



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 19 04 78
(21) PV 2518 - 78

(40) Zveřejněno 31 12 79
(45) Vydáno 15 01 83

200 377

(11) (B 1)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/00

(75)

Autor vynálezu CHALOUPKA JIŘÍ RNDr.CSc.,PRAHA
OBDRŽÁLEK VLASTIMIL MUDr.CSc.,BRNO a
HYLMAR BOHUMIL ing.,PRAHA

(54) Způsob výroby exocelulárních enzymů

1

Vynález se týká způsobu výroby exocelulárních enzymů pomocí vhodných kmenů bakterií a aktinomycet.

Dosavadní způsoby výroby exocelulárních enzymů spočívaly v tom, že vhodné kultury bakterií nebo jiných mikroorganismů byly kultivovány 24 až 72 hodin nebo i déle ve složitých kultivačních médiích. Během růstu nebo po jeho skončení produkovaly tyto mikroorganismy do prostředí enzymy. Uvedený postup má nevýhody v tom, že produkce enzymů je jednorázová, že během dlouhé doby kultivace trvající 24 až 72 hodin je část enzymů inaktivována a že jejich purifikace je ztížena přítomností balastních látek v mediu (US patent 3,345.269, US patent 3,748.233, US patent 3,127.327).

Tyto nevýhody odstraňuje způsob výroby exocelulárních enzymů podle vynálezu, jehož podstatou je, že kultura mikroorganismů, s výhodou *Bacillus megaterium* nebo *Streptomyces Griseus*, vytvořená v průběhu výroby enzymů, nebo vyprodukovaná za jiným účelem, například pro tvorbu bílkovin, vitaminů nebo antibiotik, se po skončení původní fermentace oddělí od převážné části živné půdy a potom se inkubuje ve vodě, ve zředěném roztoku soli, nebo zředěném roztoku organických živin, popřípadě roztoku dalších látek potřebných pro tvorbu enzymu, po dobu 10 minut až 24 hodin načež se mikroorganismy od tekutého prostředí oddělí a vytvářený enzym nebo enzymy se buď dále purifikují nebo ponechají v supernatantu a zpracují ovyklým způsobem, například sušením. Oddělení mikroorganismů od tekutého média a jejich následné

inkubace ve vodě, ve zředěném roztoku solí nebo zředěném roztoku organických živin, popřípadě roztoku dalších látek potřebných pro tvorbu enzymu se mohou několikrát za sebou opakovat.

Protože velká část exocelulárních enzymů je kontrolována represi, dojde za těchto podmínek k jejich intenzivní tvorbě. Pokud se jedná o induktivní enzymy, přidá se do prostředí příslušný induktor. Mikroorganismy za těchto podmínek využívají k produkci enzymů aminokyseliny a dalších látek uvolněných ze svých makromolekul v průběhu jejich turnover, zbytků živin přinesených spolu s biomasou z předcházejícího kultivačního média, nebo živin dodaných v resuspenzním médiu.

Resuspendovaná kultura se inkubuje za vhodné teploty, například od 25 do 45 °C, při pH 6 až 8,5 a za aerace po dobu 10 minut až 24 hodin. Jakmile aktivita enzymu v prostředí dosáhne žádané velikosti, mikrobiální biomasa se od prostředí opět oddělí. Tento postup lze několikrát opakovat.

Výhody tohoto způsobu výroby proti dosavadnímu jsou zejména:

- a) Opakované použití již vyrostlé biomasy
- b) Úspora živin při následné fermentaci, protože tato může probíhat v chudém médiu, popřípadě i v čisté vodě, neboť odstředěná biomasa obsahuje dostatek živin i pro další následné fermentace enzymu.
- c) Zkrácení inkubační doby třikrát až více než stokrát.
- d) Zjednodušení purifikace, protože médium použité při následné produkci enzymu neobsahuje balastní látky buď vůbec, nebo jen v nepatrném množství.

Dále jsou uvedeny příklady výroby exocelulárních enzymů dvou typů proteáz - aniž se však předmět vynálezu omezuje pouze na tyto typy enzymů, nebo na použité mikroorganismy.

Příklad 1

Vyrostlé mycelium *Streptomyces griseus* bylo po skončení laboratorní fermentace antibiotika odstředěno, jednou promyto vodou a resuspendováno ve vodě obsahující 2,5 mM CaCl_2 na hustotu odpovídající 4,8 mg sušiny/m. 40 m suspenze bylo indukováno na třepacím stroji v 500 m varné baňce 24 hodin při 28 °C. Proteolytická aktivita byla stanovována Ansonovou metodou (Anson, M.L., J. General. Physiol., 22, 79, 1938) v supernatantě po odstředění mycelia a je vyjadřována v tyrosinových jednotkách - TU/m.

Proteolytická aktivita po 24 hodinách odpovídala 0,394 TU/m.

