

Bakteriální amylolytické preparáty jako náhrada textilních sladových výtažků

OLGA BENDOŤÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

663.478.002.6

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský v Praze byl pověřen úkolem vyřešit problém výroby enzymových preparátů, které by mohly nahradit textilní sladové výtažky, k jejichž výrobě se spotřebuje značné množství hodnotného diastatického sladu.

Sladových výtažků používá textilní praxe v odšlichtovací procesu, jehož účelem je rozložit škrob tzv. škrobové šlichty. Touto šlichtou se napouštějí před tkaním osnovní nitě, aby byly dostatečně pevné a přitom hladké a ohebné, takže mohou lépe odolávat mechanickému namáhání na tkalcovských stavech. Před dalším zpracováním tkaniny, tj. před bělením, barvením a potiskováním, je třeba šlichtu co nejdokonaleji odstranit, aby osnovní nitě nepřijímaly zušlechťovací činidla jinak než nitě útkové. K odšlichtování se dnes u nás běžně používá preparátů sladových nebo pankreatických; v zahraničí se však v tomto procesu velmi dobře osvědčily přípravky, založené na účinku amyláz bakteriálního původu, jako je např. švýcarský preparát Bactolase.

Protože enzymy v bakteriálních přípravcích mají vysokou účinnost a jsou značně odolné k teplu, lze takových přípravků používat při kontinuálním odšlichtování, při němž se tkanina, napuštěná enzymovým roztokem (lázní), protahuje krátkodobě komorou, vyhřívanou na teplotu 90–100 °C. Tomuto procesu při uvedené teplotě nemohou svými vlastnostmi vyhovovat ani sladové ani pankreatické nebo plísňové amylázy.

Ačkoliv nám bylo známo, že textilní průmysl by měl spíše zájem o amylolytické přípravky bakteriálního původu pro jejich výhodnější vlastnosti, zahájili jsme řešení úkolu zkoumáním možnosti a podmínek výroby plísňových amyláz. Bylo to proto, že pro studium bakteriálních amyláz bylo třeba nejprve vypěstovat produkční kmen, kdežto vhodné plísňové kmeny jsme získali od Biologické fakulty KU a Výzkumného ústavu kvasného průmyslu. Vyzkoušeli jsme kultivaci vybraného kmene na různých odpadních materiálech, a to především na pivovarských, v první řadě na sladovém mlátě. Byl sledován rovněž i účinek různých přísad k mlátu, jako např. kvasničného autolysátu, sladového květu, zadního ječmene apod. Pokusy jsme prováděli i poloproduzem na lískovém zařízení ve výrobě pektinolytických enzymů v závodě Brněnská Fruta, n. p. v Modřicích.

Během této doby se nám podařilo izolovat na substrátu z pšeničných otrub *bakteriální kmen* (po-

dle *Bergeyova* klíče *Bac. subtilis*), který ve srovnání s plísňovými kulturami se vyznačoval vysokou produkcí amyláz při stacionární i submersní kultivaci. S tímto bakteriálním kmenem jsme nyní mohli přistoupit ke zkoumání podmínek výroby bakteriálních amylolytických enzymů a způsobu úpravy preparátů.

V tomto směru nebylo možno použít prakticky žádné zkušenosti mimo údaje zahraniční literatury, která o technologickém postupu výroby a úpravy bakteriálních amylolytických přípravků podává pouze kusé zprávy.

Abychom vyhověli požadavku využít pivovarských odpadních materiálů, rozhodli jsme se v první etapě práce vyzkoušet produkci amyláz ve stacionárních kulturách na sladovém mlátě, které představuje pro uvedené mikroorganismy bohatý zdroj živných látek. Nebylo třeba upravovat jeho pH, protože ve zkoumaném rozmezí pH 5,0 až 7,5 nebyly zjištěny prakticky žádné rozdíly. Tvorba enzymů byla skončena za 48 hodin kultivace při teplotě 30 °C. Zvýšení teploty na 37 °C nevedlo k vyššímu obsahu enzymů v kultuře. Během kultivační doby došlo vždy postupně k podstatnému zvýšení pH kultury (*tab. 1*).

