

Výzkum výroby bakteriálních amylolytických preparátů byl veden snahou nahradit textilní sladové výtažky, jejichž potřebu v textilním průmyslu k odšlichtování tkanin nemůže sladařský sektor uspokojovat pro nedostačující kapacitu svých výtažkáren. Další snahou je pak úspora sladů, již by se dosáhlo zavedením této výroby, úspora devis za dovoz odšlichtovacích preparátů, jimiž se zčásti kryje nedostatek tuzemských přípravků a v neposlední řadě pak i možnost dodat textilnímu průmyslu požadované účinnější výrobky. V zahraničí se výzkum a výroba enzymatických přípravků pro tento účel zaměřuje především na amylázy bakteriálního původu, které se pro svou vysokou účinnost a odolnost vůči vyšším teplotám velmi dobře hodí zejména pro kontinuální postupy textilního odšlichtování. Při řešení daného úkolu byla rovněž naše pozornost obrácena na bakteriální amylázy pro jejich vhodné vlastnosti. V článku, již dříve publikovaném v tomto časopise [1], jsou uvedeny první etapy výzkumné práce na úseku, kdy byla především hledána cesta řešení problému.

K produkci bakteriálních amylolytických enzymů se použilo kmenů *Bac. subtilis*, které byly vypěstovány ve Výzkumném ústavě pivovarském a sladařském. Výroba preparátů se děje ve dvou hlavních fázích. V první fázi probíhá submerzní kultivace kmene ve vhodném živném prostředí ve fermentačním tanku, zatímco ve druhé fázi se ze získané tekutiny vyrábí vlastní preparát. Fermentační tekutina se odstředěním zbaví biomasy, zahustí ve vakuu, smísí s vhodnými pojidly, usuší a rozemele na prášek.

Jako živné půdy pro produkci amyláz vybraným kmenem byly nejdříve vyzkoušeny různé odpady pivovarské výroby, které obsahovaly dostatečný zdroj dusíkatých živin, jichž je pro tvorbu těchto enzymů nezbytně třeba. Z různých možností se jako nejvhodnější ukázala kombinace kvasničného autolyzátu z pivovarských odpadních kvasnic s posledními podíly výstřelkových vod, získávaných při vyslazování mláta během scezování sladiny. S dobrým výsledkem byla vyzkoušena i náhrada cukrů výstřelkových vod dextrinem (odpadní pro-

dukt při výrobě glukózy). Ukázalo se tedy, že pro tvorbu amyláz není třeba, aby v kultivačním médiu byl přítomen škrob a že se amylázy v potřebné míře tvoří v živném prostředí, obsahujícím jeho štěpné produkty. Od fermentačních pokusů na třepačce se přešlo ke zkouškám v malém laboratorním fermentačním tanku o obsahu 20 l. Zde bylo možno upravit podmínky aerace a míchání zaočkované půdy tak, že byly v malém měřítku obdobné podmínkám při poloprovozní či provozní výrobě. V těchto pokusech byla především sledována závislost tvorby amyláz na množství přiváděného vzduchu a na intenzitě míchání. Výsledky jsou uvedeny v tab. 1.

Srovnání hodnot označujících amylolytickou aktivitu fermentační tekutiny z jednotlivých pokusů ukazuje, že tvorba amyláz používaným kmenem je v uvedené živné půdě skončena prakticky během 20 hodin, a že prodlužování kultivační doby je bezvýznamné. Amylázy se ve značné míře hromadí již kolem 10. hodiny fermentace. Počáteční pH živné půdy po sterilaci se pohybuje mezi 6 a 7 a z experimentálních výsledků je zřejmé, že není třeba je upravovat vždy na stejnou hodnotu. Na začátku růstu pH poněkud poklesne, poté se však vyrovnává na původní hodnotu a dále postupně zvyšuje až k uvedeným hodnotám. Rovněž i množství inokula a způsob jeho přípravy není zde v určitých mezích rozhodující, pokud jsou dodrženy potřebné kultivační podmínky. (K zaočkování živné půdy se používalo 20hodinové kultury na třepačce; ve dvou případech však bylo třeba zaočkovat kulturu s bujonagaru). Vzorke odebrané mezi 4. a 6. hodinou fermentace se vyznačují dlouhými pohyblivými buňkami, které se po této době zkracují a ztrácejí svou pohyblivost. Již kolem 10. hodiny dosahuje růst počtu, který se dále podstatně nemění, zatímco tvorba amyláz se ještě dovršuje. Na konci fermentačního procesu kultury sporulují (viz obr. 1 až 3). Dále pak je vidět, že zvýšení intenzity míchání nad 260 otáček/min tvorbu amyláz neovlivňuje. Tento počet otáček bylo možno u dané aparatury nastavit jako nejnižší. Aerace živné půdy v poměru 1 objem vzduchu : 2 objemům půdy za min plně vyhovuje požadavkům na výši pro-

