

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 328

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07C 229/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-96**
(22) Přihlášeno: **26.02.2018**
(40) Zveřejněno: **06.06.2018**
(Věstník č. 23/2018)
(47) Uděleno: **25.04.2018**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **06.06.2018**
(Věstník č. 23/2018)

(56) Relevantní dokumenty:

CHO Y. J. et al.: „Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclarii*“, Letters in Applied Microbiology, vol. 35, 2002, str. 195 – 202, ISSN 0266-8254; PRAJAPATI V. S. et al.: „An enhancement of red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus* MTCC 410 employing statistical methodology“, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, vol. 3, 2014, str. 140 – 145, ISSN 1878-8181; SUBHASREE R. S. et al.: „Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Stimulation of Pigment Production by *Monascus purpureus* on Jackfruit Seeds“, International Journal of Microbiological Research, vol. 2, 2011, str. 184 – 187, ISSN 2079-2093; ZHOU Z. et al.: „Corn cob hydrolysate, an efficient substrate for *Monascus* pigment production through submerged fermentation“, Biotechnology and Applied Biochemistry, vol. 61, 2014, str. 716 – 723, ISSN 1470-8744.

CZ 307 29U.

(73) Majitel patentu:

Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Praha
10, Hostivař, CZ

(72) Původce:

RNDr. Lubomír Adámek, Praha 4, Krč, CZ
Ing. Marian Urban, Ph.D., Praha 7, Holešovice, CZ
Ing. Ivana Laknerová, Praha 4, Nusle, CZ
Eva Rutová, Praha 3, Žižkov, CZ
Ing. Vít Matějů, Praha 8, Kobylisy, CZ

(74) Zástupce:

NEOLEGAL - advokátní a patentová kancelář, Ing.
Jaroslav Novotný, Římská 2135/45, 120 00 Praha 2,
Vinohrady

(54) Název vynálezu:

**Přísada ke zvýšení produkce pigmentů v
submerzních kulturách mikroskopických
hub a způsob její výroby**

(57) Anotace:

Přísada do živné půdy pro zvýšenou produkci pigmentů mikroskopických hub obsahuje aminokyselinami fortifikovaný hydrolyzát proteinů s obsahem 12,1 až 18 % hmotn. amino dusíku. Způsob zvýšení produkce pigmentů spočívá v tom, že v původním růstovém médiu kultury mikroskopické houby je obsaženo 16 mg amino dusíku na 1 g vložené sacharózy. Toto počáteční množství obsažených dusíkatých a uhlíkatých živin v růstovém médiu je zvýšeno na poměr 30 až 80 mg amino dusíku na 1 g vložené sacharózy, přičemž živiny v tomto poměru jsou vloženy na počátku kultivace.

CZ 307328 B6

Přísada ke zvýšení produkce pigmentů v submerzních kulturách mikroskopických hub a způsob její výroby

5 Oblast techniky

Vynález se týká složení přísady do tekutých půd jako prostředku, který slouží k optimalizaci biotechnologické výroby pigmentu s využitím speciálních kmenů mikroskopických hub a způsobu její výroby.

10

Dosavadní stav techniky

15 Fermentace zůstává stále vhodným technologickým postupem pro výrobu nejrůznějších druhů potravin nebo aditiv. Při výrobě barviv jako potravinářských přídatných látek (aditiv), označovaných evidenčními kódy (E) a majících za úkol obnovit původní vzhled potravin, jejichž barva byla dotčena zpracováním, skladováním, balením nebo distribucí, dále zvýšit vizuální přitažlivost potravin a v neposlední řadě obarvit jinak bezbarvé potraviny (Emerton V., Choi E.: Additives. Essential Guide to Food Additives (3), 101-319, 2008), se využívá nejnovějších
20 poznatků právě z oblasti biotechnologie. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) prověřuje bezpečnost (zdravotní nezávadnost) všech přídatných látek, přičemž mezi prvními posuzovanými látkami, byla potravinářská barviva. V posledních letech se objevilo podezření, že některá přírodně identická barviva produkovaná synteticky nebo dokonce i přírodní potravinářská barviva (např. košenila) mohou mít vliv na chování dětí. Trendem současné doby je zvýšená
25 iniciativa výrobců potravin a poskytovatelů stravovacích služeb odstranit některá syntetická barviva z výrobků (např. E 102, E 104, E 110, E 122) a nahradit je přírodními zdravotně nezávadnými.

