



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

233537

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

A 23 K 1/165
C 12 N 9/56

(22) Přihlášeno 05 04 83
(21) (PV 2356-83)

(40) Zveřejněno 13 08 84

(45) Vydáno 15 08 86

(75)
Autor vynálezu

LAKOTA VLADIMÍR ing. CSc., BASTL VLADIMÍR ing., ADL DRAHOMÍR,
PALEČKOVÁ FRANTIŠKA RNDr., SLUŠOVICE

(54) Způsob výroby krmného biologického preparátu na bázi exoproteáz

Způsob výroby krmného biologického preparátu na bázi exoproteáz, při němž se tekutá živná půda obsahující krmnou mouku, sušené mléko a kvasnice a obohacená zahuštěnou kukuřičnou máčecí vodou a stopovými množstvími solí kovů podporující sporulaci vyšlechtěného mikroorganismu *Bacillus subtilis* CCM 3622 po fermentaci prováděné za teplot 26 až 40 °C a za neustálého míchání a provzdušňování alespoň polovičním minutovým objemem vzduchu vztaženým na objem tekuté živné půdy upravuje přidávkou 0,1 až 0,3 % hmot. krystalického CaCl_2 v biologický krmný preparát, který se po případné úpravě pH na hodnotu $6,8 \pm 0,1$ ve vakuové odperce zahuští 8 až 12krát.

Vynález se týká způsobu výroby krmného biologického preparátu na bázi exoproteáz vyprodukovaných vyšlechtěným organismem *Bacillus subtilis* CCM 3622, kterýžto preparát je používán jako přídatek do krmiva hospodářských zvířat.

Biologickou cestou dosud vyráběné krmné doplňky jsou například stimulatory růstu antibiotického charakteru, jako chlortetracyklin, bacitracin, flavomycin apod. Tyto jsou vyráběny v technické formě usušením pudy po odstranění nebo po sterilizaci produkčního kmene. Jinou skupinou biosyntetických stimulatorů jsou esenciální aminokyseliny umožňující optimální využití všech dusíkatých složek krmiva. Jde např. o L-lyzin, L-treonin.

Jejich zpracování je jednoduché, buď krystalizací z bohatého filtrátu, nebo usušením pudy po tepelné sterilizaci mikroorganismů. Po lepší využití krmiva jsou však připravovány stále častěji enzymatické preparáty, zejména technické proteázy, amylázy a lipázy, případně jejich směsi. Některé z těchto preparátů jsou připravovány známou kultivací kmene *Bacillus subtilis* CCM 3622. Účinek preparátů na bázi tohoto mikroorganismu je založen na obsahu neutrálních a alkalických proteáz, které u zvířat s nedostatečnou účinností vlastních proteáz zvyšují využití podaného krmiva a tím přinášejí vlastně jeho úsporu.

Použitím mikroorganismu *Bacillus subtilis* bylo už dosaženo ve výrobě mikrobiálního syřidla dobrého výtěžku ze aplikace aerobních podmínek v tekuté živné půdě obsahující jako základní zdroje živin krmnou pšeničnou mouku, sušené mléko, sladinu a kvasnice nebo kvasničný extrakt.

Účelem vynálezu je vypracovat s využitím tohoto poznatku způsob výroby krmného mikrobiálního preparátu, který by využil vedlejších produktů ze zpracovávání krmiv či jejich přísad a tím přispěl i ke zhospodárnění masové produkce tohoto druhu krmných preparátů.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že při výrobě tohoto krmného biologického preparátu na bázi směsi exoproteáz vyprodukovaných vyšlechtěným mikroorganismem *Bacillus subtilis* CCM 3622 kultivovaným za aerobních podmínek v živné půdě obsahující jako základní zdroj živin krmnou mouku a sušené mléko pro jejich asimilovatelný dusík a uhlík a sušené kvasnice jako zdroj vitamínů se pevné složky této živné pudy obohatí přídatkem 2 až 4 % hmotnostních zahuštěné kukuřičné máčecí vody o obsahu vlhkosti do 40 %, načež se tato puda doplní deionizovanou vodou nebo pitnou vodou, jakostí odpovídající normě ČSN 830611, v množství na 100 % obj. a mikroorganismus *Bacillus subtilis* CCM 3622 se v této tekuté živné půdě obohacené o stopové přídatky solí kovů podporujících jeho sporulaci kultivuje za teploty 26 až 40 °C, přičemž vzdušnění této živné pudy se provádí alespoň polovičním minutovým objemem vzduchu, vztaženým na objem této tekuté živné pudy, načež po ukončení kultivace se do této živné pudy přidává 0,1 až 0,3 % krystalického CaCl_2 , její kyselost se případně upraví na hodnotu pH 6,8 v rozmezí $\pm 0,1$ a takto vzniklý biologický preparát se za působení podtlaku -85 až -90 kPa 8 až 12krát zahustí.