Tabulka 1

Fermentace v laboratorním fermentačním tanku

| Pokus č. | Živná půda | | Kulti- vační doba v hod. | Amylolytická aktivita v min.*) | pH | | Vzduch l/min | Otáčky mí- chadla za min | Inokulum v 1 ml půdy v ml. | Počet buněk v ml. | Mikroskopický vzhled |
|-------------|----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------|---|-----------------|-----------------------------------|---|-----------------------------------|--|
| | mg celk. N/100 ml | extrakt výstřel- kové vody | | | před kul- tivací | po kul- tivací | | | | | |
| 1 | 102,9 | 1 % | 24 48 | 7 7 | 6,25 | 7,85 — | 10 | 300 | 1,7 | 1160 — | veget. buňky, spory |
| 2 | 96,3 | 1 % | 24 48 | 13 13 | 6,65 | 8,65 8,75 | 10 | 300 | 2,7 | 810 810 | veget. buňky, spory veget. buňky, spory |
| 3 | 96,3 | 1 % | 11 18 24 | 22 17 15 | 6,65 | 6,7 7,4 8,4 | 10 | 300 | 3,2 | 1070 — 1070 | veget. buňky veget. buňky, spory veget. buňky, spory |
| 4 | 104,4 | 1 % | 10 18 | 27 13 | 6,7 | 7,7 7,7 | 10 | 590 | 3,2 | 1320 1490 | veget. buňky veget. buňky, spory |
| 5 | 96,4 | 1 % | 11 18 | 38 17 | 6,65 | 7,3 8,8 | 10 | 460 | 3,3 | 1110 1150 | veget. buňky veget. buňky, spory |
| 6 | 104,4 | 1 % | 10 18 | 23 11 | 6,7 | 7,6 7,75 | 10 | 370 | 2,9 | 1350 1380 | veget. buňky veget. buňky |
| 7 | 116,2 | 1 % | 10 19 | 10 8 | 6,5 | — 8,2 | 10 | 260 | 1,2 | 850 850 | veget. buňky veget. buňky, spory |
| 8 | 107,9 | 1 % | 10 12 16 18 24 | 16 10 9 6 6 | 6,7 | 7,15 — 7,2 — 7,7 | 10 | 260 | suspenze buněk z MPA†) ve 20 ml fyz. roztoku | 1420 — 1400 | veget. buňky veget. buňky veget. buňky veget. buňky, spory veget. buňky, spory |
| 9 | 111,1 | 1 % | 5 10 18 24 | inaktivní 30 15 11 | 6,0 | 5,8 6,45 7,3 7,6 | 5 | 260 | 3,2- | 148 — 1060 1090 1030 | veget. buňky veget. buňky veget. buňky, spory veget. buňky, spory |
| 10 | 97,5 | 0,5 % | 6 8 10 22 | — za 30 min červenohnědé 28 15 | 6,35 | 6,0 6,6 — 7,4 8,15 | 5 5 | 260 | suspenze buněk z MPA ve 20 ml fyz. roztoku | 20 350 — 810 | veget. buňky veget. buňky veget. buňky veget. buňky, spory |
| 11 | 56,4 | 0,5 % | 6 8 10 21 24 | — inaktivní za 30 min červenohnědé 25 16 | 6,7 | 5,9 6,15 — 6,35 7,35 7,5 | 5 | 260 | 2,5 | 36 140 — 528 790 — | veget. buňky veget. buňky veget. buňky veget. buňky veget. buňky, spory veget. buňky, |

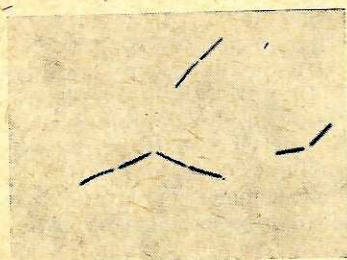
*) Amylolytická aktivita byla měřena metodou stanovení tzv. Wohlgenutovy reakce, uvedené v článku z r. 1960.

†) MPA = masopeptonový agar.

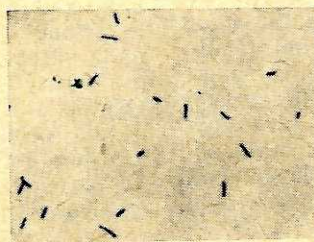
dukce amyláz. Snížení obsahu dusíku v živné půdě (viz tab. 1, pokus č. 11), nevedlo k podstatnému poklesu amylolytické aktivity fermentační tekutiny. Podle laboratorních zkoušek na třepačce představuje přibližně tento obsah dusíku nejnižší přípustné množství.