Názory na zdravotní nezávadnost barviv se neustále vyvíjí a jsou živé. Nedostatečně jsou
30 například zhodnoceny možné toxické interakce mezi látkami ve směsi, chybí pochopit mechanismy toxicity a ustavit prediktivní matematické a biologické modely. Poslední polemiku ohledně genotoxicity způsobila barviva na bázi sulfonovaných azo-sloučenin: Amarant (E 123), Ponceau 4R (E 124), Sunset Yellow FCF (E 110), Tartrazine (E 102) a Azorubine/Carmoisine (E 122). (EFSA Journal 2010;8(10):1778) Ačkoliv bylo prokázáno, že
35 konzumace těchto aditiv nepředstavuje riziko, EFSA přesto doporučuje další nové doplňující testování a potraviny obsahující jedno nebo více těchto potravinářských barviv (E 110, E 104, E 122, E 129, E 102, E 124) musí v označení obsahovat doplňující informace: „mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“. [http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?language=en&type=IM-](http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?language=en&type=IM-PRESS&reference=20080707IPR33563)
40 [PRESS&reference=20080707IPR33563; https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/ans091112](https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/ans091112). Biotechnologická produkce potravinářských barviv má potenciál nahradit diskutovaná přírodně identická barviva produkovaná synteticky z vysoce přečištěných ropných produktů, případně přírodní barviva mající své limity v sezónnosti suroviny, dále pak v menší barevné stálosti, citlivosti vůči světlu, zářevu, oxidaci a mnohdy problematické rozpustnosti ve vodě.

45

Zdrojem přírodních barevných látek, nejčastěji ve formě pigmentů, jsou rostlinné i živočišné druhy, některé mikroorganismy, lišejníky a houby (Velíšek J., Hajšlová J.: Chemie potravin II, Ossis, Tábor, 602, 2009).

50 Globální trh s přírodními barvivy byl v roce 2014 odhadován na 1 144 milionů US\$ s predikcí růstu na 1 698 US\$ milionů do roku 2020, což představuje nárůst 6,8 %, přičemž dominantní podíl představují karotenoidy s podílem na trhu 31,8 %. (<http://www.futuremarketinsights.com/reports/global-natural-food-colours-market>)

55 Ke společnostem hrajících významnou roli na mezinárodním globálním trhu patří především

firma Chr. Hansen A/S s podílem 18 %, na produkci karminu 70 %. Velká nevyrovnanost v cenách na komoditních burzách, např. 1 kg/400 EUR (2010) a 1 kg/57 EUR (2014), spolu s nutností omezit tento pigment z důvodů legislativního snížení množství hliníku, nutí firmy k významným inovacím.

Mezi významné producenty pigmentů dále patří Sensient Technologies Corporation and Kalsec Inc., DDW, Naturex S.A., ADM (Wild flavors Inc.), ROHA Dyechem Pvt. Ltd., GNT International B.V., DIC Corporation, and LycoRed Ltd.

V České republice se výrobou mikrobiálního pigmentu historicky komerčně zabývala pouze jediná firma ASCOLOR BIOTEC s.r.o. s barvivem Arpink Red™. V současné době na její činnost navázala firma NATURAL RED a.s., ve spolupráci s VÚPP, v.v.i., s poloprovozní výrobou o objemech 3000 l. Producentem tohoto červeného pigmentu je kmen mikroskopické houby *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*. Na základě souhlasného stanoviska Ministerstva zdravotnictví ČR a po předložení požadované dokumentace JECFA konstatoval, že nejsou námitky vůči použití Arpink Red do masných výrobků a analogů masa a masných výrobků (v množství až 100 mg/kg), dále do nealkoholických nápojů (v množství až 100 mg/kg), alkoholických nápojů (v množství až 200 mg/kg), mléčných výrobků (v množství až 150 mg/kg), mrazených krémů (v množství až 150 mg/kg) a cukrovinek (v množství až 300 mg/kg).

S ohledem na předpokládanou změnu legislativních nařízení byla platnost stanoviska JECFA omezena do 31. 12. 2002. V současné době se připravují nové podklady k legislativnímu řízení.

Z nepřeberného množství možných mikrobiálních producentů pigmentů, které mohou nalézt uplatnění v potravinářském průmyslu, je možno ilustrativně uvést např.: *Xanthophyllomyces dendrorhous* – Astaxanthin, *Monascus* sp. – Ankaflavin Color supplement, Monascorubramin, Rubropunctatin, *Penicillium oxalicum* – Anthraquinone, *Fusarium sporotrichioides* – Lycopene, *Saccharomyces neoformans* – Melanin, *Rhodotorula* sp. – Torularhodin, *Flavobacterium* – Zeaxanthin, *Agrobacterium auranticum* – Astaxanthin, *Mycobacterium lacticola* – Astaxanthin, *Flavobacterium* sp. – Zeaxanthin, *Blakeslea trispora* a *Dunaliella salina* – α -Carotene, *Blakeslea trispora* – Lycopene, *Spongilococcus excentricum* – Lutein. (<http://www.hindawi.com/journals/ab/2014/837891/>)