Výhody a pokrok tohoto řešení lze spatřovat v tom, že při daném složení živné pudy se její obohacení vitamíny a některými stopovými prvky důležitými pro fermentaci provádí zahuštěnou kukuřičnou máčecí vodou, která je produktem zbylým po přípravě kukuřice ke krmným účelům. Tato zahuštěná kukuřičná máčecí voda se podílí na zvýšené produkci biomasy vznikající kultivací použitého mikroorganismu. Deionizovaná voda má svou přednost v tom, že nemůže nepříznivě ovlivňovat složení živné pudy jako pitná voda, která podle místních poměrů často takové látky obsahuje. Proto v případě použití pitné vody v tekuté živné půdě je nutný její předběžný rozbor, který rozhodne o její vhodnosti či nevhodnosti.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu jsou patrné z popisu příkladu jeho provedení, který má přirozeně povahu pouze ilustrativní, nikoliv omezovací.

Způsob výroby krmného biologického preparátu podle vynálezu vychází přirozeně z vypěstované kultury vyšlechtěného mikroorganismu *Bacillus subtilis* CCM 3622 vyrostlé na maso-

peptonovém agaru s 2 % hmot. laktózy, 0,000 6 % hmot. MnCl_2 , 0,008 % hmot. CaCl_2 a 0,007 % hmot. MgCl_2 . Uvedená laktóza působí jako zdroj asimilovatelného uhlíku a uvedená stopová poměrová množství solí kovů podporují sporulaci tohoto mikroorganismu. Kultivace tohoto mikroorganismu nejlépe probíhá při teplotě 37 °C a trvá tři až čtyři dny. Takto vypěstovaná kultura se musí uchovávat v chladničce při teplotě +5 °C, aby se dala používat pro očkování živné půdy, do které se její spóry za pomoci očkovací kličky přenášejí k dalšímu množení, např. v Erlenmayerových baňkách.

Pro laboratorní přípravu krmného biologického preparátu se pro Erlenmayerovy baňky o objemu 750 ml připraví půda tohoto složení:

krmná mouka	4 % hmot.
sušené odtučněné mléko	1,5 % hmot.
sušené kvasnice	0,6 % hmot.
MgCl_2	0,007 % hmot.
MnCl_2	0,000 6 % hmot.
CaCl_2	0,008 % hmot.

Tato živná půda se obohatí 3 % hmot. zahuštěné kukuřičné máčecí vody s obsahem vlhkosti do 40 % hmot. a v uvedené beňce smí zaujímat asi 10 % jejího objemu, tj. v daném případě cca 80 ml. Hodnota pH takto obohacené půdy se neupravuje, neboť po následující sterilizaci má hodnotu pH 6,0. Živná půda se sterilizuje při 120 °C po dobu 30 minut. Sušené mléko je vhodnější sterilizovat zvlášť jako 10% až 20% hmot. roztok při stejné teplotě po dobu 20 minut a přidávat je až do sterilní živné půdy tak, aby obsah mléka v živné půdě byl 1,5 % hmot. a celkový objem této půdy byl při použití Erlenmayerových baňek uvedeného objemu nanejvýš 80 ml.

Kultivace v těchto Erlenmayerových baňkách se provádí po přidání pitné vody, případně deionizované vody na rotační třepačce o 270 ot/min a s výchylkou 25 mm. Vzorky pro kontrolu produkce exoproteáz se odebírají ve 48. a 72. hodině kultivace. Maximální produkce exoproteáz se dostavuje obvykle ve 48. hodině, a to asi 9 000 SRN (syřivá aktivita).

Tento příklad tedy ilustruje laboratorní přípravu prepatáru podle vynálezu. Pro kultivace ve větších objemech se připravuje vegetativní inokulum 16 až 18hodinovou kultivací na třepačce v Erlenmayerových baňkách o objemu 750 ml s 80 ml živné půdy uvedeného složení, která se neočkuje stejným způsobem, jaký už byl popsán. Tímto vegetativním inokulem v poměrném množství 0,5 % lze očkovat přímo živnou půdu ve fermentačním tanku sloužícím k průmyslové výrobě biologického krmného preparátu stejně tak jako kultury vyprodukované předešlým laboratorním postupem.

