



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

196604

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/56

(22) Přihlášeno 21 11 77
(21) (PV 7655-77)

(40) Zveřejněno 29 06 79

(45) Vydáno 30 05 82

(75)

Autor vynálezu

PALEČKOVÁ FRANTIŠKA, RNDr., ČULÍK KAREL, RNDr., PRAHA;
PELZBAUER JIŘÍ, ing., ROZTOKY U PRAHY, DENK RAIMUND, ing.,
TEPLÝ MILOŠ, dr., ing., MAŠEK JAROSLAV, dr., ing.,
HAVLOVÁ JANA, ing., PRAHA a MIKOVÁ LUDMILA, ČELAKOVICE

(54) Způsob výroby mikrobiálního syřidla

1

Vynález se týká způsobu výroby mikrobiálního syřidla na bázi směsi exoproteáz s vysokým obsahem neutrální proteázy, kultivací mikroorganismu *Bacillus subtilis* za aerobních podmínek, v tekuté živné půdě obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku.

Jako syřidla bylo používáno a stále se ještě používá rennetu, extraktu ze žaludků narozených telat. Avšak již koncem 19. století bylo popsáno účinné mikrobiální syřidlo (H. W. Conn, Centr. Bact. 12, 223, 1892; C. Corini, Riv. Ing. Sanit. 3, 527, 1892). Nověji byla popsána syřidla produkovaná mikroorganismy *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp. a *Eurotium oryzae* (americký pat. spis č. 1,391,219), jakož i bakterie, které produkují enzymy vhodné pro použití v sýrařství (G. J. Wahlin, J. Bact. 16, 355, 1928).

I když rennet zůstává hlavním syřidlem, je stále více nahrazován syřidly jiného původu, neboť je výrobně dražší a nestačí zvyšující se výrobě sýrů. Stále stoupající počet publikací svědčí o tom, že se výzkum zaměřuje na otázky výroby syřidel mikrobiálního původu.

Syřidlo bakteriálního původu je směs exoproteáz produkovaná na začátku sporulačního stadia cyklu buňky. Vhodnou kombinací genetických vlastností a jejich pozměněním lze získat stabilní směs exoproteáz, jež vyhovuje všem požadavkům

kladeným na syřidlo. Důležitou složkou směsi exoproteáz sloužící jako syřidlo je proteáza s enzymatickou aktivitou při neutrální hodnotě pH (neutrální proteáza). Je proto důležité vést kultivaci vhodného mikroorganismu za takových podmínek, aby se dosáhlo maximální produkce neutrální proteázy. Tomuto účelu je nutno přizpůsobit podmínky aerace, poněvadž vyšší obsah neutrální proteázy je kromě genetického založení kmene závislý i na množství vzduchu používaného při kultivaci. V laboratorním měřítku lze optimálních podmínek dosáhnout při kultivaci v Erlenmayerových baňkách o objemu 750 ml s 80 ml média a na reciproké třepačce. Zvýšení aerace má sice za následek zvýšení celkového množství produkovaných exoproteáz (měřeno sýřivou aktivitou), ale obsah neutrální proteázy je nižší.

Schopnost produkovat vysoká množství směsi exoproteáz se zvýšeným podílem neutrální proteázy se příznivě projevuje na půdách s krmenou pšeničnou moukou jako zdrojem uhlíku v koncentraci 8 až 3 % hmot., a to v laboratorních podmínkách na reciproké třepačce o 96 kyvech/min s výkyvem 9 cm, v provozních podmínkách pak v 5 m³ tanku za míchání 300 obr./min a vzdušnění do 16. hodiny 1000 l vzduchu/min a po 16. hodině 1400 l vzduchu/min.

Z uvedených poznatků vychází a optimálním podmínkám je přizpůsoben způsob výroby mikro-

biálního syřidla na bázi směsi exoproteáz s vysokým obsahem neutrální proteázy, kultivací mikroorganismu *Bacillus subtilis* za aerobních podmínek v tekuté živné půdě obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se kultivace provádí v tekuté živné půdě, obsahující jako základní zdroje živin krmnou pšeničnou mouku, sušené mléko, sladinu a kvasnice nebo kvasničný extrakt, při teplotě 30 až 40 °C, s výhodou při 36 až 38 °C, za vzdušnění 33 až 40 % obj. vzduchu/min v růstové fázi mikroorganismu a 48 až 55 % obj. vzduchu/min v produkční fázi vztaženo na objem živné půdy, po ukončení kultivace se z vyfermentované půdy oddělí biomáza, filtrát se za sníženého tlaku zahustí na 20 až 30 % původního objemu a z koncentrátu se odstraní balasty srážením rozpustnou vápenatou solí, s výhodou chloridem vápenatým, nebo organickým s vodou mísitelným rozpouštědlem, s výhodou ethanolem, při teplotě 30 až 40 °C, s výhodou 35 až 38 °C, a při hodnotě pH 5,3 až 6,5, s výhodou 5,6 až 6,2, načež se získaný koncentrát, je-li to žádoucí, zpracovává na suchý produkt, například rozprašovacím sušením.