Kultivací mikroskopických hub může množství barevně významných složek sekundárních metabolitů, tzn. pigmentů, dosahovat ve fermentačním prostředí až několik gramů na litr. O významu vytvořených pigmentů pro vlastní živou kulturu je možno pouze spekulovat. Může se jednat o výsledný konečný produkt některé vedlejší metabolické dráhy, nebo o plnění ochranné funkce vlastní kultury. Mezi výrazné vlastnosti pigmentu patří silná antioxidační aktivita, která má pozitivní vliv zejména v prevenci srdečně cévních a nádorových onemocnění. Uplatnění plísňové myceliární biomasy jako meziproductu při biotechnologické výrobě v krmivářství nebo při výrobě potravin je dána základním striktním požadavkem na zdravotní nezávadnost z hlediska produkce toxinů. Tento nárok lze do jisté míry splnit výběrem vhodných kmenů a úpravou složení kultivační půdy. Jako dusíkaté komponenty živných půd je možno využít kvasničný extrakt (HY-Yest 412 Powder) mající obsah dusíku 10 až 12 % nebo surovinu Hy-Case SF s obsahem 8 až 12 % amino dusíku (Technické specifikace výrobků firem Kerry Ingredients & Flavours, resp. Sigma-Aldrich). Biotechnologická příprava červeného pigmentu by mohla být alternativní náhradou nebo doplněním dosud používaných červených pigmentů ve farmácii nebo potravinářství (např. košenila). Zvyšování dusíkaté složky pomocí kvasničného extraktu nebo hydrolyzátu mléčného kaseinu pro přípravu živných půd pro produkci pigmentů mikroskopickými houbami souvisí zároveň se zvyšováním balastních látek (popeloviny).

Informací o komerční nebo potenciální využitelnosti plísňových kultur produkujících pigmenty v krmivářském, farmaceutickém nebo potravinářském průmyslu, je v současné době velmi málo. Při řízené kultivaci mikroskopických hub vzniká souběžně s preferovaným barvivem i plísňová myceliární biomasa, která je také bohatým zdrojem celé řady biologicky aktivních látek.

Plísňovou myceliární biomasu je možno získat z prokvašené plísňové kultury oddělením na kalolisu nebo separací na odstředivce. Izolovaná myceliární biomasa obsahuje, vedle významného množství vlákniny, také významné množství proteinů, vitaminů, minerálních látek a některých imunostimulačních faktorů.

5

Praktické využití samotné plísňové myceliární biomasy je zatím popsáno jen velmi ojediněle. V literatuře se uvádí využití této mykoproteinové biomasy v krmivářství jako suplement proteinů a vitaminů pod názvem „Terlikin“ (bílkovinitaminový preparát získaný z biomasy naprodukované na odpadních produktech při zpracování brambor). V potravinářství tvoří mykoproteinová biomasa základ řady výrobků, které nabízí řetězce supermarketů Sainsbury ve Velké Británii pod názvem „Sainsbury's Quorn“ (např. Sainsbury's Quorn pie, Quorn Swedish style balls).

Velmi perspektivní se ukazuje využití plísňové myceliární biomasy k izolaci glukanu (Kyanko, M.V., Canel, R.S., Ludemann V., Pose G., Wagner J.R.: β -Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Microbiology* (49), 1, 2013, 41-45; Park H.S., Yu Y.M., Lee M.K., Maeng P.J., Kim S.C., Yu J.H.: Velvet-mediated repression of β -glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* spores. *Scientific Reports.*, (5), Article number: 10199 2015). Glukany jsou základem vnitřní struktury buněčných stěn. Tvar a síla buněk závisí na glukanové vrstvě. Čisté glukany mohou být využity jako imunostimulátory při aplikacích v medicíně a veterinárním lékařství, protože podporují produkci monocytů, neutrofilů, kolagenu, elastinu a stimulují makrofágy, aby zvýšily i interleukinovou reakci. Imunostimulačním působením jsou glukany významné zejména pro přezýkavce. Glukany hrají významnou roli i v případě snižování cholesterolu.

25

V patentové literatuře je řada odkazů na použití glukanu v potravinářském průmyslu jako ztužovadel potravin s měkkou strukturou (např. smetanové sýry, náhrady tuků apod.) nebo pro enkapsulaci chuťových látek (Sommer R. (1998): Yeast extract: productions and components. *Food Australia*, (50), č.4, 181-183).

