



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 112872

(13) C2

(51) МПК

C12N 1/16 (2006.01)

C12Q 1/08 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 01648	(72) Винахідник(и):	Льогтенбьоргер Хайнц-Юрген (DE), Фібіг Кай (DE)
(22) Дата подання заявки:	01.08.2012	(73) Власник(и):	ДЬОЛЕР ГМБХ, Riedstrasse 7-9, 64295 Darmstadt, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.11.2016	(74) Представник:	Маслова Тетяна Михайлівна, реєстр. №61
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	11176196.1	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	DE 9319470 U1, 24.03.1994 KELLERMANN. Instructions for use: GELRITE / INTERNET CITATION. - 31 August 2006 . - P. 1-12, Retrieved from the Internet: URL:http ://www.carlroth.de/medi a/_de-de/us age/0039.pdf [retrieved on 2012-01-04] TAKANARI SAKAI ET AL. The Influences of Growth Regulators and Culture Medium Composition on Shoot-Tip Cultures of Edible Canna / ENVIRONMENT CONTROL IN BIOLOGY. - 1 January 2007. - vol. 45, № 3. - P. 155-163 US 2009176268 A1, 09.07.2009 EP 1357179 A1, 29.10.2003 US 4326052 A, 20.04.1982 B. HADELER ET AL. Gelrite and Agar Differently Influence Cytokinin-Sensitivity of a Moss / JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY. - 1 June 1995. - vol. 146, № 3. - P. 369-371
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	01.08.2011		
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.04.2014, Бюл.№ 8		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.11.2016, Бюл.№ 21		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2012/065049, 01.08.2012		

(54) РІДКЕ ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ

(57) Реферат:

Винахід стосується рідкого поживного середовища, яке містить від 10 до 20 вагових частин дріжджового екстракту, від 15 до 30 вагових частин пептону, від 35 до 75 вагових частин моносахаридів і дисахаридів, до 3 вагових частин мінеральних речовин, від 0, 02 до 1 вагової частини геланової камеді і воду, при цьому поживне середовище заздалегідь автоклавують або піддають надвисокій температурній обробці.

UA 112872 C2

Винахід відноситься до поживного середовища та його застосування. Під час виготовлення великої кількості товарів, в основному, товарів народного споживання, необхідність в яких відчувається кожного дня, наприклад, продуктів харчування, зокрема, безалкогольних напоїв або пива, існує гостра необхідність у забезпеченні гарантій того, що вони не містять метаболізуючих живих організмів, наприклад, таких як дріжджі, цвілі, бактерії молочної чи оцтової кислоти, або того, що рівень їхньої присутності в них нижче максимального рівня, що визначається як допустимий щодо відповідних продуктів. Застосовувані для цієї мети мікробіологічні системи виявлення давно відомі з рівня техніки.

Типові поживні середовища, використовувані для аналітичних цілей, включають желатинізовані тверді поживні середовища на основі, наприклад, агару, на яких мікроорганізми можуть вирости у вигляді колоній.

З рівня техніки відомий широко поширений спосіб, заснований на корисній моделі Німеччини № 93 19 470,6, в якому описане поживне середовище, що приготовано користувачем з окремих сухих компонентів або відповідної порошкової передсуміші, доведеної до показника рН, наприклад, від 4,3 до 4,4 з подальшою пастеризацією. У процесі приготування досліджуваного продукту, що підлягає розгляду, з виробничого процесу беруть зразки і змішують їх з живильним середовищем. Згодом виростання мікроорганізмів, якщо воно присутнє у зразку, може піддаватися моніторингу протягом періоду часу від приблизно 1 до 2 днів в світловому коробі при температурі близько 28° С. Якщо зразок каламутніє, значить, він обтяжений мікроорганізмами. Водночас, показник ступеня помутніння забезпечує індикацію ступеня завантаження зразка мікроорганізмами.

Недоліком відомого способу є те, що користувач повинен підготувати поживне середовище, що займає відносно багато часу і є трудомістким. Це передбачає, що користувач повинен мати досвід роботи з мікробіологічними поживними середовищами, а також те, що лабораторія має бути, відповідно, обладнана магнітними мішалками, колбами Ерленмейера, пристроями для вимірювання показників рН з температурною компенсацією, прецизійними вагами, пристроями для пастеризації та інше.

Коли режимів не дотримано, або у наявності забруднень, що з'являються в процесі приготування продукту, виникає загроза одержання відповідного поживного середовища більш низької якості, що може призвести до проблем із застосуванням, наприклад, до отримання помилкових позитивних результатів.

Технічною задачею на вирішення якої спрямовано даний винахід, є подолання, принаймні, деяких недоліків з попереднього рівня техніки. Вказана задача вирішується створенням рідкого поживного середовища, що містить:

- від 10 до 20 вагових частин дріжджового екстракту;
- від 15 до 30 вагових частин пептону;
- від 35 до 75 вагових частин моно- і дисахаридів;
- до 3 вагових частин мінералів;
- від 0,02 до 1 вагової частини стабільного желеутворювача і
- воду.

