



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

271 503

(21) PV 6032-86.T
(22) Prihlásené 18 08 86

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 N 1/20

(40) Zverejnené 14 03 90
(45) Vydané 02 09 91

(75) Autor vynálezu KOVÁČ ŠTEFAN MVDr. CSc., NITRA,
GAJDOŠ DANIEL prom. biol., NEMŠOVÁ

(54) Sójové živné médium a spôsob jeho výroby

(57) Nové sójové živné médium spadá do odboru priemyselnej mikrobiológie. Toto médium pozostáva z oligopeptidov a aminokyselín vo forme číreho sterilného žltohnedého roztoku vyznačujúce sa tým, že pozostáva, počítane ako sušina, z 52,0 až 57,0 hmotnostných % dusíkatých látok, z ktorých 15,0 až 17,0 hmotnostných % tvoria peptidické alebo voľné aminokyseliny, zo 16,5 až 19,0 hmotnostných % chloridu sodného, zo 16,4 - 16,6 hmotnostných % fosforečnanového pufra, z 2,2 až 2,5 hmotnostných % redukujúcich cukrov, z 1,0 až 1,25 hmotnostných % glukózy a z 3,65 až 11,9 hmotnostných % bezdusíkatých látok výťažkových, mastných kyselín, glycerolu a minerálnych látok.

Riešenia sa dosiahne kombinovaným proteolytickým účinkom fylogeneticky sa líšiacich enzýmov papaín a pankreatínu. Zariadením papaínu do enzymatickej hydrolýzy sójových bielkovín k pankreatínu štiepia pankreatické proteázy papaínom pripravené vyššie a strednomolekulárne peptidy až na oligopeptidy a aminokyseliny, pričom optimálne reakčné podmienky pre papaín sú na hodnote pH = 7,0 upravovaného pomocou hydroxidu sodného a optimálne reakčné podmienky pre pankreatín sú na hodnote pH - 7,5 - 8,2.

Vynález sa týka sójového živného média na bázi oligopeptidov a aminokyselín vo forme sterilného žltého roztoku a spôsobu jeho výroby.

Riešená problematika patrí do oblasti výroby veterinárnych bakteriálnych vakcín.

Doterajšie metódy enzymatickej hydrolýzy bielkovinových substrátov sa týkajú aplikácií len živočíšnych, rastlinných, či mikrobiálnych enzýmov vo veľkovýrobe sólovo. Takými sú pepsínové štiepenie bielkovín rastlinného pôvodu (peptický pepton pre VF bujón, peptický riasový pepton), trypsínové štiepenie rastlinných bielkovín (tryptický sójový pepton), trypsínové štiepenie živočíšnych bielkovín (mäsopeptónové bujonové základy, kazeínové tryptické hydrolyzáty). V uvedených príkladoch ide o pôsobenie jedného druhu, prípadne jedného enzýmového systému na jeden substrát. Podstatne náročnejšie je však vstupovať do toho istého hydrolytického procesu s dvoma enzýmami, prípadne enzýmovými sústavami.

Vyššie uvedené nedostatky za použitia jedného enzýmového systému boli vyriešené prípravou nového sójového živného média z oligopeptidov a aminokyselín vo forme číreho sterilného žltého roztoku, ktoré pozostáva, počítané ako sušina, z 52 až 57 hmotnostných percent dusíkatých látok, z ktorých 15 až 17 hmotnostných % tvoria peptidické alebo voľné aminokyseliny, zo 16,5 až 19,0 hmotnostných % chloridu sodného, zo 16,4 až 16,6 hmotnostných % fosforečnanového pufru, z 2,2 až 2,5 hmotnostných % redukujúcich cukrov, z 1,0 až 1,25 hmotnostných % glukózy a z 3,65 až 11,9 hmotnostných % bezdusíkatých látok výťažkových, mastných kyselín, glycerolu a minerálnych látok.

Nový spôsob výroby sójového živného média sa vyznačuje tým, že východzí substrát - sójový proteín a veľkomolekulové peptidy sa štiepia endopeptidázou papaínom v neutrálnej oblasti pH, pričom vznikajú strednomolekulárne peptidy, ktoré sa ďalej pankreatickými peptidázami hydrolyzujú na oligopeptidy a aminokyseliny, zatiaľ čo účinkom pankreatickej amylázy a lipázy sa zo škrobu a tuku uvoľňujú glukóza a glyceról s mastnými kyselinami, pričom po spotrebe určitého množstva hydroxidu sodného s koncentráciou 5 mol.l^{-1} za účelom udržiavania optimálnej hodnoty pH v hydrolyzáte sa ďalej upravuje nastavením pH, číri sedimentáciou a filtráciou a sterilizuje filtráciou a autoklávaním.