30

Velká pozornost v biotechnologii plísňových kultur je věnována samotné produkci a izolaci naprodukovaných pigmentů, které by mohly být náhradou za používaná syntetická přírodně identická barviva. Množství produkovaného pigmentu v tekutých půdách je možné ovlivňovat výběrem vhodných kultivačních médií, dále vzájemným poměrem obsažených složek nebo přidávkem některých stopových prvků.

35

Produkovaný pigment je možno získávat ze supernatantu mikrofiltrační a dále nanofiltrační technikou ve formě vysoce koncentrovaného stabilního preparátu využitelného v potravinářství nebo ve farmaceutickém průmyslu.

40

V rámci řešení projektu MZe QE0180 ve společnosti VÚPP, v.v.i. „Zpracování a využití odpadního mycelia po výrobě potravinářské kyseliny citronové pro další průmyslové aplikace“ byly hledány způsoby využití odpadního plísňového mycelia *Aspergillus niger* jako cenné suroviny (např. s významným obsahem vlákniny, potravy, glukanu, amylolytických, pektolytických, proteolytických enzymů a kyselých fosfatáz) pro vývoj nových pekařských, ovocných a zeleninových výrobků a významného zdroje chitinu a chitosanu.

45

Složení živné půdy zásadně ovlivňuje získávání výše popsaných dvou základních složek fermentace, tzn. pigmentu a myceliární biomasy. Neexistuje absolutně přímá korelace mezi produkcí plísňové myceliární biomasy a množstvím vytvořeného pigmentového produktu. Nevhodný poměr uhlíkové a dusíkové složky média vede k nadměrné tvorbě biomasy na úkor preferované produkce pigmentové složky.

50

Úkolem vynálezce bylo nalezení vhodné vysokoproteinové přísady do tekuté produkční půdy pro plísňové kultury tak, aby bylo dosaženo omezení produkce nadměrného množství mycelia na

55

úkor produkce pigmentu a zároveň, aby došlo k vyšší efektivitě průběhu kultivačního procesu.

Podstata vynálezu

5

Uvedené nedostatky odstraňuje aminodusíková přísada do živné půdy za účelem zvýšení produkce pigmentů v submerzních kulturách mikroskopických hub a způsob její výroby, podle tohoto vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že počáteční obsah živin v tekutých půdách je 1,0 až 2,0 % hmotn. sacharózy, 0,05 až 0,1 % hmotn. kvasničného extraktu a 0,2 až 1,0 % hmotn. přísady obsahující aminokyselinami fortifikovaný hydrolyzát proteinů s obsahem 10 až 18 % hmotn. amino dusíku.

10

Počáteční poměr obsažených živin v tekutých půdách je udržován na poměru 30 až 150 mg amino dusíku na 1 g vložených sacharidů, přičemž živiny v tomto poměru jsou vloženy na počátku kultivace. Počáteční poměr obsažených živin v tekutých půdách je udržován na poměru 30 až 150 mg amino dusíku na 1 g vložených sacharidů, přičemž tento poměr živin je udržován postupným dávkováním roztoků uhlíkatého zdroje nebo vysokoproteinového hydrolyzátu s upraveným pH na 9,5 až 10 pomocí časového harmonogramu nebo regulačním pH metrem při poklesu pH média. Jako složky živného média jsou využívány vysokoproteinové hydrolyzáty, vyrobené na bázi živočišných, rostlinných nebo mikrobiálních proteinů, dále asimilovatelné sacharidy a mikrodávky kvasničného extraktu. Optimální počáteční poměr uhlíkatých a amino dusíkatých složek živného média je v rozmezí 50 mg až 80 mg amino dusíku na 1 g vloženého sacharidového zdroje. Udržování optimálního poměru živin je zajištěno dávkováním amoniakálního roztoku sacharózy, resp. roztoku vysokoproteinového hydrolyzátu upravených na pH 9,5 až 10. Vhodnými rody mikroorganismů tvořící barevné pigmenty jsou *Talaromyces* nebo *Monascus*.

15

20

25

Vynález si klade za cíl dát k dispozici vysokoproteinovou přísadu do tekutých půd, určenou k optimalizaci technologického postupu s cílem zrychlení a dosažení zvýšení produkce pigmentu v kultivačním médiu.