Ve fermentačním tanku, zaplněném s výhodou jen do poloviny svého objemu tekutou živnou půdou výše uvedeného složení, je mikroorganismus *Bacillus subtilis* CCM 3622 kultivován při teplotě 37 °C za míchání živné půdy asi 500 ot/min a za současného provzdušňování alespoň polovičním minutovým objemem vzduchu ve vztahu k objemu tekuté živné půdy, načež po uplynutí 18, 24, 30, 36, případně 42 hodin kultivace se kontroluje produkce exoproteáz.

Jejich maximální produkce 8 000 až 9 000 SRN se dostavuje v době mezi 30. a 36. hodinou kultivace. Dosežením maxima je kultivace prakticky ukončena a fermentační tekutina se pak zpracovává na koncentrát přidáním 0,2 % hmot. krystalického CaCl_2 , její kyselost se případně upraví na pH 6,8 ± 0,1 a nakonec se 8 až 12-krát zehusť. Tím vznikne biologický krmný preparát vhodný jako přídatek do krmiva hospodářských zvířat. Jeho účinek je uveden v následujícím.

Složení krmné směsi A 1:

rybí moučka	1,25 % hmot.
masokostní moučka	1,00 % hmot.
krevní úsušky	0,80 % hmot.
krmné kvasnice	5,50 % hmot.
extrahovaný sojový škrob	8,20 % hmot.
odtučňené mléko	0,50 % hmot.
pšenice	35,00 % hmot.
ječmen	35,00 % hmot.
kukuřice	10,00 % hmot.
krmná sůl	0,30 % hmot.
MKP 3	0,50 % hmot.
DB P1	0,20 % hmot.
mletý vápenec	0,50 % hmot.

Složení doplňku biofaktorů DB P 1:

Vitamin A	1 000 000 mj.
Vitamin D ₂	200 000 mj.
Vitamin B ₁₂	6 mg.
Vitamin B ₂	1 200 mg
Niacin	1 500 mg
Lysinchlorid	80 000 mg
Krmná mouka pšeničná ad	1 kg

Složení minerální krmné přísady MKP 3:

mletý vápenec	70 až 78 % hmot.
minerální doplněk MD 3	2 % hmot.
Ca ₂ HPO ₄	20 až 25 % hmot.
pyrofosforečnan sodný	0 až 7 % hmot.
celkový obsah vápníku v MKP 3	34,8 % hmot.
celkový obsah fosforu v MKP 3	4,2 % hmot.

Složení doplňku MD 3:

síran železnatý	300 000 mg
síran měďnatý	100 000 mg
kysličník zinečnatý	30 000 mg
uhlíčitan manganatý	50 000 mg
síran kobaltnatý	15 000 mg
jodid draselný	5 000 mg
sádra	50 000 mg
pšeničná mouka krmná	ad 1 kg

Pokusná směs obsahovala 1 % preparátu dle vynálezu, kontrolou byla pouze směs A 1. V pokusech s 40 až 90 dní starými prasaty byl denní přírůstek o 15 % hmot. vyšší ve srovnání s kontrolou. Denní spotřeba krmiva byla u pokusné skupiny o 13,5 % nižší proti kontrole bez preparátu dle vynálezu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby krmného biologického preparátu na bázi exoproteáz vyprodukovaných vyšlechtěným mikroorganismem *Bacillus subtilis* CCM 3622 za aerobních podmínek v živné půdě obsahující jako základní zdroj živin krmnou mouku, sušené mléko, jako zdroj asimilovatelného dusíku a uhlíku, a sušené kvasnice jako zdroj vitaminů, vyznačený tím, že k těmto složkám živné půdy se přidávají 2 až 4 % hmot. zehuštěné kukuřičné máčecí vody o obsahu vlhkosti do 40 % hmot., načež se po přidávku deionizované vody nebo pitné vody odpovídající ČSN 83 06 11 v množství do 100 % obj. kultura mikroorganismu *Bacillus subtilis* CCM 3622 na této tekuté živné půdě obohacené o stopové přísady solí kovů podporujících jeho sporulaci, kultivuje za teploty 26 až 40 °C, přičemž vzdušnění této živné půdy se provádí alespoň polovičním minutovým objemem vzduchu, vztaženým na objem této tekuté živné půdy, načež po ukončení kultivace se do této živné půdy přidává 0,1 až 0,3 % hmot. krystalického chloridu vápenatého, její kyselost se případně upraví na hodnotu pH 6,8 ± 0,1 a takto vzniklý biologický krmný preparát se za působení podtlaku -85 až -90 kPa zehusťí 8 až 12krát.