Příklad 2

Mycelium *Streptomyces griseus* připravené podle příkladu 1) bylo resuspendováno na hustotu odpovídající 4,8 mg sušiny / m v roztoku obsahujícím 0,2 % peptonu, 0,2 % glukózy a CaCl_2 2,5 mM o pH 7,5. 40 m suspenze bylo inkubováno na třepacím stroji v 500 m varné baňce 24 hodin při 28 °C. Proteolytická aktivita byla stanovována Ansonovou metodou po 5 a 24 hodinách. 1 m supernatantu vzorku odebraného po 5. hodinách obsahoval 0,087 TU, po 24 hodinách 0,900 TU.

Příklad 3

Vyrostlá kultura asporogenní varianty *Bacillus megaterium* KM vyprodukovaná jako zdroj bílkovin, se po skončení kultivace oddělila od média centrifugací a desiment byl resuspendo-

vám na hustotu 2,5 až 2,7 mg sušiny / m v bezdusíkovém médiu následujícího složení :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1,5 %, KH_2PO_4 0,3 %, NaCl 0,3 %, bezvodý Na_2SO_4 0,0125 %, MgCl_2 0,08 %, CaCl_2 0,011 %, glukóza 0,5 % o pH 7,5 . Inkubace 50 m kultury probíhala v 500 Erlenmayerových baňkách na třepacím stroji při 35 ° C 1 hodinu. Potom byla kultura odstředěna a v supernatantu byla stanovována proteolytická aktivita s azokaseinem jako substrátem (Charney J ., Tomarelli R.M. : J.Biol.Chem. 171 : 50, 1947 . Jedna jednotka - j.odpovídá 1 μg substrátu rozštěpeného za 1 minutu při 37 ° C .

Suspenze *Bacillus megaterium* vytvořila za uvedených podmínek za 30 minut enzym o aktivitě odpovídající 66,0 jednotek neutrální metaloproteázy / m .

Příklad 4

Suspenze *Bacillus megaterium* KM vyrostlá a zpracována, jak je uvedeno v příkladu 3 byla inkubována v médiu popsaném v příkladu 3, ale doplněném NaNO_3 na koncentraci 0,4 %. Inkubace probíhala za podmínek uvedených v příkladu 3 30 minut. Potom byla kultura odstředěna a opět resuspendována v čerstvém médiu téhož složení. Resuspendovaná kultura byla třepána dalších 30 minut. Tento postup byl třikrát opakován. Supernatanty byly uchovány odděleně a byla v nich uvedeným způsobem stanovena proteolytická aktivita.

Aktivita po prvním přenosu	44, 5 j.neutrální metaloproteázy / m
druhém	37,2 j .
třetím	36,3 j .
čtvrtém	38,5 j .

Příklad 5

Kultura *Bacillus megaterium* vyrostlá v syrovátce jako zdroj bílkovin byla po skončení kultivací odstředěna a resuspendována v 1 litru roztoku obsahujícího 0,5 % NaCl , 0,001 % MgCl_2 , 0,022 % CaCl_2 a 0,5 % glukózy. Hustota suspenze bakteriální kultury odpovídala 20 mg sušiny / m , pH prostředí bylo 7,0 . Inkubace probíhala v laboratorním tanku při 30 ° C při vzdušnění 1 vzduchu / l média za 1 minutu a míchání 600 otáček za 1 minutu . Inkubace trvala 40 minut. Potom byla suspenze buněk odstředěna a v supernatantě stanovena proteolytická aktivita Ansonovou metodou. Aktivita neutrální metaloproteázy v 1 m odpovídala 2,00 TU .

Příklad 6

Kultura *Bacillus megaterium* vyrostlá jak je uvedeno v příkladě 5) byla resuspendována na hustotu 20 mg sušiny / m v 1 média složeného z 9.dílů roztoku uvedeného v příkladu 5) , z něhož byla vypuštěna glukóza a jednoho dílu supernatantu vzniklého ze syrovátkového média po odstředění buněk po skončení původní kultivace. Inkubace probíhala 20 minut za podmínek uvedených v příkladu 5 . Proteolytická aktivita v 1 m supernatantu stanovená podle Ansona odpovídala 1,42 TU.

Proteolytické enzymy jsou využitelné zejména v koželužství, při výrobě pracích prášků a v potravinářském průmyslu, zejména mlékárenském při výrobě sýrů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby exocelulárních enzymů, vyznačený tím, že kultura mikroorganismů, s vý-
hodou *Bacillus megaterium* nebo *Streptomyces griseus*, vytvořená v průběhu výroby enzymů, nebo
vyprodukovaná za jiným účelem, například pro tvorbu bílkovin, vitaminů nebo antibiotik, se
po skončení původní fermentace oddělí od převážné části živné půdy a potom se inkubuje ve
vodě, ve zředěném roztoku solí, nebo zředěném roztoku organických živin, popřípadě dalších
látek potřebných pro tvorbu enzymu, po dobu 10 minut až 24 hodin načež se mikroorganismy od
tekutého prostředí oddělí a vytvořený enzym nebo enzymy se buď dále purifikují nebo ponecha-
jí v supernatantu a zpracují obvyklým způsobem, například sušením.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že oddělení mikroorganismů od tekutého média a
jejich inkubace ve vodě, ve zředěném roztoku solí, nebo zředěném roztoku organických živin,
případně roztoku dalších látek potřebných pro tvorbu enzymu se několikrát za sebou opakují.