30

Pro maximální produkci pigmentu, byla provedena úprava poměru základních složek média (tzn. dusíkaté a uhlíkaté) ve prospěch dusíkaté tak, aby počáteční poměr obsahu amino dusíku a uhlíku v kultivačním médiu byl udržován na optimálním poměru minimálně 30 až 80 mg amino dusíku na 1 g vloženého uhlíkatého zdroje. Tohoto optimálního poměru uhlíkatých a dusíkatých látek lze dosáhnout úpravou receptury přípravy půdy s využitím nově zavedeného vysokoproteinového hydrolyzátu, obsahujícího minimálně o 150 % větší množství asimilovatelných amino dusíkatých látek oproti původně používanému kvasničnému zdroji dusíku. Zvýšený obsah dusíkatých látek je v optimálním množství zaveden buď na začátku kultivace, nebo je udržován postupným dávkováním rozdělené celkové uhlíkaté dávky, nebo postupným doplňováním spotřebovaného zdroje amino dusíku. Využívá se k tomu, vedle vlastního analytického stanovení obsahů živin, úprava časového harmonogramu dávkovaných složek nebo dávkování těchto živin pomocí regulačního pH metru. Optimalizovaný kultivační postup zvyšuje rychlost produkce barevného pigmentu, a to při radikálním snížení výrobních nákladů na přípravu produkční živné půdy.

35

40

45

Následující příklady provedení fermentačního procesu, podle vynálezu, pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

5

Vliv dělené dusíkaté složky v živné srovnávací tekuté kontrolní půdě na průběh produkce červeného pigmentu - různý počáteční poměr dusíkaté a uhlíkaté složky.

10 Kultivační pokusy s kmenem *Talaromyces purpurogenus* byly vedeny v Erlenmayerových baňkách s užitečným plněním 500 ml živné půdy na rotační třepačce (100 RPM) při teplotě 29 °C s dobou kultivace 48, resp. 140 hodin. Podmínky srovnávacích pokusů byly nastaveny tak, aby u všech variant kultivačních půd (tzn. E, F, G a kontrolní H) byla vložena na počátku kultivace stejná množství uhlíkatého zdroje (tzn. sacharóza) ve výši 1,8 % hmotn. a různé počáteční dávky dusíkaté složky (kvasničný extrakt) od extrémně nízké dávky 0,1 % hmotn. až po konečnou koncentraci dusíkaté složky 0,6 % hmotn. Po 48 hodinách kultivace byla média E, F a G 15 suplementována dodatečným odstupňovaným množstvím přídatného dusíkatého zdroje až po doplnění na finální koncentraci 0,6 % hmotn. Doplněním této složky bylo vyrovnáno celkové složení živných látek ve všech variantách půd. V průběhu kultivace byl u všech variant ověřován rozdíl v produkci pigmentu a tvorbě plísňové biomasy (Tab. 1). Na základě výsledků bylo 20 konstatováno, že množství počáteční koncentrace dusíkaté složky bylo v přímé korelaci s rychlostí a výtěžností pigmentu (vyjádřeno absorbancí A_{494}). Srovnávací variantu představovala kultivační půda H o složení dle patentu CZ 285 721 B6 určená pro kultivaci mikroskopické houby *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*. Nejvyšší produkce pigmentu v tomto srovnávacím pokusu byla zjištěna ve variantě půdy H s počátečním nejvyšším poměrem složek dusíku a uhlíku 25 34,4 mg dusíku (16,6 mg amino dusíku) na 1 g vložené uhlíkaté složky. Snížení počáteční předlohy dusíku od 5,7 do 22,8 mg na 1 g vložené sacharózy (zdroj uhlíku) negativně ovlivňovala produkci pigmentu. Naproti tomu byla při těchto nižších dusíkatých předlohách zjištěna vyšší produkce myceliární biomasy.

30

Tabulka 1. Sledování vlivu podmínek kultivace mikroskopické houby kmene *Talaromyces purpurogenus* na tekutých půdách s různým obsahem amino dusíkatých živin

Varianty živné půdy	E	F	G	H
Počáteční předloha N-složky média (kvasničný extrakt) (%)	0,1	0,2	0,4	0,6
Počáteční obsah amino dusíku (mg)	5	10	20	30
Počáteční předloha C-složky média (sacharóza) (%)	1,8	1,8	1,8	1,8
Počáteční poměr mg dusíku /1 g sacharózy	5,7	11,4	22,8	34,4
Počáteční obsah mg amino dusíku/1 g sacharózy	2,7	5,5	11,1	16,6
Počáteční refrakce Rf (%)	2,2	2,2	2,4	2,6
Rozdělené dávkování N živin po 48 hodinách – regulace pH metrem nebo dle časového harmonogramu				
Dodatek zbývajících množství N-složky (%)	0,50	0,40	0,20	0
Celkové vložené množství N-složky (%)	0,6	0,6	0,6	0,6
Počáteční pH	6,65	6,22	5,77	5,55
Změna pH po 48 h	6,18	5,97	5,75	5,86