Ukázalo se, že produkce amyláz závisí na výšce vrstvy mláta. Nejlepší výsledky byly u kultur

Tabulka 1

Závislost obsahu enzymů na teplotě

Kultivační teplota °C	Doba kultivace h	Amylolytická aktivita min *)	pH po skončené kultivaci
25	24	negativní	5,15
	48	60	5,9
	72	33	6,9
30	24	100	5,1
	48	18	8,1
	72	16	8,65
37	24	80	5,3
	48	18	8,1
	72	23	8,9
45	24	negativní	6,7
	48	negativní	8,3
	72	negativní	8,55

*) Amylolytická aktivita byla měřena tzv. Wohlgemutovou reakcí, upravenou podle původní metody Wohlgemutovy (Tauber 1950). Je založena na měření doby potřebné k dosažení achroického bodu při reakci 10 ml 2%ního škrobového roztoku s acetátovým ústojem o pH 6,2, hydrolyzovaného působením 1,0 ml enzymového roztoku při 30 °C, se standardním roztokem jodu. Zvyšující se doba dosažení achroického bodu indikuje nižší obsah enzymů. Rozdílu do 5 min nepřikládáme podstatný význam.

s vrstvou nejvýše 5–6 cm vysokou, neboť ve vyšších vrstvách se tvořilo úměrně méně amyláz zřejmě vlivem nedostatku vzdušného kyslíku.

Tabulka 2

Závislost obsahu enzymů na výšce vrstvy

Výška vrstvy mláta cm	Amylolytická aktivita dvoudenní kultury při 30° min
3,5	17
6,0	22
8,5	28
11,0	45
13,0	45

Jako rozhodující činitel pro tvorbu amyláz se však projevila jakost sladového mláta. Netýkala se běžných odchylek v jeho složení, nýbrž jeho stavu, bylo-li čerstvé a sterilní. Jakmile obě podmínky nebyly dodrženy, projevila se tato skutečnost na produkci amyláz negativně, neboť zde působil růst a metabolity cizích mikroorganismů. S těmito potížemi jsme se setkali při provádění pokusů ve větším rozsahu mimo rámec laboratoře. Po těchto zkušenostech jsme se rozhodli přejít od povrchového kultivačního způsobu ke kultivaci submersní na sterilním prostředí, která — jak se ukázalo — poskytuje vyšší výtěžky enzymu.

První pokusy tohoto druhu byly konány s kulturami získanými na třepačce na sterilním substrátě, jehož základem byla tekutina, vylisovaná z mláta s přísadou autolysátu, připravovaného vždy po dobu 20 hodin autolysou pivovarských kvasnic při 50 °C. Hodnoty pH media se pohybovaly mezi 5,5 až 5,95. Substrát byl zaočkován kulturou kmene, vedenou v bujónu. Během kultivační doby 24 hodin došlo k nahromadění amyláz, jejichž množství se dále nezvyšovalo. Tvorba amyláz však závisela na složení substrátu, pokud šlo o obsah celkového a formolového dusíku a redukujících látek. Pro názornost uvádíme tab. 3 a 4. Amylolytická aktivita byla měřena Wohlgemutovou reakcí s použitím pouze polovičního množství enzymové tekutiny, tj. 0,5 ml, vzhledem k podstatně vyšší produkci amylolytických enzymů při submersní kultivaci.

Z tabulek lze vyčíst, že uspokojivé množství enzymů se vytváří již na substrátě, jehož složení odpovídá vzorku č. 2 (tab. 3) a že koncentrace redukujících látek je vyhovující kolem 300 g maltosy a tomu odpovídajícího množství redukujících látek po hydrolyse. Zkoušky prokázaly, že zvyšování obsahu těchto látek nemá pro produkci amyláz praktický význam. Naproti tomu je třeba zdůraznit podstatný vliv kvasničného autolysátu na jejich tvorbu, což dokazuje i vzorek č. 1 (tab. 4), kde došlo k vytvoření amyláz pouze na zředěném kvasničném autolysátu, který byl zdrojem dusíkatých i uhlíkatých živin. Je rovněž zajímavé, že náš kmen produkuje amylázy i na médiu bez škrobu, jehož pří-

tomnost považují někteří autoři za bezpodmínečně nutnou.

Na pokusy prováděné na třepačce navázaly pak pokusné kultivace v laboratorním fermentačním tanku o obsahu 20 l. Přístroj, jehož podrobný popis byl již v našem časopise uveřejněn [Kvasný průmysl 4, 275 (1958)], byl nám zapůjčen Výzkumným ústavem antibiotik. Místo tekutiny z mláta začali jsme v těchto pokusech používat poslední výstřelkové vody z vyslazování mláta při scezování sladiny. Tento materiál, který pro daný účel obsahuje ještě dostatečné množství živin, poskytuje v kombinaci s kvasničným autolysátem ekonomicky výhodnější substrát. Při pokusné výrobě v laboratorním fermentačním tanku se zjišťují především optimální poměry aerace, míchání substrátu, podmínky přípravy inokula, odpěňování během kultivace a doba potřebná k maximálnímu nahromadění enzymu. V současné době se konají první poloprovozní zkoušky, podle nichž má být definitivně stanoven technologický postup výroby.