Výsledky laboratorních zkoušek přípravy bakteriálních amylolytických preparátů byly ověřeny zkouškami poloprovozními. Provedení první fáze výroby umožnil Výzkumný ústav antibiotik v Roztokách a podstatnou část druhé fáze zajistil Vý-

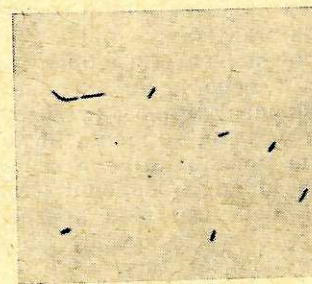
zkumný ústav pro farmacii a biochemii v Praze. Zkoušky se prováděly v nerezových fermentačních tancích, přičemž v prvních dvou případech byl objem živné půdy 100 l, v dalších pak 250 l. K odpeňování se přidávalo 0,2 l sojového oleje na 1 hl půdy, připravené z kvasničného autolyzátu a následních podílů výstřelkové vody. K zaočkování se používalo 16hodinové kultury produkčního kmeny na třepačce. Kulturační teplota byla udržována na 30° C a vzdušnění se provádělo vždy polovinou objemu živného média.



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

Tabulka 2

Poloprovozní zkoušky

| Zkouška č. | Složení živné půdy | | | | Objem inokula na 1 hl půdy v l | Počet buněk inokula v 1 ml půdy v ml. | Počáteční pH | Kultivační doba v hod. | pH | Amylolytická aktivita v min. | Počet buněk v 1 ml | Mikroskopický vzhled |
|------------|--------------------|----------------------------|---|--|--------------------------------------|--|--------------|---------------------------|------|---|---------------------------------|---|
| | mg celk. N/100 ml | mg formolového N/100 ml | mg redukujících lá- tek před hydrolýzou ve 100 ml | mg redukujících látek po hydrolýze ve 100 ml | | | | | | | | |
| 1 | 101,8 | 32,9 | 350,9 | 488,2 | 0,4 | 3,6 | 6,25 | 5 | 6,3 | — během 30 min inakt. 19 11 9 | — 95 808 832 852 | dlouhé, pohyblivé tyčinky krátké pohyblivé tyčinky krátké tyčinky, krátké tyčinky, krátké tyčinky, spory |
| | | | | | | | | 10 | 6,4 | | | |
| | | | | | | | | 15 | 7,1 | | | |
| | | | | | | | | 20 | 7,6 | | | |
| 2 | 98,8 | 43,7 | 285,8 | 474,9 | 0,4 | 3,8 | 6,3 | 5 | 6,3 | — během 30 min inakt. 15 8 8 | 5 35 1268 1360 1310 | dlouhé, pohyblivé tyčinky dlouhé, pohyblivé tyčinky krátké tyčinky, krátké tyčinky, krátké tyčinky, spory |
| | | | | | | | | 10 | 6,25 | | | |
| | | | | | | | | 15 | 7,0 | | | |
| | | | | | | | | 20 | 7,3 | | | |
| 3 | 98,4 | 37,8 | 345,8 | 462,4 | 0,4 | 3,7 | 6,45 | 10 | 6,5 | během 39 min inakt. 16 9 9 | — — — — | dlouhé, pohyblivé tyčinky krátké a střední tyčinky, krátké a střední tyčinky spory krátké a střední tyčinky |
| | | | | | | | | 15 | 6,5 | | | |
| | | | | | | | | 20 | 7,7 | | | |
| | | | | | | | | 23 | 8,0 | | | |
| 4 | 101,8 | 41,0 | 345,8 | 435,7 | 0,4 | 3,1 | 6,45 | 10 | 6,2 | během 30 min inakt. 15 9 8 | — — — — | dlouhé, pohyblivé tyčinky krátké a střední tyčinky krátké a střední tyčinky krátké a střední tyčinky spory |
| | | | | | | | | 15 | 7,6 | | | |
| | | | | | | | | 20 | 8,0 | | | |
| | | | | | | | | 23 | — | | | |
| 5 | 102,0 | 39,7 | 374,4 | 454,4 | 0,4 | — | 6,4 | 10 | 6,4 | během 30 min inakt. 13 10 9 | — — — — | dlouhé, pohyblivé tyčinky krátké a střední tyčinky krátké a střední tyčinky krátké a střední tyčinky spory |
| | | | | | | | | 15 | 7,8 | | | |
| | | | | | | | | 20 | 8,2 | | | |
| | | | | | | | | 22 | — | | | |
| 6 | 99,4 | 37,3 | 313,0 | 430,0 | 0,4 | — | 6,5 | 10 | 6,85 | během 30 min inakt. 13 9 8 | — — — — | dlouhé, pohyblivé tyčinky dlouhé a střední tyčinky, dlouhé a střední tyčinky, spory |
| | | | | | | | | 15 | 7,5 | | | |
| | | | | | | | | 20 | — | | | |
| | | | | | | | | 23 | 8,0 | | | |