Podstatou vynálezu je zmena fyzikálnych a biochemických parametrov technologického postupu výroby sójového živného média. Rozhodujúcou zmenou je použitie rastlinných proteáz vo forme komerčného preparátu papaín a živočíšneho multienzymového preparátu pancreatín, ktoré sa biochemicky vhodne dopĺňajú pri enzymatickej hydrolýze vodného extraktu sójovej delipidizovanej múky. Ide o podobnú biochemickú interakciu, aká jestvuje medzi pepsínom a pankreatickými enzýmami, avšak v prípade papaínu sa možno vyhnúť nízkej hodnote pH, ktorá nielen komplikuje technologický postup predlžovaním, ale znižuje aj kvalitu živného média v porovnaní s papaínom.

Podľa vynálezu sa dosiahne viacero výhod. Predovšetkým sa dosiahne výrazné zvýšenie počtu baktérií *Erythrepelothrix rhusiopathiae* - kmeň WR - 2 v 1 ml sójového živného média podstatným zvýšením jeho výživnej hodnoty z pôvodných min. $1 \cdot 10^7$ KTJ v 1 ml na min. $1 \cdot 10^8$ KTJ v 1 ml sójového živného média. Použitím papaínu v tandeme s pankreatínom pri deštrukcii sójového proteínu sa ukázalo, že peptidové štiepy po papaíne ako endopeptidáze sú pankreatínovej karboxypeptidáze, ako exopeptidáze dostupnejšie priestorovo a kvantitatívne. Podobne aj serínovým proteázam pankreatínu sú fylogeneticky dostupnejšie peptidové štiepy, hoci aj s vyššou molekulovou hmotnosťou, než nenaštiepený polypeptid (bielkovina). Z deklarovaných hodnôt je pozoruhodné zvýšenie obsahu celkového dusíka z minimálne $2400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ na min. $3000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a obsah aminodusíka z min. $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ na min. $700 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Ako testachý kmeň bola použitá baktéria E. r. - WR - 2 vybraná preto, že vykazuje najvyššiu obtiažnosť pri povrchových i submerzných kultiváciach z dôvodov vysokej citlivosti na inhibitory bakteriálneho rastu.

Príklad 1

Vodná suspenzia sôjovej delipidizovanej múky sa upraví na pH = 8,0, čím sa začína studená alkalická extrakcia. Po jej skončení sa proteínový substrát pasterizuje pri teplote 70 °C počas 30 minút. Krátko nato sa teplota stabilizuje na 60 °C a upraví sa štartovné pH = 7,0. Zároveň sa pridáva proteázový stimulátor - CaCl_2 = 0,01 %. Papaínová suspenzia sa pridáva v koncentrácii 0,7 - 1,0 % v závislosti od enzymatickej aktivity. Papaínová hydrolýza trvá 1 hodinu a pH sa upravuje pomocou C (NaOH) = 5 mol . l⁻¹. Po jej skončení sa zníži teplota na 44 °C a pridáva sa pankreatínová suspenzia v koncentrácii 2,0 - 2,5 % opäť v závislosti na enzymatickej aktivite. Pankreatínová hydrolýza trvá 2 hodiny a pH sa udržiava v rozpätí 7,5 - 8,2 opäť pomocou C (NaOH) = 5 mol . l⁻¹. Po skončení hydrolýzy sa živné médium pred finalizáciou stabilizuje prídavkom fosforečnanového pufra. Finalizácia zahŕňa sedimentáciu, separáciu supernatantu, filtráciu, sterilizáciu, inkubáciu, výstupnú kontrolu a skladovanie.

Vynález ponúka nové kultivačné možnosti najmä pri kultivácii novoizolovaných baktérií s využitím jak vo veterinárnej medicíne tak v potravinárskom, či krmivárskom priemysle (kvasné potravinárske výrobky, konzervovanie siláží mikrobiálnou fortifikáciou a pod.).

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Sôjové živné médium na báze oligopeptidov a aminokyselín vo forme číreho sterilného žltého roztoku vyznačujúce sa tým, že pozostáva, počítané ako sušina, z 52 až 57 hmotnostných % dusíkatých látok, z ktorých 15 - 17 hmotnostných % tvoria peptidické alebo voľné aminokyseliny, zo 16,5 až 19,0 hmotnostných % chloridu sodného, zo 16,4 až 16,6 hmotnostných % fosforečnanového pufra, z 2,2 až 2,5 hmotnostných % redukujúcich cukrov, z 1,0 až 1,25 hmotnostných % glukózy a z 3,65 až 11,9 hmotnostných % bezdusíkatých látok výťažkových, mastných kyselín, glycerolu a minerálnych látok.

2. Spôsob výroby sôjového živného média podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že vychodzí substrát sôjový proteín a veľkomolekulové peptidy sa štiepi endopeptidázou papaínom v neutrálnej oblasti pH, pričom vznikajúce strednomolekulárne peptidy sa ďalej pankreatickými peptidázami hydrolyzujú na oligopeptidy a aminokyseliny, zatiaľ čo účinkom pankreatickej amylázy a lipázy sa zo škrobu a tuku uvoľňujú glukóza a glycerol s mastnými kyselinami, pričom po spotrebe určitého množstva hydroxidu sodného za účelom udržiavania optimálnej hodnoty pH v hydrolyzáte sa tento ďalej upravuje nastavením pH, číri sedimentáciou a filtráciou a sterilizuje filtráciou a autoklávovaním.