



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

245 213

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 01 07 83
(21) (PV 4993-83)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 9/58

(40) Zveřejněno 17 09 84
(45) Vydáno 01 07 88

(75)
Autor vynálezu

FABIÁN JOSEF ing. CSc.; DĚDEK MIROSLAV doc. ing. DrSc., PRAHA

(54)

Způsob výroby mikrobiálního syřidla

Vynález řeší způsob výroby mikrobiálního syřidla pro potřeby mlékárenského průmyslu, přičemž podstatou je použití kmene plísně *Rhizomucor* sp. MX CCF 1863 (Mezinár. federace sbírek č. 182), který je uložen ve Sbírce kultur plísni a hub, katedra botaniky nižších rostlin Karlovy university, Praha 2, Benátská 2, a současně způsob izolace enzymu. Vyšší technický účinek spočívá v náhradě nedostatkového klasického syřidla z telecíh žaludků.

Vynález se týká způsobu výroby mikrobiálního syřidla, produkovaného nově izolovaným a popsáným plísňovým kmenem *Rhizomucor* sp. MX (CCF 1863).

Nedostatek přirozených zdrojů klasických syřidel především chymosinového typu (EC 3.4.23.4) vedl k hledání vhodné náhrady mezi proteolytickými enzymy, produkovanými různými mikroorganismy. Až dosud je realizována průmyslová výroba mikrobiálních syřidel nejčastěji pomocí plísní *Rhizomucor miehei* (Cooney a Emerson) Schipper, *Endothia parasitica* a *Rhizomucor pusillus* (Lindt) Schipper.

Nevýhodou syřidla z plísně *Endothia parasitica* je jeho poměrně nízká tepelná stabilita, neboť při pokojové teplotě dochází během 10 hodin ke 40 % ztrátě enzymové aktivity, dále nízké rozmezí stability enzymu v poměru k pH a náročnost na purifikaci vzhledem k simultánně produkovaným toxinům a antibiotikům ve fermentačním médiu. Nevýhodnost použití plísně *Rhizomucor pusillus* k výrobě syřidla spočívá v nízké produkci enzymu za podmínek obvyklé submersní kultivace v míchaném fermentoru nebo v kultivačních baňkách na třepacím stroji. M.A.A. SCHIPPER (Studies in Mycology, No 17, str.61, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Dec. 1978) s odvoláním na další autory uvádí, že výtěžek syřidlového enzymu u *Rhizomucor pusillus* činí nejvýše 4 % výtěžků, dosahovaných při použití plísně *Rhizomucor miehei*.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob podle vynálezu, jehož podstatou je zjištění, že pomocí nově izolovaného a níže popsaného kmene plísně *Rhizomucor* sp. MX č. CCF 1863 se získá velké množství syřidlového enzymu, který má poměrně nízkou nespecifickou proteolytickou a lipolytickou aktivitu vedle vysoké sýřivé (koagulační) aktivity, viz. tab.1., přičemž se postupuje tak, že produkční kmen podle vynálezu se kultivuje na vhodném živném

prostředí a vyprodukovaný enzym se izoluje.

Tab.1 Enzymová aktivita plísňového syřidla podle vynálezu ve srovnání s komerčním preparátem Rennitase NOVO

Produkční kmen	Označení preparátu	Sýřivá (koagulační) aktivita $\times \text{SJ.ml}^{-1}$	Nespecifická proteolytická aktivita $\times \times \text{J.ml}^{-1}$	Lýpolytická aktivita $\times \times \times \text{J.ml}^{-1}$
Rhizomucor sp. MX č.CCF 1863	MX šarže 3	45.714	290	154
Rhizomucor miehei	Rennitase NOVO	58.400	310	286

$\times \text{ SJ.ml}^{-1}$ - Soxhletovy jednotky. Mírou sýřivé (koagulační) aktivity, uvedené v tab. 1 a 3 je množství enzymu, které zkoaguluje 1 ml mléka při teplotě 35 °C za 40 minut.

$$\text{SJ.ml}^{-1} = \frac{M (\text{ml})}{E (\text{mg,pl})} \cdot \frac{2400 (\text{s})}{T (\text{s})} \cdot 1000$$

