

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **240128**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430991**

(22) Data zgłoszenia: **29.08.2019**

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

(54)

Sposób sterylizacji pożywki bakteryjnej

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

08.03.2021 BUP 05/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

21.02.2022 WUP 08/22

(73) Uprawniony z patentu:

**POLWET-CENTROWET
SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Łask, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**EWA MACIERZYŃSKA-PIOTROWSKA,
Janówka, PL
BARTŁOMIEJ WASILEWSKI, Łódź, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Kamiński

PL 240128 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób sterylizacji pożywki bakteriowej, w szczególności pożywki do hodowli bakterii z rodzaju LAB (ang. Lactic acid bacteria – bakterii fermentacji mlekowej).

Stale rosnące zainteresowanie żywnością prozdrowotną, w tym produktami spożywczymi zawierającymi bakterie probiotyczne jest powodem, dla którego prowadzone są badania mające na celu wyselekcjonowanie szczepów bakterii użytecznych w procesach technologicznych w przemyśle spożywczym. Do probiotycznych szczepów bakteryjnych zaliczyć można bakterie z grupy LAB, które są szeroko wykorzystywane w przemyśle spożywczym do produkcji i przetwórstwa produktów mlekopochodnych, jak również do fermentacji produktów pochodzenia roślinnego. Probiotyczne szczepy bakterii fermentacji mlekowej, do których należą m.in. bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, zdolne są do przeprowadzania fermentacji sacharydów, w wyniku której powstają bardzo pożądane w przemyśle spożywczym związki takie jak: kwas mlekowy, kwas octowy, witaminy z grupy B, NKT o między innymi właściwościach konserwujących czy antyrodnikowych.

W wyniku prac mających na celu otrzymanie medium do hodowli bakterii z grupy LAB, alternatywnego wobec standardowo stosowanego medium MRS, twórcy niniejszego wynalazku opracowali pożywkę bakteriyną będącą roztworem wodnym zawierającym w swym składzie 2% (wag./obj.) proszku serwatkowego, 5% (wag./obj.) mleka odtłuszczonego i 1,2% (wag./obj.) ekstraktu drożdży. W celu jednorazowej sterylizacji 1,5 litrowej objętości przedmiotowej pożywki, twórcy z powodzeniem stosowali standardowe ustawienia autoklawu, tj. 121°C przez okres 15 minut. Próby dokonania jednorazowej sterylizacji tej samej pożywki w objętości 40 litrów (8 butli o objętości 5 litrów każda) w takich samych warunkach jak powyżej, doprowadziły do znacznego obniżenia pH roztworu do wartości w granicach 6,1–6,2 oraz ciemnej barwy roztworu, co wykluczało możliwość jego zastosowania do przygotowania pożywki na bazie serwatki.

W związku z powyższym stwierdzono, iż istnieje uzasadniona potrzeba opracowania sposobu sterylizacji opracowanej przez twórców pożywki do wzrostu bakterii z grupy LAB, który pozwoli na skuteczną, jednorazową, sterylizację objętości 40 litrów przedmiotowej pożywki bez jednoczesnego obniżenia pH roztworu do wartości poniżej 6,2 oraz przyjęcia przez roztwór barwy ciemnej.

Przedmiotem wynalazku jest sposób sterylizacji pożywki bakteriowej na bazie proszku serwatkowego, mleka odtłuszczonego oraz ekstraktu drożdży polegający na przeprowadzeniu procesu sterylizacji w autoklawie, w temp 110°C przez okres 10 min, przy czym przed sterylizacją ogrzewa się komorę autoklawu do temp 60°C.

Przeprowadzenie sposobu sterylizacji pożywki według wynalazku pozwala na otrzymanie sterylnego roztworu o jasnej barwie i pH zbliżonym do 6,3.

PRZYKŁAD WYKONANIA:

Przykład wykonania 1

W celu weryfikacji efektów sposobu sterylizacji według wynalazku przygotowano 8 butli o objętości 5 litrów każda pożywki będącej roztworem zawierającym 2% proszku serwatkowego (ASM Konarzew), 5% odtłuszczonego mleka w proszku (OSM Czarnków) oraz 1,2% ekstraktu drożdżowego (BTL) rozpuszczonych w wodzie dejonizowanej (przewodnictwo 0,05 μ S) o temperaturze pokojowej. Sposób sterylizacji przeprowadzono w autoklawie SYSTEC VX150 warunkach przedstawionych w tabeli 1 poniżej:

T a b e l a 1. Testowane warunki sterylizacji

Typ próby	Program/ustawienie autoklawu	Temperatura początkowa autoklawu	Temp. Sondy w butelce	Czas nagrzewania	Czas Chłodzenia	Czas sterylizacji	Czas cyklu	pH pożywki po sterylizacji
1	8 – Płyny (121°C, ster. 15 min)	pokojowa	19.9°C	01:12:00	01:13:20	00:15:00	02:45:09	6.17
2	8- płyny (110°C, ster. 10 min)	60°C	21.3°C	01:06:00	01:01:05	00:10:00	02:18:36	6.28

W wyniku sterylizacji przeprowadzonej według warunków dla próby nr 1 otrzymany płyn charakteryzował się pH w granicach 6,1–6,2 oraz ciemną barwą, co wykluczało możliwość użycia go do przygotowania pożywki na bazie serwatki. Po zmodyfikowaniu warunków sterylizacji do parametrów przedstawionych powyżej dla próby nr 2 uzyskano znaczącą poprawę właściwości płynu po sterylizacji. Miał on barwę jasną i pH około 6,3, co dowodzi słuszności zaproponowanej modyfikacji.