Kromě podmínek, za kterých se vytváří maximální množství amyláz v kultuře, je však třeba navrhnout i vhodný způsob konečné úpravy produktu, aby dodávaný přípravek svými vlastnostmi co nejvíce odpovídal renomovaným zahraničním výrobkům, a to především dostatečným odšlichtovacím účinkem, dobrou trvanlivostí a odolností vůči vyšším teplotám. Vyzkoušeli jsme postup, při kterém se fermentační tekutina nejprve zahustí ve vakuu, pak se k ní přidá látka pro zvýšení tepelné odolnosti enzymů, načež se preparát s přísadou vhodného pojidla vysuší a jemně rozeleme. Odšlichtovací účinek vyrobených preparátů byl vyzkoušen v pobočce Výzkumného ústavu zušlechťovacího v Liberci. Zkoušky potvrdily, že naše preparáty svým odšlichtovacím účinkem nahrazují textilní sladový výtažek i zahraniční bakteriální preparát.

V budoucnu půjde ještě o to vyrobit po náležitém bližším prozkoumání vlastností bakteriální amylázy i takové preparáty, které by své uplatnění neomezily pouze na textilní účely.

Je třeba si uvědomit, že vyřešení předloženého problému má také značný význam ekonomický, neboť zavedení výroby bakteriálních amyláz znamená úsporu 300 t vysoce hodnotného diastatického sladu ročně.

Autorka děkuje za pomoc při řešení problému, kterou jí ochotně poskytli s. inž. Jaromír Šlechta a spolupracovníci z Výzkumného ústavu antibiotik v Praze, s. Josef Slezák a spolupracovníci z pobočky Výzkumného ústavu zušlechťovacího v Liberci a s. Věra Pavlíková z VÚPS technickou spoluprací.

Tabulka 3

Závislost tvorby amyláz na koncentraci dusíkatých látek

Číslo vzorku	Dusík		Redukující látky		Amylolytická aktivita min	Počet buněk po kultivaci mil.	pH před kultivací	pH po kultivaci
	celkový	formolový	před hydro- lysou (maltosa)	po hydro- lyse (glukosa)				
	mg/100 ml		mg/100 ml					
1	42,8	12,3	361,0	691,6	43	638	5,6	6,5
2	66,1	21,7	361,0	691,6	15	828	5,6	7,1
3	89,6	31,2	361,0	691,6	12	929	5,6	7,9
4	113,5	40,6	361,0	691,6	7	1260	5,6	7,6
5	136,7	50,2	361,0	691,6	7	1305	5,6	7,7

Závislost tvorby amyláz na koncentraci redukujících látek

Tabulka 4

Číslo vzorku	Dusík		Redukující látky		Amylyolytická aktivita min	Počet buněk po kultivaci mil.	pH před kultivací	pH po kultivaci
	celkový	formelový	před hydrolysou (maltosa)	po hydrolyse (glukosa)				
	mg/100 ml		mg /100 ml					
1	71,8	27,7	0	0	46	152	5,95	8,2
2	76,5	28,5	98,7	128,0	26	349	5,95	8,4
3	80,9	29,2	190,9	247,4	23	593	5,95	8,2
4	85,7	29,9	289,6	375,4	19	817	5,95	7,9
5	90,1	30,6	381,5	494,9	16	786	5,95	7,9

Závěr

Byl popsán postup přípravy bakteriálních amylolytických preparátů, pěstovaných na dosud nevyužitých vedlejších produktech pivovarského průmyslu. Náhradou textilních sladových výtažků těmito preparáty se ušetří ročně 300 t diastatického sladu.