Varianty živné půdy	E	F	G	H
Změna pH po 140 h	6,30	6,38	5,68	6,52
Snížení Rf po 48 h	0,2	0,2	0,4	0,6
Snížení Rf po 140 h	0,6	0,6	0,6	0,6
Dosažená absorbance A ₄₉₄ po 48 h	0,110	0,080	0,123	0,213
Dosažená absorbance A ₄₉₄ po 140 h	0,297	0,413	0,286	1,759
Index A ₄₉₄ /‰ Rf po 48 h	0,555	0,400	0,307	0,355
Index A ₄₉₄ /‰ Rf po 140 h	0,495	0,688	0,476	2,931
Koncentrace biomasy v médiu po 48 h (%)	0,56	0,22	0,32	0,36
Koncentrace biomasy v médiu po 140 h (%)	1,2	0,92	0,52	0,56

Příklad 2

- 5 Vliv dělené uhlíkaté složky v kultivačních půdách na průběh produkce červeného pigmentu – různý počáteční poměr dusíkaté a uhlíkaté složky média.

Kultivační pokusy s kmenem *Talaromyces purpurogenus* byly vedeny v Erlenmayerových baňkách s užitečným plněním 500 ml živné půdy na rotační třepačce (100 RPM) při teplotě 29 °C s dobou kultivace 40, resp. 160 hodin. Významný vliv poměru počáteční dusíkaté složky na vložený uhlíkatý zdroj popsany v příkladu 1 byl potvrzen dalším srovnávacím pokusem, v kterém bylo u všech variant použitých půd vloženo stejné počáteční množství dusíkaté látky (0,6 % hmotn. kvasničného extraktu) a u jednotlivých variant srovnávacího pokusu bylo měněno pouze množství počáteční dávky uhlíkaté složky. Po 40 hodinách byl obsah uhlíkatých látek doplněn na obsah 1,8 % obsahu sacharózy. Srovnávací pokusy potvrdily, že na produkci pigmentu a biomasy má vliv počáteční poměr dusíkaté složky ke zdroji uhlíku (Tab. 2). Srovnávací variantou byla v tomto případě kontrolní půda D, ve které byly veškeré dusíkaté i uhlíkaté živiny přidány na počátku pokusu, což představuje poměr 34 mg dusíku (16 mg amino dusíku) na 1 g vložené sacharózy (zdroj uhlíku). U ostatních variant živných půd se počáteční poměr dusíku na 1 g sacharózy pohyboval v rozmezí 41 až 102 mg. Výsledky analytického šetření po 40 hodinách, resp. 160 hodinách potvrdily významnost tohoto poměru. Nejnižších výsledků, které se týkaly produkce pigmentu, bylo jednoznačně dosaženo ve srovnávacích pokusech s kontrolní variantou půdy D, kdy byla produkce pigmentu po 40 a 160 hodinách nižší o 32, resp. 37 % hmotn. ve srovnání s půdou A. Nižší obsah předlohy dusíkaté složky na 1 g sacharózy měl pozitivní vliv na tvorbu plísňové biomasy, přičemž rozdíl jednotlivých variant byl od 5 do 35 % hmotn. po 40 hodinách a od 4 do 37 % hmotn. po 160 hodinách kultivace. Hodnocení tvorby pigmentu vyjádřené absorbancí a úbytkem refrakce ukazovalo nižší výtěžnost pigmentu na jednotku snížené refrakce (1,43 v kontrolní půdě D vůči 1,72 ve variantě A).

Tabulka 2. Srovnávací kultivační test mikroskopické kultury *Talaromyces* na tekutých půdách s různou počáteční koncentrací C zdroje (sacharóza) a vliv na kultivační parametry (rychlost produkce pigmentu (absorbance A_{494}), produkce biomasy a výtěžnost během kultivace)

5

Varianty půdy	A	B	C	D
Počáteční předloha C-složky média (sacharóza) (%)	0,6	1,0	1,5	1,8
Počáteční předloha N-složky média (kvasničný extrakt) (%)	0,6	0,6	0,6	0,6
Počáteční obsah amino dusíku (mg)	30	30	30	30
Počáteční obsah mg amino dusíku/1 g sacharózy	50	30	20	16
Počáteční refrakce Rf (%)	1,4	1,8	2,4	2,7
Přepokládaná refrakce Rf (%)	2,7	2,7	2,7	2,7
Rozdělené dávkování C živin po 40 hodinách – regulace pH metrem a dle časového harmonogramu				
Dodatek zbývajících množství C-složky (%)	1,2	0,8	0,3	0
Celková vložená C-složka	1,8	1,8	1,8	1,8
Počáteční pH	6,2	6,3	6,2	6,2
Změna pH po 40 h	5,9	5,8	5,9	5,9
Změna pH po 160 h	6,4	6,8	6,3	6,2
Snížení Rf po 40 h	0,4	0,4	0,5	0,4
Snížení Rf po 160 h	1,4	1,3	1,3	1,1
Dosažená absorbance A_{494} po 40 h	0,292	0,306	0,258	0,198
Dosažená absorbance A_{494} po 160 h	2,408	2,312	1,920	1,527
Index $A_{494}/\%$ Rf po 40 h	0,73	0,76	0,51	0,49
Index $A_{494}/\%$ Rf po 160 h	1,72	1,77	1,47	1,43
Koncentrace biomasy v médiu po 40 h (%)	0,24	0,60	0,64	0,60
Koncentrace biomasy v médiu po 160 h (%)	0,48	0,76	0,88	0,92