M = ml mléka ; E = množství enzymu; T = doba počátku koagulace mléka

$\times \times \text{ J.ml}^{-1}$ - 1 azokaseinová jednotka = 1 μg rozštěpeného azokaseinu $\cdot \text{h}^{-1}$ při 37 °C

$\times \times \times \text{ J.ml}^{-1}$ - jednotky relativní k miliekvivalentům rozštěpeného substrátu (tributyrin)

Kmen plísně Rhizomucor sp. MX byl izolován z bramborových hlíz, napadených hnilobou, a uložen ve Sbírce kultur plísní a hub (Mezinár. federace sbírek č.182), katedra botaniky nižších rostlin Karlovy university Praha 2, Benátská 2, pod č. CCF 1863.

Použitý kmen *Rhizomucor* sp. MX CCF 1863 lze charakterizovat takto :

při kultivaci na sladidinovém agaru při teplotě 37 °C vznikají kolonie 1 až 3 mm vysoké, zprvu šedomodré, později hnědošedé až tmavošedé. Rhizoidy slabě vyvinuty, sporangiofory větvené, 5,7 až 9,0 µm silné. Sporangia (45-50 µm) s inkrustovanou stěnou ve zralosti praskající, kolumely opakvejčité, někdy až hruškovitého tvaru (30 až 35 µm), sporangiospory široce oválné, většinou téměř kulovité, 2,9 až 3,9 µm v průměru. Zygospor nebyly spatřeny, stolony 10 až 20 µm silné. Azygospor rovněž nebyly nalezeny. Dobře roste i sporuluje při 30 °C, při 37 °C je růst rychlý. Použitý kmen podle vynálezu se odlišuje od typové kultury *Rhizomucor pusillus* (Lindt) Schipper množstvím tvorby a tepelnou stabilitou syřidlového enzymu, hydrolýzou kaseinu a velikostí sporangií. Další znaky, jako nepřítomnost zygospor, azygospor, růstová nezávislost na thjraminu, šířka stolonů, velikost kolumely, růst na sacharóze, brání zařadit kmen podle vynálezu do skupiny druhu *Rhizomucor miehei* (Cooney et Emerson) Schipper. Souhrn znaků je uveden v tab.č.2.

Způsob podle vynálezu je blíže objasněn v následujících příkladech fermentace a izolace nového mikrobiálního syřidla, aniž se těmito příklady omezuje rozsah ochrany.

Výhody způsobu podle vynálezu spočívají v jednoduchosti provedení, přičemž se získává enzymový preparát neobvyklé čistoty, s dobrým výtěžkem syřidlové (koagulační) aktivity - viz. tab. 3.

Příklad uchovávání produkčního kmene.

Kultura *Rhizomucor* sp. MX (CCF 1863) se uchovává na šikmém sladidinovém agaru nebo ve zkumavkách se sterilními bramborovými klínky, zalitými 2 až 3 ml tekuté Czapek - Doxovy půdy. Kultura se nechá narůst a vysporulovat při 30 až 37 °C, potom se uloží do chladírny o teplotě + 5 °C. Přeočkování se provádí po 3 až 6 měsících.

Tab.2 Morfologické a fyziologické znaky typových kultur
Rhizomucor pusillus a Rhizomucor miehei ve vztahu
k vlastnostem kultury Rhizomucor sp. MX (CCF 1863)

Morfologické a fyziologické znaky	Rhizomucor pusillus (Lindt) Schipper	Rhizomucor miehei (Cooney and Emer- son) Schipper	Rhizomucor sp. MX CCF 1863
Výška kolonie	1 (±2) mm	1 mm	1 ± 3 mm
stolony šířka	do 17 µm	do 9 µm	10 ± 20 µm
rhizoidy	slabě vyvinuty	slabě vyvinuty	slabě vyvinuty
sporangiofory (velikost)	do 11 ± (15) µm	do 7 µm	5,7 ± 9,0 µm
sporangia (průměr)	do 80 ± (100) µm	do 50 (±60) µm	45 ± 50 µm
kolumela	do 45x38 µm zřídka větší	do 28x25 µm zřídka větší	30x35 µm
sporangiospory	3 ± 4 µm	3 ± 4 µm	2,9 ± 3,9 µm
zygospory	-	+	-
thiamin-dependence	-	+	-
+/-hydrolyza kaseinu	-	(+)	+
+/-sacharóza jako C-zdroj	+	-	+
Tvorba syřidlového enzymu za stan- dardní kultivace /KUNITZ-Bennet Units.1 ⁻¹ /USA pat. 1,108.287	× 300	× 10000	11.428
Tepelná stabilita syřidlového enzymu	++/ 15°/65°C 10% aktivita	15°/65°C 50% aktivita	15°/65 °C 53% aktivita