Literatura

- Beckord L. D., Kneen E.: Bacterial Amylases. Production on Wheat Bran. Ind. Eng. Chem. 37, 692 (1945)
Beckord L. D., Kneen E.: Bacterial Amylases. Production on Thin Stillage. Ind. Eng. Chem. 38, 232 (1946)
Fukumoto J.: Studies on Bacterial Amylase. J. Agr. Chem. Soc. Japan 19, 487 (1943)
Fukuoka K.: Bacterial Amylase. J. Fermentation Technology (Japan) 28, 241 (1950)

- Hoogerheide J. C.: Biochemische Gewinnung von stärke- und eiweissabbauenden Enzymen. US Pat. 2 549 465 (1948)
Imšéněckij A. A., Solnceva: Mikrobiologija 13, 54 (1944)
Lulla B. S., Subrahmanyam V.: Influence of Culture Media on the Development of Bacterial Amylase. J. Sci. and Ind. Research (India) (1954), 410
Nakanishi K., Murata I.: Bacterial Amylase. Ann. Rept. Takamine Lab. 5, 32 (1953)
Nishitai J., Mugibayashi N.: Hydrolytic Enzymes of Bacteria. Science Repts. Hyogo Univ. Agr., Ser. Agr. Chem. 1, 39 (1954)
Schultz A., Atkin L.: Preparation of an Enzymic Material. US Pat. 2 159 678 (1939)
Terni G., Fujihara H.: Bacillus hydrolyticus and its Amylase Production by Submerged Culture. J. Ferment. Technol. (Japan) 26, 147 (1948)
Waldmann R.: Process for Producing Enzymes by the Cultivation of Microorganisms on Nitrogen and Carbohydrate-containing Mash. US Pat. 2 362 079 (1942)
Wallerstein L.: Enzyme Preparations from Microorganisms. Commercial Production and Industrial Application. Ind. Eng. Chem. 31, 1218 (1939)
Strong H.: Starch-fermenting Enzyme. Jap. Pat. 175 990 (1948)
Tauber H.: The Chemistry and Technology of Enzymes, 1950

Došlo do redakce 15. 12. 1959.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ АМИЛОЛИТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ В КАЧЕСТВЕ ЗАМЕНИТЕЛЕЙ СОЛОДОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ПРИМЕНЯЕМЫХ В ТЕКСТИЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

В статье рассматривается метод изготовления бактериальных амилолитических препаратов с использованием в качестве культивационной среды побочных продуктов пивоваренной промышленности, которые до настоящего времени не утилизируются. Замещение солодовых экстрактов потребляемых текстильной промышленностью амилолитическими препаратами дает экономию выражающуюся количеством 300 тонн диастатического солода в год.

BAKTERIELLE AMYLOLYTISCHE PRÄPARATE ALS ERSATZ DER MALZEXTRAKTE FÜR DIE TEXTILINDUSTRIE

Es wird das Verfahren zur Herstellung bakterieller amyolytischer Präparate beschrieben. Als Substrat zur Kultivierung des Produktionsstammes werden bisher nicht ausgenützte Nebenprodukte der Brauindustrie verwendet. Anhand des Ersatzes der Malzextrakte für Entschlichtungszwecke durch das bakterielle Präparat wird man jährlich 300 t diastatischer Malze ersparen.

BACTERIAL AMYLOLYTIC PRODUCTS AS SUBSTITUTES FOR MALT EXTRACTS USED BY TEXTILE INDUSTRY

The article deals with the method of preparing amyolytic bacterial products based on using as a nutritive medium such by-products of brewing industry, which so far have not been utilized. Substitution of malt extracts by these amyolytic products results in saving every year 300 tons of diastatic malt.

Časopis PRŮMYSL POTRAVIN přináší ve třetím čísle články:

- B. Vaněk, J. Hrubý: Patnáct let mrazírenského průmyslu v ČSR
S. Svoboda, M. Fiala: Průmyslové brambory, jejich škrobnatost a cena
Z. Dvořák: Využití odpadu masného průmyslu jako bílkovinného krmiva
J. Šulc: Perspektivy budoucího zužitkování mléka
F. Grulich: Gradovna a sladkovodní chlazení v mlékárně

- J. Stritzko, L. Šilhánková: Ochrana džemů před povrchovým plesnivěním
J. Zvoníček, V. Ulrych, B. Potůček: Paletizace v mražnách
V. Šašek: Automatizace lisovacích prací v potravinářském průmyslu
V. Krumphanzl: Provozní praxe posluchačů fakulty potravinářské technologie

Pravidelný odběr našeho časopisu si zajistíte zasláním přihlášky na adresu

POŠTOVNÍ NOVINOVÝ ÚŘAD
ústřední administrace časopisů

Praha 3, Jindřišská ul. 14

Tamtéž obdržíte i starší čísla časopisu, pokud máte o ně zvláštní zájem nebo vám chybí do úplného ročníku.

Objednávky časopisu vám zprostředkuje také místní poštovní úřad.