Příklad 3

- 10 Produkce červeného pigmentu kmenem *Talaromyces purpurogenus* s různým obsahem dusíkatých a uhlíkatých látek v živném médiu.

Výsledky srovnávacích kultivačních pokusů uvedených v příkladu 1 a jejich ověření srovnávacími kultivačními pokusy uvedenými v příkladu 2 zřetelně ukazují na význam počátečního poměru vložených dusíkatých látek na 1 g uhlíkatého zdroje (sacharózy). Na základě těchto poznatků byl navržen a připraven nový typ kultivační půdy s využitím jiného dusíkatého zdroje (aminokyselinami fortifikovaný proteinový hydrolyzát), který má nesrovnatelně vyšší množství obsaženého aminodusíku (AN) v biomase (16 % hmotn.). Navíc proteinový hydrolyzát použitý v daném množství je ekonomicky mnohem výhodnější než kvasničný autolyzát.

15 V receptuře nové živné půdy bylo zároveň rovněž sníženo celkové množství sacharidického zdroje živin až na 1 % hmotn. a minimalizován přírůstek kvasničného extraktu. Význam dusíkaté složky při tomto složení nového média ukazuje Tabulka 3 s variantami živných půd C1 až C4 obsahující různé množství počátečního vloženého proteinového hydrolyzátu (0,3 až 0,5 %

20

hmotn.) a kvasničného extraktu (0,02 až 0,05 % hmotn). Srovnávací půdou byla v těchto případech standardizovaná komerční půda obsahující na počátku 1,8 % hmotn. sacharózy a 0,6 % hmotn. kvasničného extraktu odpovídající poměru živin 34 mg dusíku na 1 g vložené sacharózy. Poměr dusíkatých živin na 1 g sacharózy u nových variant navrhovaných půd C1 až C4 byl
 5 zvýšen a pohyboval se v rozmezí 48 až 80 mg dusíku na 1 g sacharózy oproti nákladnější kontrolní půdě obsahující 1,8 % hmotn. sacharózy a 0,6 % hmotn. kvasničného extraktu. Měřítkem efektivnosti nově připravených živných půd byla rychlost produkce pigmentu vyjádřená měřením absorbance při vlnové délce 494 nm. Výsledky získané v časových
 10 kultivačních intervalech 24, 48 a 120 hod. potvrdily jednoznačný pozitivní vliv na rychlost produkce a výtěžnost pigmentu. Ve všech variantách nově navrhované půdy obsahující různá množství dusíkatých látek od 48 do 80 mg dusíku na 1 g sacharózy bylo nalezeno významnější množství naprodukovaného pigmentu. Tento rozdíl byl nejvýraznější po 120 hodinách u varianty nově navrhované živné půdy C1 až C4 zahrnující 1 % hmotn. sacharózy, 0,5 % hmotn. přísady
 15 obsahující aminokyselinami fortifikovaný hydrolyzát želatiny a s přídavkem 0,05 % hmotn. kvasničného extraktu. Aminokyselinami fortifikovaná přísada byla připravená následujícím způsobem:

Základem aminodusíkové přísady je roztok hydrolyzátu želatiny. Do 1000 ml vody se přidá
 20 200 g hydrolyzátu želatiny, dále 50 g kyseliny glutamové a 5 g kyseliny asparagové a po úpravě čpavkovou vodou na pH 11 se směs zahřeje na 105 °C po dobu 1 hodiny. Během této tepelné inkubace dochází k vyššímu uvolnění peptidových vazeb mezi aminokyselinami a také ke sterilaci. Zvýšená hodnota pH roztoku přísady může být využita během kultivace pro průběžné
 dávkování živin během kultivace. Změny pH kultivační půdy během růstu zajišťují tímto
 25 dávkováním kompletní doplňování všech živin. Příslušné množství roztoku aminokyselinami fortifikovaného hydrolyzátu želatiny je dávkováno do fermentační půdy tak, aby konečná koncentrace v půdě byla 0,3 nebo 0,5 % hmotn. Z analytických výsledků rovněž vyplývá, že kontrolní půda pro svůj vysoký obsah růstových látek významně stimuluje hlavně tvorbu myceliární biomasy na úkor produkce pigmentu. Naprodukované množství biomasy v kontrolní
 30 půdě po 120 hodinách bylo 0,76 % hmotn. Hodnoty obsahu biomasy ve srovnávacích pokusných variantách na nové půdě se pohybovaly pouze v rozmezí 0,28 až 0,36 % hmotn. sušiny.

