



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

225 066

(11) (B1)

(51) Int. Cl. C 12 N 9/58

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 18 11 80
(21) PV 7828 - 80

(40) Zveřejněno 24 06 83
(45) Vydáno 01 12 84

(75)
Autor vynálezu

HYLMAR BOHUMIL ing.,

PETERKOVÁ LUDMILA ing.,

BLUMAUEROVÁ MARGITA RNDr. CSc., PRAHA, VANĚK ZDENKO RNDr. PhMr. DrSc.,

POKORNÁ LIBUŠE RNDr., Kladno,

DĚDEK MIROSLAV ing. CSc.,

SAJDL PŘEMYSL RNDr. CSc.,

KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. ing.
DrSc., PRAHA

(54)

Způsob výroby syřidlového enzymového preparátu

Vynález se týká výroby syřidlového preparátu kultivací vybraných druhů streptomycet.

Dosud se vyrábí přírodní syřidlo z telecích žaludků, obsahujících převážně jako syřidlový enzym chymosin a z vepřových žaludků, které obsahují převážně pepsin. Pepsinové syřidlo lze samostatně použít jen k výrobě tvarohů a měkkých sýrů, zatímco chymosinového syřidla stále ubývá pro nedostatek telecích žaludků na trhu. Proto jsou konány pokusy a vyvíjena syřidla mikrobiální, která mají také koagulační schopnost, aniž by se zvyšovala kyselost. K pokusným výrobám mikrobiálního syřidla bylo použito řady různých mikrobů. V některých případech byl tento vývoj ukončen, použití mikrobiálních druhů a kmenů popsáno, případně patentováno. Tak je patentována výroba syřidla mikrobiálního původu za použití *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Endothia parasitica*, některých druhů hub z třídy *Basidiomycetes* a dalších. Také u streptomycet byly konány pokusy se získáním enzymů s koagulační aktivitou.

Nedostatkem mikrobiálních syřidel, vyrobených za použití výše uvedených mikroorganismů, je méně výhodná a převážně vyšší proteolytická aktivita oproti přírodnímu syřidlu chymosinovému. Jelikož proteolytická i koagulační aktivita jsou pravděpodobně realizovány jedním enzymem, je malá pravděpodobnost izolace takové mutanty, která by

vykazovala podstatně zvýšenou koagulační aktivitu a naopak sníženou aktivitu proteolytickou. Nevhodná, popřípadě vysoká proteolytická aktivita, především jsou-li vytvářeny v převaze alkalické proteázy, má při výrobě sýrů za následek hořkost, špatnou konzistenci a rychlé přezrávání v distribuci.

Výše uvedené nedostatky se odstraní použitím způsobu podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se kultivují kmeny *Streptomyces rimosus*, *Laktoflora* č. 950 a/nebo *Streptomyces albogriseolus*, *Laktoflora* č. 951 v prostředí obsahujícím využitelné zdroje uhlíku a dusíku a živné soli, při teplotě 26 až 28 °C a počátečním pH 6,9 až 7,0, po dobu 24 až 144 hodin, načež se vyprodukovaný syřidlový preparát od kultivačního média oddělí a koncentrace syřidlových enzymů se zvýší například odpařením, vysolením a/nebo membránovými metodami. Případně je možno získat preparát práškový vhodným sušením, například vakuovým, kryodesikačním nebo fluidním.

Výhody způsobu podle vynálezu spočívají v tom, že vyrobený syřidlový preparát má ve vhodném poměru koagulační a proteolytickou aktivitu a zajišťuje vhodný rozklad kaseinových frakcí. Koagulační aktivita získaného syřidlového preparátu i proteolytické vlastnosti jsou podobné vlastnostem přírodního syřidla chymosinového, získaného z telecích žaludků. Při výrobě syřidlového preparátu kmenem *Streptomyces rimosus*, označeným v Československé sbír-

ce mikroorganismů Laktoflora č. 950 , a kmenem Streptomyces albogriseolus, Laktoflora č. 951 , bylo dosaženo překvapivého zvýšeného technického účinku tím, že získaný syřidlový preparát má podobné vlastnosti jako přírodní syřidlo chymosinové a svou koagulační a především proteolytickou aktivitou zajišťuje daleko vhodnější jakost sýrů a tvarohů, než dosud známá mikrobiální syřidla.

Postup výroby syřidlového enzymového preparátu je zřejmý z následujících příkladů.

Příklad 1

a) Příprava laboratorních kultur produkčního mikroorganismu

Kmen Streptomyces rimosus Laktoflora č. 950 byl kultivován 10 dní při teplotě 28 °C na agarové půdě, obsahující :

Bacto-yeast-extract	4,0 g
Bacto malt-extract	10,0 g
glukosa	4,0 g
agar Oxoid No. 3	30,0 g
destilovaná voda	1 000,0 ml

pH půdy bylo před sterilisací upraveno na 7,3 .

Vyrostlé kultury byly uchovávány při 4 °C a používány pro přípravu vegetativního inokula nejdéle po dobu 2 měsíců.