V literatuře jsou popisovány různé způsoby izolace mikrobiálního syřidla; závislé na druhu použitého produkčního mikroorganismu a na složení kultivačního média. Izolace a čištění produktu z kultivačního média je možné různými způsoby a je zásadně ovlivněno požadavkem na čistotu a kvalitu preparátu, popřípadě i tím, zda finální produkt má být kapalný nebo pevný. Jsou popisovány převážně srážecí metody při izoelektrickém bodě, popřípadě v kyselé oblasti pH s přídavkem solí. Další případné čištění se obvykle provádí na iontoměničích, gelovou filtrací, dialýzou a frakčním srážením.

Při studiu různých způsobů izolace s přihlédnutím ke kvalitě konečného produktu bylo zjištěno, že při daném složení fermentační půdy se optimálního výsledku izolace dosáhne po oddělení biomázy produkčního mikroorganismu, zahuštěním supernatantu, frakčním srážením rozpustných bílkovin a odstraněním nerozpustných balastních látek a vápenatých solí kyselin za definované hodnoty pH a teploty, přičemž účinná látka zůstává v roztoku, který po případné konzervaci a filtraci představuje finální produkt, tj. vysoce stabilní mikrobiální syřidlo. Jako nejvýhodnější se ukázalo frakční srážení chloridem vápenatým, na druhém místě bylo srážení ethanolem.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu jsou patrné z příkladů provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Příklad 1

Kulturou kmene *Bacillus subtilis*, vyrostlou na šikmém nasopeptonovém agaru při 37 °C za dobu 4 až 5 dní a pak uloženou v chladničce při 5 °C, se pomocí kličky zaočkuje 80 ml půdy v 750 ml Erlenmayerově baňce, jež má toto složení (v % hmot.):

krmná pšeničná mouka	8,0
zahuštěná sladina	5,2
odtučněné sušené mléko	1,25
kvasničný extrakt	
nebo sušené kvasnice	0,6

pH se neupravuje, po sterilizaci má hodnotu kolem 6,0. Sterilizuje se při 120 °C 30 minut. Sušené mléko se jako 10% roztok sterilizuje zvlášť při 120 °C 20 minut a po sterilizaci se přidává do půdy. Do kultivačních baňek se rozděljuje po 80 ml. Kultivuje se na reciproké třepačce o 95 kyvek/min, s výchylkou 9 cm. Vzorky pro stanovení sýřivé aktivity se odebírají po 24 hodinách. Maximálních hodnot se dosahuje v 72. hodině a dále se již nemění. Tímto postupem se dosáhne produkce exoproteáz sýřivou aktivitou okolo 4000 SRN a obsahu 75 % hmot. neutrální proteázy.

Příklad 2

Kultivace za týchž podmínek a na téže půdě jako v příkladu 1, pouze objem půdy v kultivační baňce se sníží na 40 ml (zvýšená aerace). Produkce měřená sýřivou aktivitou je 4500 SRN a obsah neutrální proteázy se sníží na 38 % hmot.

Příklad 3

Kulturou kmene jako v příkladu 1 se zaočkuje půda tohoto složení (v % hmot.):

krmná pšeničná mouka	3,0
zahuštěná sladina	5,2
odtučněné sušené mléko	2,0
kvasnicový extrakt nebo	
sušené kvasnice	0,3

Příprava a sterilizace půdy, očkování a kultivace a stanovení sýřivé aktivity je stejné jako v příkladu 1. Maximální produkce se dosáhne v 72. hodině kultivace, sýřivé aktivity 4200 SRN a obsahu 75 % hmot. neutrální proteázy.

Příklad 4

Kultivace a půda jako v příkladu 3, pouze objem půdy v kultivačních baňkách se sníží na 40 ml. Produkce měřená sýřivou aktivitou je 4200 SRN a podíl neutrální proteázy se sníží až na 30 % hmot.