Pozn.: Zkoušky byly provedeny při aeraci fermentační půdy 1/2 jejího objemu a při 300 otáčkách míchadla za min.

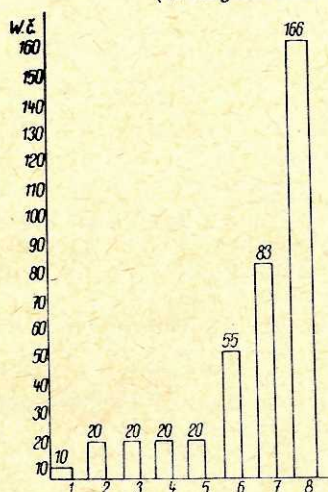
Jak je vidět z tab. 2, vytvořily se amylázy ve všech případech stejně rychle, prakticky ve shodném množství. Průběh jednotlivých fermentací vykazoval určité odchylky v hodnotách pH, které však neovlivňovaly výši enzymatické produkce. Oproti fermentacím v laboratorním tanku lze však pozorovat rozdíly v závislosti tvorby amyláz na čase. Zatímco se během fermentací v tančíku hromadí amylázy již kolem 10. hodiny, v poloprovozních podmínkách je v této době Wohlgemutova reakce ještě negativní. Poté však nastává produkce amyláz takovou měrou, že kolem 20. hodiny je proces prakticky skončen, přičemž množství vytvořených enzymů je stejné, jako u laboratorních zkoušek nebo je ve srovnání s některými těmito zkouškami dokonce i vyšší. Po odstředění biomasy byla vyrobená fermentační tekutina dále zpracovávána zahusněním ve vakuu a mísením s vhodnými přísadami, zvyšujícími termostabilitu těchto enzymů. Směs se sušila a práškovala, přičemž celkem bylo vyrobeno vždy 2,5 kg preparátu z 1 hl fermentační tekutiny.

Účinnost preparátu byla srovnána jednak se vzorky zahraničních odšlichtovacích přípravků

z bakteriálních a pankreatických amyláz a jednak s tuzemskými sladovými výtažky. Hodnocení bylo provedeno metodou stanovení tzv. Wohlgemutova čísla, které udává, kolik mg škrobu se rozloží 1 mg preparátu při 40° C za dobu 30 min [3]. Této metody bylo použito proto, že se s ní běžně hodnotí odšlichtovací prostředky v textilním průmyslu, i když k ní byly vysloveny určité výhrady, neboť její výsledky vždy nesouhlasí s praktickými provozními zkušenostmi. Je to jednak teplota, která je nevhodná pro srovnání aktivity bakteriálních amyláz s pankreatickými, jejichž optimum se velmi blíží a dále je to pak okolnost, že amylázy v tomto případě působí vždy na čerstvý roztok rozpustného škrobu, zatímco u našlichtované tkaniny jde o usušený škrobový film. Z tohoto hlediska jsou vhodnější a praxi mnohem bližší metody, založené na přímém zkoušení účinnosti přípravku na vzorku standardně našlichtované tkaniny [2]. Srovnání různých odšlichtovacích preparátů ukázalo (tab. 3), že se tuzemský bakteriální výrobek vyznačuje vysokou amylolytickou účinností a že jej předčí pouze vysoce koncentrované preparáty Bactolase 400% a Novofermasol GS 600%. Podle

Tabulka 3

Účinnost odšlichtovacích prostředků
(Wohlgemutovo číslo; 40° C)



1. Sladový výtažek 23650 diast. j.)
2. Biolase — Kalle A. G., NSR
3. Enzylase - Diamalt A. G. NSR
4. Bactolase Typ - Schweizer Ferment A. G.
5. Bactolase flüssig - Schweizer Ferment A. G.
6. Bakteriální amyláza — ČSSR
7. Bactolase 400% — Schweizer Ferment A. G.
8. Novofermasol GS 600% — Schweizer Ferment A. G. (pankreatický preparát)

zprávy Výzkumného ústavu zušlechťovacího [4] jsou hodnoty Wohlgemutových čísel řady dalších zahraničních přípravků mnohem nižší (Biolase P-Kalle A. G., Novofermasol GS Typ — Schweizer Ferment A. G., Tissoferm — VEB Fettchemie) nebo se prakticky shodují (Degoma I, Degoma HB — Röhm a Haas — USA) s Wohlgemutovými čísly tuzemského výrobku.