Воду, переважно, застосовують у кількості від 100 до 2000, більш переважно, від 1000 до 2000, вагових частин. Переважно, концентрація стабільного желеутворювача становить $\leq 0,5\%$ за вагою, більш переважно, $\leq 0,1\%$ за вагою, ще більш переважно, $\leq 0,05\%$ за вагою.

На відміну від поживних середовищ з попереднього рівня техніки, продукт може бути отриманий вже виробником, і поставлений замовнику в готовому до вживання вигляді.

Несподівано виявилось, що продукт із складом згідно винаходу є стабільним протягом понад шести місяців при зберіганні при кімнатній температурі, якщо він був автоклавованим або, як альтернатива, підданий обробці при надвисокій температурі.

У звичайному порядку, поживне середовище, відповідно до винаходу, містить поживні речовини для мікроорганізмів із домішкою дріжджового екстракту, пептону, моно-і дисахаридів і мінералів.

Згідно з винаходом, поживне середовище містить один або більше стабільних желеутворювачів, які включені в кількості, що забезпечує текучу консистенцію поживного середовища. Желеутворювач має бути стабільним настільки, щоб продукт був стійким до автоклавовання, тобто до нагрівання при температурі 121 °С з часом витримки, принаймні, 5 хвилин, або до обробки при стандартній промисловій надвисокій температурі (при пастеризації).

Звичайні текучі поживні середовища містять, наприклад, карраганан. Проте, за існуючих умов, карраганан не здатний витримати автоклавовання і, отже, не є стабільним желеутворювачем у контексті описаного винаходу. Переважно, як желеутворювача, застосовують геланову камедь, але також можуть бути застосовані інші природні,

напівсинтетичні або синтетичні полімерні речовини з желеутворюючими властивостями, аналогічними тим, які притаманні гелановій камеді.

Вираз «... желеутворюючі властивості, аналогічні тим, якими володіє геланова камедь, ...» означає, що дані речовини здатні досягати стабілізації і фіксації частин, описаних в розчині, не спричиняючи значного підвищення в'язкості. Зокрема, стабільним желеутворювачем є такий желеутворювач, що при застосуванні в зазначеній кількості і після автоклавування з витримкою 5 хв. при 121 °С, все ще утворює систему, в'язкість якої вища, ніж в'язкість в тій же системі без додавання желеутворювача, але менша 100 мПа·с при 20 °С.

Переважно, в'язкість системи становить, принаймні, 2 мПа·с. Доступною на комерційному ринку є геланова камедь, наприклад, від Merck and Co., США з позначенням Gelrite. Відповідно до попереднього рівня техніки, геланова камедь застосовується у присутності двовалентних іонів, утворюючи тверді гелі. На противагу цьому, поживні середовища, згідно з винаходом, є рідкими.

Нестабільні желеутворювачі, такі як каррагінан, змінюються під час обробки в автоклаві таким чином, що втрачають свої желеутворюючі властивості. Хоча, при необхідності, вони і можуть бути пастеризованими, цього недостатньо для довгострокового зберігання відповідних поживних середовищ, отже, це означає, що поживні середовища згодом мають бути застосовані тільки після короткострокового зберігання.

У зазначеному кількісному діапазоні отримують рідини, які, переважно, мають в'язкість < 100, більш переважно < 10, мПа·с при 20 °С. На відміну від звичайних поживних середовищ, які є або щільними, або нагадують бульйон і не забезпечують ані фіксації, ані сукупного утримання колонії мікроорганізму, поживні середовища за винаходом є текучими і забезпечують фіксацію (не седиментацію) і утримання разом ростучої колонії (яка, при фіксації (не седиментації) і утримання разом ростучої колонії (яка, при цьому легко розпізнається людським оком). Поживні речовини можуть вільно дифундувати без перешкод з боку матриці.

Завдяки композиції за винаходом, поживні середовища можуть зберігатися протягом тривалого періоду часу після автоклавування або, як альтернатива, після надвисокої температурної обробки. При зберіганні при температурі від 4 до 8° С в закритій посудині в темряві, що є більш переважним, властивості продукту не зміняться протягом дванадцяти місяців.

Звичайно, можна доставляти поживне середовище користувачеві в дозованій пляшці. Зокрема, переважним є те, що поживне середовище має бути упаковане порціями, наприклад, у посудинах з прозорими стінками, які можуть герметично закриватися. Особливо придатними для цього являються, наприклад, посудини з гвинтовими кришками... Єдине, що залишається зробити користувачеві, це відкрити посудину, відкрутивши гвинтову кришку, додати зразок, і знову закрити посудину гвинтовою кришкою.