Příklad 5

Pro kultivaci v 5 m³ tanku se v prvním stupni použije 24 hod. staré vegetativní inokulum (16 baňek po 80 ml), vyrostlé na půdě podle příkladu 1, jímž se naočkuje 100 litrů půdy ve 250litrovém očkovacím tanku. Půda má toto složení (v % hmot.):

krmná pšeničná mouka	8,0
zahuštěná sladina	5,2
odtučněné sušené mléko	1,25
sušené kvasnice	0,6
směs sojového a silikonového oleje (6:1)	0,2

pH se neupravuje, po sterilizaci má hodnotu 5,8 až 6,2. Sterilizuje se 40 minut při 120 °C. Sušené mléko se sterilizuje zvlášť jako 10% roztok 20 minut při 120 °C. Očkovací tank se očkuje 0,5 % vegetativního inokula připraveného kultivací v baňkách na reciproké třepačce (96 kyvů/min, s výchylkou 9 cm) po dobu 24 h při 37 °C. V očkovacím tanku se kultivuje při 37 °C ± 1 °C, vzdušnění 100 l/min a míchání 200 obr./min po dobu 24 h. Odpěňování není nutné. Po ukončení kultivace se získaným inokulem v množství 100 l na-

očkuje 2500 l půdy (stejného složení jako v očkovačím tanku) v 5 m³ produkčním tanku. Kultivace probíhá při 37 °C ± 1 °C a míchání 300 obr./min. Do 16 hodiny se vzdušní 1000 l/min, od 16 hod. 1400 l/min. Pokud je nutno odpěňovat, používá se směsi sójového a silikonového oleje (6:1). Sýřivá aktivita se sleduje obvykle po 6., 24., 30., 36. a 42. hodině. Kultivace je ukončena mezi 30. až 42. hodinou, kdy sýřivá aktivita dosáhne maxima a již se dále nemění.

Příklad 6

2500 l fermentované půdy, připravené podle příkladu 5, o aktivitě kolem 4000 SRN, se ochladí na teplotu 15 °C a po přidavku 5 kg krystalického chloridu vápenatého se oddělí produkční biomáza na sedimentační odstředivce. Získaný supernatant se vakuově zahustí na filmové odparce na objem 650 litrů, přidá se 16,2 kg chloridu vápenatého, po rozpuštění se upraví pH na hodnotu 6,0 a koncentrát se zahřívá na teplotu 37 °C po dobu 2 hodin. Po ochlazení koncentrátu na 15 °C se vyloučený kal oddělí na sedimentační odstředivce a získaný, téměř čirý filtrát se po přidavku 18 g eugenolu a 18 g thymolu zfiltruje přes bakteriální filtr a rozplní. Účinnost takto připraveného tekutého produktu je 20 000 SRN. Výtěžek izolace (vztaheno na obsah účinné látky ve fermentované půdě) je 70 %. Stejného výsledku bylo dosaženo při zpracování fermentační půdy složení jako v příkladu 3.

Příklad 7

130 l koncentrátu po zahuštění na filmové odparce z příkladu 5 se smíchá se 40 l ethanolu a po 1 hodině mírného míchání při teplotě 35 °C se vyloučený sediment odfiltruje na rotačním vakuovém filtru, filtrát se zahustí ve vakuové oběhové odparce na objem 90 l, ochladí na 15 °C a zfiltruje přes bakteriální filtr. Získaný tekutý preparát má účinnost 28 000 SRN, výtěžek izolace je 72 %.

Příklad 8

2 l tekutého produktu z příkladu 6 se usuší na laboratorní rozprašovací sušárně při teplotě 120/75 °C. Získá se 0,32 kg pevného preparátu ve výtěžku 51 %.

Příklad 9

2 l tekutého preparátu z příkladu 7 se rozmíchají se 2 l methanolu, po oddělení vyloučených balastních látek odstředěním se ze získaného supernatantu vysráží další přísadou 1,6 až 1,8 l methanolu produkt, který se odfiltruje, promyje 100 ml methanolu, pak 100 ml izopropanolu a vysuší ve vakuu. Získá se 72,5 g suchého produktu o účinnosti 500 000 SRN ve výtěžku 65 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby mikrobiálního syřidla na bázi exoproteáz s vysokým obsahem neutrální proteázy, kultivací mikroorganismu *Bacillus subtilis* za aerobních podmínek v tekuté živné půdě obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, vyznačující se tím, že se kultivace provádí v tekuté živné půdě obsahující jako základní zdroje živin krmnou pšeničnou mouku, sušené mléko, sladidlo a kvasnice nebo kvasničný extrakt, při teplotě 30 až 40 °C, s výhodou při 36 až 38 °C, za vzdušnění 33 až 40 % objemových vzduchu/min v růstové fázi mikroorganismu a 48 až 55 % objemových/min

v produkční fázi, vztaheno na objem živné půdy, po ukončené kultivaci se z vyfermentované půdy oddělí biomáza, filtrát se za sníženého tlaku zahustí na 20 až 30 % původního objemu a z koncentrátu se odstraní balasty srážením rozpustnou vápenatou solí, s výhodou chloridem vápenatým, nebo organickým, s vodou mísitelným rozpouštědlem, s výhodou ethanolem, při teplotě 30 až 40 °C, s výhodou 35 až 38 °C, a při hodnotě pH 5,3 až 6,5 s výhodou 5,6 až 6,2, načež se získaný koncentrát popřípadě zpracovává na suchý produkt, například rozprašovacím sušením.