Tabulka 3. Srovnávací kultivační test kultury mikroskopické houby *Talaromyces* na tekutých
 35 půdách v Erlenmayerových baňkách s obsahem 500 ml média (kultivace na rotační třepačce 100 RPM, 30 °C): sledování vlivu obsahu dusíkatého zdroje (hydrolyzát želatiny fortifikovaný aminokyselinami a kvasničný autolyzát) na kultivační parametry (rychlost produkce pigmentu, absorbance A a produkce biomasy) a porovnání kultivačních výsledků na optimalizovaných půdách (C1 až C4) s výsledky kultivačních postupů na kontrolní komerční živné půdě.

	Složení původní živné půdy *	Složení inovované živné půdy obsahující přísadu fortifikovanou aminokyselinami			
Médium	Kontrolní půda	C1	C2	C3	C4
Složení média	Sacharóza 1,8%	Fortifikovaný hydrolyzát želatiny 0,3%	Fortifikovaný hydrolyzát želatiny 0,3%	Fortifikovaný hydrolyzát želatiny 0,5%	Fortifikovaný hydrolyzát želatiny 0,5%
	Kvasničný autolyzát 0,6%	Sacharóza 1% Kvasničný autolyzát 0,02%	Sacharóza 1% Kvasničný autolyzát 0,05%	Sacharóza 1% Kvasničný autolyzát 0,02%	Sacharóza 1% Kvasničný autolyzát 0,05%

	Složení původní živné půdy *	Složení inovované živné půdy obsahující přísadu fortifikovanou aminokyselinami			
Médium	Kontrolní půda	C1	C2	C3	C4
Poměr živin mg dusíku/l g sacharózy	34	48	48	80	80
Počáteční Rf %	2,5	1,5	1,5	1,7	1,7
Počáteční pH	5,91	6,28	6,28	6,23	6,19
0-24 h kultivace					
A ₄₉₄	0,534	4,302	3,816	4,058	3,374
Rf %	2,3	1,5	1,5	1,6	1,6
pH	6,08	6,18	6,29	6,31	6,28
Přírůstek A v čas. intervalu	0,534	4,302	3,816	4,058	3,374
0-48 h kultivace					
A ₄₉₄	4,856	14,480	14,046	14,796	14,784
Rf %	2,0	1,3	1,3	1,3	1,3
pH	6,35	5,82	5,45	5,47	5,38
Přírůstek A v čas. intervalu	4,322	10,178	10,230	10,216	11,410
0-120 h kultivace					
A ₄₉₄	18,466	23,370	27,072	32,329	38,597
Rf %	0,9	0,4	0,6	0,5	0,6
pH	5,87	4,71	4,40	4,50	4,64
Přírůstek A v čas. intervalu	13,610	8,890	13,026	17,533	13,813
Produkce biomasy (sušina, 120 hodin) (%)	0,76	0,28	0,34	0,30	0,36
Rf %	2,5-0,9	1,5-0,4	1,7-0,6	1,7-0,5	1,7-0,6
Pokles o % Rf	1,6	1,1	0,9	1,2	1,1
**A ₄₉₄ /1% Rf	11,53	21,2	30,0	26,9	35,1

Pozn. * patenty č. CZ 302 696 B6, CZ 285 721 B6, **pokles A₄₉₄ připadající na snížení 1% refrakce média

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Přísada do živné půdy pro zvýšenou produkci pigmentů mikroskopických hub, **vyznačující se tím**, že obsahuje aminokyselinami fortifikovaný hydrolyzát proteinů s obsahem 12,1 až 18 % hmotn. amino dusíku.
- 10 2. Způsob zvýšení produkce pigmentů pomocí přísady podle nároku 1, kdy v původním růstovém médiu kultury mikroskopické houby je obsaženo 16 mg amino dusíku na 1 g vložené sacharózy, **vyznačující se tím**, že toto počáteční množství obsažených dusíkatých a uhlíkatých živin v růstovém médiu je zvýšeno na poměr 30 až 80 mg amino dusíku na 1 g vložené sacharózy, přičemž živiny v tomto poměru jsou vloženy na počátku kultivace.