З метою застосування, поживне середовище змішують із зразком і зберігають в інкубаторі (термостаті), наприклад, при температурі від 25 до 37 °С. Мікроорганізми мають можливість рости у живильному середовищі, на що вказує каламутність середовища, яка, як мінімум, є локально обмеженою. Ступінь каламутності може одночасно являтися мірою зародкового завантаження зразка. Таким чином, велика кількість зразків можуть бути просто розділені "з першого погляду" на завантажені і не завантажені зразки.

Застосування поживного середовища підходить, перш за все, для тих областей, де перевірка мікробіологічного стану продуктів, які споживаються живими істотами або наносяться на них у всіх мисливих лікарських формах, вважається важливим, наприклад, в області виробництва напоїв і харчових продуктів, виробництва кормів, у косметичній або фармацевтичній промисловості. Крім того, поживне середовище у формі, пристосованій для застосування за принципом від випадку до випадку, підходить для області клінічної діагностики...

В принципі, вказані мікроорганізми можуть бути отримані з живильних середовищ просто за допомогою піпетки, і додатково охарактеризовані, наприклад, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або аналогічних методів.

Далі винахід ілюструється наступними не обмежувальними прикладами здійснення:

Порівняльний приклад 1

Поживне середовище готували з наступних інгредієнтів у сухій речовині.

70 % моно-і дисахаридів

2 % мінеральних речовин

14 % дріжджового екстракту

15,1 % пептону

60 0,9 % каррагінану.

П'ять частин зазначеної сухої речовини змішували з 95 частинами води, а після доведення показника рН до 4,3 та пастеризації при 80 °С протягом 5 хвилин отримане середовище для виявлення різних груп мікроорганізмів змішували з сильно розведеною суспензією дріжджів.

Інкубування посудини з гвинтовою кришкою при 25 °С забезпечує результат, який інтерпретується неозброєним оком після закінчення терміну від 1 до 3 днів, а саме зростання колоній клітин дріжджів, які можна розпізнати через наявність дискретних точкових осередків помутніння, що вільно плавають в середовищі виявлення різних груп мікроорганізмів.

Порівняльний приклад 2

Був застосований спосіб, подібний зазначеному в порівняльному прикладі 1, за винятком того, що готове до застосування поживне середовище не піддавали пастеризації, але воно було автоклавоване при температурі 121 °С протягом 5 хвилин.

Після інокуляції з клітинами дріжджів, формування осаду, спричинене мікроорганізмами, відбувається після закінчення терміну від 1 до 3 днів. Проста і переконлива інтерпретація мікробіологічного результату в цьому випадку неможлива без маніпулювання посудиною з гвинтовою кришкою.

Приклад 1

Поживне середовище, відмінне від того, яке застосовувалося в порівняльних прикладах 1 і 2 по відношенню до задіяного желеутворювача, готували з наступних інгредієнтів в сухій речовині:

- 70 % моно-і дисахаридів
- 2 % мінеральних речовин
- 14 % дріжджового екстракту
- 15,1 % пептону
- 0,9 % геланової камеді.

П'ять частин зазначеної сухої речовини змішували з 95 частинами води, а після доведення показника рН до 4,3 та автоклавовання при 121 °С протягом 5 хвилин отримане середовище для виявлення різних груп мікроорганізмів змішували з сильно розведеною суспензією дріжджів.

Інкубування посудини з гвинтовою кришкою при 25 °С забезпечує результат, який інтерпретується неозброєним оком після закінчення терміну від 1 до 2 днів, а саме зростання колоній клітин дріжджів, які можна впізнати через наявність дискретних точкових осередків помутніння, що вільно плавають в середовищі виявлення різних груп мікроорганізмів.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Рідке поживне середовище, що містить від 10 до 20 вагових частин дріжджового екстракту; від 15 до 30 вагових частин пептону; від 35 до 75 вагових частин моно- і дисахаридів; до 3 вагових частин мінералів;
- від 0,02 до 1 вагової частини стабільного желеутворювача, який є настільки стабільним, що продукт є стійким до автоклавовання або стандартної надвисокої температурної обробки, і воду, при цьому поживне середовище заздалегідь автоклавують або піддають надвисокій температурній обробці.
2. Поживне середовище за п. 1, яке **відрізняється** тим, що моно- і дисахариди вибрані з мальтози, сахарози, глюкози і фруктози.
3. Поживне середовище за п. 1 або п. 2, яке **відрізняється** тим, що додатково містить від 1 до 10 частин молочної кислоти або її солей (лактатів) в еквівалентних молярних кількостях.
4. Поживне середовище за будь-яким з пп. 1-3, у якому гель вказаного поживного середовища зберігають при температурі від 4 до 8 °С протягом принаймні 365 днів.
5. Поживне середовище за будь-яким з пп. 1-4, яке **відрізняється** тим, що стабільним желеутворювачем є геланова камедь.
6. Поживне середовище за будь-яким з пп. 1-5, яке **відрізняється** тим, що в'язкість при 20 °С складає від 2 до 100 мПа·с.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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

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