P r z y k ł a d wykonania 2

W celu przeprowadzenia weryfikacji skuteczności sterylizacji płynu uzyskanego w procesie sterylizacji według warunków dla próby nr 2, przygotowano z zastosowaniem standardowych, znanych specjalistom w dziedzinie, sposobów, szereg płytek z następującymi podłożami mikrobiologicznymi:

- MRS – podłoże wybiórcze do namnażania, hodowli, izolacji oraz określania liczby bakterii mlekowych, szczególnie z rodzaju *Lactobacillus*, we wszystkich typach materiałów;
- bulion wzbogacony z 2% glukozą – podłoże uniwersalne do hodowli i namnażania mikroorganizmów o podwyższonych wymaganiach pokarmowych w tym testowany na: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 10876;
- Miller-Hinton agar – nieselektywne medium dla bakterii tlenowych;
- RCM – półpłynne medium dla bakterii anaerobowych w tym z rodzaju *Clostridium*;
- VRBG – podłoże z żółcią, czerwienią obojętną, fioletem krystalicznym i glukozą. Podłoże wybiórcze do izolacji i określania liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w produktach żywnościowych;
- E. coli Chromogenie Medium – podłoże chromogenne do wykrywania i różnicowania E. coli i bakterii grupy coli w próbkach wody, żywności i innych z Tergitolem 7, który jest czynnikiem selektywnym hamującym wzrost bakterii Gram-dodatnich i niektórych Gram-ujemnych (*Bio-maxima*)

Płytki testowe przygotowano metodą zalewową i posiewu powierzchniowego pobierając próby z 5 niezależnie przygotowanych cykli sterylizacji pożywki. W żadnym testowanym wariancie, mimo inkubacji trwającej 5 dób nie odnotowano wzrostu kolonii bakteryjnych, co potwierdza skuteczność procesu sterylizacji w zaproponowanych warunkach.

P r z y k ł a d wykonania 3

W celu weryfikacji przydatności pożywki serwatkowej sterylizowanej w ustalonych warunkach w autoklawie SYSTEC VX150 do hodowli szczepu testowego *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, dokonano oznaczenia liczebności komórek bakterii testowych – metoda hodowlana (jtk/cm³) – posiew ilościowy (pożywka MRS agar, posiew zalewowy, inkubacja 30°C, 72 h, warunki mikroaerofilne), wykonano według poniżej zamieszczonej procedury badawczej.

Procedura badawcza – pomiar ilości drobnoustrojów:

Na płytki Petriego naniesiono po 1 cm³ wybranych kolejnych rozcieńczeń płynu z prowadzoną hodowlą bakterii (przygotowano szereg rozcieńczeń hodowli bakteryjnej w zakresie 10⁻¹ – 10⁻¹¹, stosując 0,85% NaCl).

Określone podłoże mikrobiologiczne wylano z agarem, przestudzono do temp. 45°C, a roztwory wymieszano na płytce.

Inkubację prowadzono w określonych warunkach optymalnych dla wzrostu wybranych grup drobnoustrojów

Do odczytu wybrano płytki z 2 kolejnych rozcieńczeń, na których wyrosło od 30 do 300 kolonii. Liczbę drobnoustrojów (L) w 1 cm³ lub 1 g próbki obliczono wg wzoru: $C \times d / (N1 + 0,1N2)$ gdzie C – suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia
N1 – liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia
N2 – liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia
d – wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu (najniższemu) liczonemu rozcieńczeniu

Wyniki:

T a b e l a 2. Liczebność komórek szczepu *Lactobacillus acidophilus* w zależności od czasu prowadzenia hodowli na pożywce serwatkowej przygotowanej w oparciu o wyznaczone warunki sterylizacji.

Czas fermentacji [h]	Liczebność komórek szczepu LAB [jtk/cm ³]		
	40 cm ³	800cm ³	5000cm ³
0	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
15	7,8 x 10 ⁸	8,2 x 10 ⁸	6,5 x 10 ⁸
20	4,2 x 10 ⁹	4,5 x 10 ⁹	3,8 x 10 ⁹
35	2,3 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁹	2,8 x 10 ⁹

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wyznaczone warunki sterylizacji nie wpływają negatywnie na jakość otrzymywanego podłoża hodowlanego. Prowadząc hodowlę w prezentowanych warunkach, we wszystkich objętościach od 40 do 5000 cm³ przygotowanej pożywki uzyskano porównywalną gęstość hodowli, co stanowiło kryterium w ocenie przydatności pożywki serwatkowej sterylizowanej w ustalonych warunkach w autoklawie SYSTEC VX150 do hodowli szczepu testowego *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356:

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób sterylizacji w autoklawie pożywki bakteryjnej, zawierającej proszek serwatkowy, mleko odtłuszczone oraz ekstrakt drożdży, **znamienny tym**, że przed procesem sterylizacji komorę autoklawu nagrzewa się do temp 60°C, a proces sterylizacji przeprowadza się w temp. 110°C przez okres 10 minut.