1,21	1,12	1,09
<i>Pseudomonas</i> EIsworth	1,17	1,08	1,21	1,01	1,27	1,07
<i>Staph. aureus</i> 78/71	1,16	1,22	1,50	1,13	1,58	1,08

Продолжение табл. 1

Бактериальный штамм	Пример исполнения 1		Пример исполнения 2		Пример исполнения 3	
	4 часа	8 часов	4 часа	8 часов	4 часа	8 часов
Staph. aureus 1413	1,20	1,26	1,20	1,13	1,33	1,27

1) Фактор роста =  $\frac{\text{Рост в контрольной питательной среде}}{\text{Рост в питательной среде с 20 г/л панкреатического пептона}}$

измеряются значения экстинкции встряхиваемых культур до  $37^{\circ}\text{C}$

#### Аннотация

Бактериологические питательные среды с сернокислыми гидролизатами белка. Бактериологические питательные среды с сернокислыми гидролизатами белка используются для выращивания бактерий, для общей и специальной бактериологической диагностики, для биохимических задач и для исследований в бактериологической генетике.

Целью изобретения и решаемой им задачей являются бактериологические питательные среды с пониженным содержанием балластных веществ и высокомолекулярных протеинов, которые при экономически выгодных условиях позволяют полностью покрыть потребление питательных веществ бактериями и лучше контролировать эффективность обмена веществ.

Благодаря использованию сернокислых гидролизатов белка из казеина или подобных белковых продуктов в чистом виде или в комбинации с глюкозой, витаминами и микроэлементами, или с пептонами, экстрактом дрожжей или мясным экстрактом, или комбинацией этих питательных веществ можно значительно снизить содержание балластных веществ в готовой питательной среде. Полученные таким путем основные питательные среды можно непосредственно или в качестве составной части использовать в известных селективных питательных средах, питательных средах для специальных эпидемиологических лабораторных методов или для научных исследований. Исходя из этого, такие питательные среды пригодны для решения биотехнологических проблем, таких как, например, производство вакцины или антибиотиков.

Признано изобретением по результатам экспертизы, осуществленной Ведомством по делам изобретений и патентов ГДР.

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Bakteriologická živná půda s bílkovinným hydrolyzátem kyseliny sírovou, vyznačující se tím, že bílkovinné hydrolyzáty získané hydrolýzou kaseinu nebo jiných přírodních bílkovinných produktů kyselinou sírovou se samostatně nebo v kombinaci s jinými energi poskytujícími živnými látkami, jako jsou peptony, kvasničný extrakt, masový extrakt, glukóza a podobně, používají jako živné látky, k takovému způsobem získaným novým základním živným půdám se přidávají vhodné faktory růstu potřebné pro růst specializovaných bakterií, jako je například hemin, vitaminy, lecitin a podobně, přičemž se využívají ve srovnání s dosud běžnými živnými půdami živné půdy s podstatně horšími balastními látkami pomocí vhodné volby poměru iontů a podmínek pěstování kultur pro optimální proces látkové výměny, jako je například schopnost vytvářet toxiny nebo pro vybrané úkoly v bakteriální genetice a také se s pomocí takových základních půd vyrábí za použití vhodných selektivních přísad, substrátů a indikátorů živné půdy pro bakteriologickou diagnostiku nebo speciální epidemiologické laboratorní metody a získávají se živné půdy pro výrobu vakcín a antibiotik.

Užgorodský výrobně-polygrafický podnik, Proektnaja 4, Užgorod  
№1824, Cena 2,40 Kčs