- + H.J. SCHOLLER, E. MÜLLER : Path.Microbiol. 29 (1966) 730-741
M.A.A. SCHIPPER.: Studies in Mycology, No 17, Dec. 1978,
Baarn, str. 53-70
++ G.A. SOMKUTI, F.J. BABEL: J.Bacteriol. 95 (1968) 1407-1414

Tab. 3 Výtěžek a stupeň čistoty mikrobiálního syřidla, izolovaného z kultury Rhizomucor sp.
 LX CCF 1863 pomocí iontové výměny na katexu OSTION - KM

Frakce	Celkový objem ml	Sýřivá (koagulační) aktivita		Bílkoviny (LOWRY)		Specifická aktivita SJ.mg ⁻¹ bílkovin	Faktor purifi- kace F	Výtěžek aktivity %
		SJ.ml ⁻¹	Celkem SJ	mg.ml ⁻¹	Celkem mg			
Filtrát pudy po fermentaci	2400	5217	12520800	18,5	44400	282	1,0	100
Koncentrát syřidlového (koagulačního) enzymu	185	40000	7400000	4,8	888	8333,3	29,5	59,1

Příklad přípravy inokula 1

Příprava inokula pro 1. stupeň submersní fermentace (100 l) se provede tím způsobem, že bramborové kostky, připravené z pečlivě umytých, loupaných brambor, se vpraví do 1 l Erlenmayerových baňek se širokým hrdlem a zvlhčí Czapek-Doxovým médiem. Sterilizace 30 min. při 121 °C v autoklávu. Po sterilizaci se baňky zaočkují suspenzí spór a kultivují 3 až 5 dnů při 30 až 37 °C.

Příklad přípravy inokula 2

Příprava inokula submersní kultivací na rotačním třepacím stroji v 500 ml varných baňkách s obsahem 100 ml živného média, následujícího složení :

sójová mouka	1%
bramborová moučka	1%
ječný šrot	1%
melasové výpalky (60% suš.)	1%
KH_2PO_4	0,5%
CaCO_3	0,5%

K přípravě se použije vodovodní voda asi 50 °C teplá, v níž se rozpustí 0,1% bakteriální amylasy (B.subtilis). Po cca 30 až 45 min. hydrolýze se živná půda rozplní a sterilizuje 30 min při 121 °C v autoklávu. Po zaočkování vychlazených baňek suspenzí spór a kultivací po dobu 108 hodin vzrostl obsah syřidlového enzymu v kultivačním médiu na 3636 SJ.ml⁻¹.

Příklad fermentace v objemu 100 l

Příprava fermentace se provede tak, že do 100 l vodovodní vody, 50 °C teplé, ve fermentoru, se přidá asi 100 g bakteriální amylasy (B.subtilis-BOLAMYLASA - Slov. škrobárne, n.p. Trnava) a za míchání se dodají další živiny :

3 kg	sójová mouka
3 kg	ovesná mouka
1 kg	sladový výtažek o sušině 65 %
0,5 kg	plavený CaCO_3
0,3 kg	KH_2PO_4

Po 60 minutách hydrolýzy se přidá 25 až 50 ml sójového oleje a půda se sterilizuje 1 hodinu při 121 až 123 °C. Po ochlazení fermentoru na 37 až 40 °C se provede zaočkování kulturou MX na bram-

borových kostkách podle výše uvedeného příkladu. Do 6 baněk s dobře narostlou kulturou se nalévá po 500 ml sterilní vody tak, aby se zabránilo prášení spór. Obsah 6 baněk se asepticky promíchá a převede do fermentoru. Po zaočkování se nastaví intenzivní vzdušnění média ($0,05 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) a v případě nutnosti přidává odpěňovací tuk. Fermentační teplota se udržuje při 35°C . Po dosažení maximální produkce enzymu se fermentace ukončí. V 1 litru prokvašeného média z laboratorního fermentoru byl zjištěn obsah syřidlového enzymu v rozmezí hodnot 4700 až $6480 \text{ SJ} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Příklad izolace syřidlového enzymu 1