Vyrobené bakteriální amylolytické preparáty byly pak dále zkoušeny přímo v provozech pěti textilních závodů při odšlichtování různých druhů tkanin na tzv. jiggrech, ve skládkách a ve stroji typu Benteler. Preparáty se dobře osvědčily a zejména se pak projeví jejich přednosti ve srovnání s textilními sladovými výtažky a s tuzemským pankreatickým přípravkem Syntezyt R. Tyto před-

nosti spočívají především v tom, že dávku bakteriálního preparátu lze snížit až na 1/10 běžně používaného množství sladového výtažku nebo Syntezytu R, při zkrácení doby odšlichtovacího procesu na jiggrech až na polovinu. Velmi dobrých výsledků bylo rovněž dosaženo při zkoušení kontinuálního způsobu odšlichtování ve stroji Benteler. Není pochyby, že uskutečnění výroby bakteriálních amylolytických preparátů umožní i zavádění moderních způsobů kontinuálního odšlichtování, neboť tyto vyžadují především používání bakteriálních amyláz.

Podle rozhodnutí MPP se má výroba těchto přípravků realizovat v n. p. Slovenské škrobárny v Bolerázu. Vedlejší produkty, popř. odpady této kukuřičné škrobárny představují levnější zdroj živin, nežli je kombinace výstřelkové vody a kvasničného autolyzátu, jehož příprava vyžaduje určitých vyšších nákladů. K danému účelu jsou zatím nejvhodnější glutenové výpalky, které zbývají po destilaci alkoholu, vyrobeného z kvašením z cukřenného škrobu, provázejícího surový gluten. Tyto výpalky vyhovují svým složením, jsou velmi levné a snadno dostupné v dostatečném množství, protože jsou jen zčásti využívány ke krmeným účelům. V současné době se zavádí poloprodukt výroby bakteriálních amylolytických enzymů submersní fermentací produkčního kmene na glutenových výpalcích. Její výsledky jsou velmi uspokojivé a budou uveřejněny po skončení všech plánovaných zkoušek.

Literatura

- [1] Bendová O.: Bakteriální amylolytické preparáty jako náhrada textilních sladových výtažků. Kvasný průmysl 3, 53 (1960).
- [2] Klemm O.: Die Bewertung enzymatischer Entschlichtungsmittel. Fachorgan für Textilveredlung 4 (1952).
- [3] Slezák J.: Bakteriální amylázy při odšlichtování. Textil 15, 382 (1960).
- [4] Zpráva Výzkumného ústavu zušlechťovacího: Kontrola TPP (textilních pomocných prostředků), r. 1960.

Došlo do redakce 31. 5. 1961.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ АМИЛОЛИТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

В статье рассматриваются результаты испытаний проведенных с выбранным штаммом *B. subtilis* отличающимся способностью давать значительное количество амилолитических энзимов. Испытания проводили в лабораторном и полупромышленном масштабах. Активность и производительность изготовленных препаратов сравнивалась с промышленными образцами. Полученные числа Вольгемута можно признать весьма благоприятными. Препараты оправдали себя также на практике, где их сравнивали со солодовыми экстрактами.

BAKTERIELLE AMYLOLYTISCHE PRÄPARATE

Es werden Labor- und halbbetriebliche Versuche mit einem ausgewählten Stamm *B. subtilis* beschrieben, welcher eine hohe Produktion amyolytischer Enzyme aufweist. Der Wirkungsgrad der hergestellten Präparate wurde mit Mustern von ausländischen Produkten verglichen. Die ermittelten Werte der Wohlgemuth-Reaktion liegen sehr günstig und auch in der Praxis bewährten sich die bakteriellen Präparate gut im Vergleich mit Malzextrakten für Textilindustriezwecke.

BACTERIAL AMYLOLYTIC SUBSTANCES

The article deals with the results of tests, which have been made on laboratory and semi-production scales with a selected stem of *B. subtilis*, outstanding for its exceptional ability to produce great quantities of amyolytic enzymes. The efficiency of preparations in comparison with foreign samples is good. The Wohlgemut numbers are very favourable. Practical applications gave also positive results in comparison with malt extracts.