Dvoustupňová submersní kultivace kmene byla provedena na reciprokém třepacím stroji s frekvencí 1,6 Hz, tj. s 96 kyvy/min a délkou kyvu 10 cm, při 28 °C v 500 ml varných buňkách, obsahujících 80 ml tekutého živného prostředí následujícího složení:

glukosa	10,0 g
škrob rozpustný	15,0 g
cornsteep /suš./	5,0 g
/NH ₄ / ₂ SO ₄ :	3,5 g
NaCl	5,0 g
CaCO ₃	5,0 g
destilovaná voda	1 000,0 ml

pH půdy před sterilizací bylo upraveno na 6,95.

První vegetativní generace, očkovaná inokulem z agarové kultury, byla kultivována 26 h. Druhá generace, očkovaná 4 ml kultury 1. vegetativní generace, byla kultivována 96 h.

b/ Příprava syřidlového enzymového preparátu

7 l fermentační tekutiny, získané spojením 90 paralelních submerzních kultur 2. generace, starých 96 h, bylo centrifugováno 20 min při 5 000 g. Syřidlový enzymový preparát byl izolován ze supernatantu trojstupňovou frakcionací síranem amonným p.a.:

1. stupeň: balastní bílkoviny, nemající požadovanou koagulační aktivitu, byly odstraněny vysolením síranem amonným p.a. do stupně nasycení 50 % za stálého míchání. Sraženina byla po usta-

vení rovnovážného stavu, tj. po 4 h stání při 4 °C, oddělena centrifugací 20 min při 5 000 g.

2. stupeň: supernatant, zbavený v předchozím stupni balastního bílkovinného podílu, byl dále frakcionován síranem amonným do stupně nasycení 75 %. Po ustavení rovnovážného stavu byla sraženina oddělena centrifugací 20 min při 5 000 g. Získaná bílkovinná frakce byla rozpuštěna v destilované vodě, jejíž množství odpovídalo 1/50 původnímu objemu fermentační tekutiny, a roztok byl dialysován proti destilované vodě 12 h při 4 °C. Čistý syřidlový enzymový preparát, získaný ve stupni 2, vykazoval koagulační aktivitu 6 000 Hansenových jednotek.

3. stupeň: k supernatantu, získanému předchozí frakcionací, byl přidán za stálého míchání síran amonný p.a. do stupně nasycení 100 %. Další postup byl stejný jako ve stupni 2. Výsledný čistý syřidlový enzymový preparát vykazoval koagulační aktivitu 8 300 Hansenových jednotek.

Takto připravené syřidlové enzymové preparáty po 2. a 3. stupni frakcionace, obsahující převážně kyselé a neutrální proteasy /stanoveno metodou dle Turkové a sp. Biochim.Biophys.Acta, 173: 100-111, 1969/ lze přímo použít pro výrobu sýrů.

P ř í k l a d 2

a/ Příprava kultur produkčního mikroorganismu

Kmen *Streptomyces albogriseolus* Laktoflora č. 951 byl kultivován 10 dní při teplotě 28 °C na agarové půdě stejného složení jako v příkladu 1.

Dvoustupňová submersní kultivace kmene probíhala při 28 °C na rotačním třepacím stroji při 220 otáčkách za jednu minutu s 5 cm excentritou v 500 ml varných baňkách, obsahujících 80 ml produkčního živného média, a ve fermentoru 50 dm³. Fermentor byl vybaven membránovým distributorem vzduchu, lopatkovým míchadlem a mechanickým odpěňovačem. Vzdušnění bylo nařízeno na 0,5 až 0,75 VVM a počet obrátek v počáteční fázi na 150, později na 300 za 1 minutu. U obou stupňů kultivace mělo produkční živné médium následující složení:

sacharóza	55,0 g
corn steep 55 %	8,4 g
melasa	2,5 g
sojová mouka	34,0 g
NaCl	2,5 g
CaCO ₃	9,0 g
/NH ₄ / ₂ SO ₄	6,5 g
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	30,0 mg
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	20,0 mg
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	50,0 mg
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	3,0 mg
destilovaná voda	1 000,0 ml

pH půdy před sterilizací bylo upraveno na 6,9.

První vegetativní generace, očkovaná inokulem z agarové kultury, byla kultivována 24 hodin, druhá 96 hodin.

b/ Příprava syřidlového enzymového preparátu

Fermentační tekutina, získaná z fermentoru 50 dm³, byla ihned po 96 hodinové kultivaci odstředěna na odstředivce při

5 000 g po dobu 30 minut. Získaný supernatant byl zahuštěn v odparce na jednu pětinu svého původního objemu.

Získaný syřidlový enzymový preparát obsahoval koagulační aktivitu 6 000 Hansenových jednotek.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

225 066

Způsob výroby syřidlového preparátu, vyznačený tím, že se kultivují kmeny *Streptomyces rimosus*, *Laktoflora* č. 950 a/nebo *Streptomyces albogriseolus*, *Laktoflora* č. 951 v prostředí, obsahujícím využitelné zdroje uhlíku a dusíku a živné soli, za aerace, při teplotě 26 až 28 °C a počátečním pH 6,0 až 7,0 po dobu 24 až 144 hodin, načež se vyprodukovaný syřidlový preparát od kultivačního média oddělí a koncentrace syřidlových enzymů se zvýší, například odpařením, vysolením a/nebo membránovými metodami.