K izolaci syřidlového (koagulačního) enzymu z fermentačního média se použije vsádkový způsob iontoměnné sorpce na slabý katex OSTION-KM (UNICHEM, n.p. Ústí n.L.) (Amberlit XE 64), 0,315 mesh, připravený v H^+ cyklu. K 2400 ml filtrátu fermentačního média, zbaveného mycelu, se přidá 500 ml vlhkého iontoměniče. Po 30 min. míchání směsi dojde k poklesu pH z hodnoty 5,4 na 3,5 a k ukončení sorpce. Matečný roztok se odfiltruje nebo odstraní dekantací, 1x promyje destilovanou vodou a k sorbentu se naleje 250 ml 0,5 mol roztoku NaCl. Hodnota pH se upraví z 3,0 na 5,5 až 6,0 roztokem 30 % NaOH a směs se 30 min míchá. Katex se oddělí filtrací přes nuč. Vzhledem k tomu, že enzym je stabilní v širokém rozmezí pH (3,0 až 7,0), upraví se eluát pouze přidávkou 0,05 mol CaCl_2 a pH se nastaví pomocí HCl na hodnotu 4,0 - 4,2. Enzymový koncentrát se konzervuje 10 % NaCl a 0,1 až 0,2 % benzoanu sodného. Výsledky znázorňuje tab.č.3.

Příklad izolace syřidlového enzymu 2

Živné médium se po fermentaci plísně zbaví suspenzních podílů s mycelem filtrací nebo odstředěním. Za míchání se pH filtrátu sníží z hodnoty 5,5 na 4,0 pomocí zředěné kyseliny chlorovodíkové. K 2400 ml filtrátu ($5217 \text{ SJ} \cdot \text{ml}^{-1}$) se dále přidají 3 g zesítené polyakrylové kyseliny, např. Carbopol 934 (GOODRICH) a v míchání se pokračuje. Po 30 minutách se vytvořená sraženina odstředí a supernatant dekantuje. Aktivní sediment se resuspen-

duje ve 200 ml destilované vody. Po dokonalé homogenizaci se do roztoku nasype 30 g plaveného CaCO_3 a směs se míchá dalších 30 minut. Vytvořený komplex nerozpustné vápenaté soli kyseliny polyakrylové se odstraní filtrací nebo centrifugací. Čirý, koncentrovaný roztok enzymu se konzervuje přidavkem 10 % kuchyňské soli a 0,25 % Na-benzoanu po snížení hodnoty pH na 4,0 až 4,5 zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Výsledný koncentrát obsahoval 86 % původní sýřivé (koagulační) aktivity.

Enzym je možné z fermentačního média oddělit také použitím sorbentu DEAE-celulosy. V tom případě však se na iontoměnič váže i větší podíl pigmentu, takže výsledný koncentrát obsahuje více nečistot. Rovněž ztráty v důsledku ireverzibilní vazby na DEAE-celulóze jsou vyšší než na sorbentu Ostion KM.

Předmět vynálezu.

245 213

1. Způsob výroby mikrobiálního syřidla, vyznačený tím, že se na živném médiu, obsahujícím jako C - zdroj 0,5 až 6,0 % ~~hmot.~~ cukrů, s výhodou hydrolyzovaného škrobu, 0,2 až 3,1 % ~~hmot.~~ zdroje organických dusíkatých látek, s výhodou sladového výtažku a sójové mouky, kultivuje submerzním nebo povrcho-
vým způsobem při teplotě 25 až 40 °C a pH 4,8 až 7,2 plí-
seň *Rhizomucor* sp. MX CCF 1863, a vyprodukovaný enzym se izoluje.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se syřidlový enzym oddělí z fermentačního média iontoměnnou sorpcí (výlukou) na slabém katexu z iontoměnné pryskyřice vsádkovým způso-
bem nebo sloupcovou chromatografií.