



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

205 427
(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 05 06 78
(21) PV 4469-78

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/26

(40) Zverejnené 29 08 80
(45) Vydané 01 08 83

(75)

Autor vynálezu ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA, KOSTIVIAROVÁ ELENA ing., KLENOVEC, KUNIAK
ĽUDOVÍT ing. CSc., KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. DrSc., AUGUSTÍN JOZEF
PhMr. a ČERNÁKOVÁ MARTA RNDr., BRATISLAVA

(54) Spôsob produkcie α -amylázy

1

Vynález sa týka produkcie α -amylázy kultiváciou kmeňov *Aureobasidium pullulans* na tekutých živných pôdach.

Podobné postupy pre priemyselnú produkciu enzýmu α -amylázy najčastejšie používajú nasledovné organizmy: *Bacillus subtilis*, resp. *Streptomyces aureofaciens* z baktérií alebo niektoré druhy plesní rodov *Aspergillus* a *Penicillium*. Nevýhodou produkcie α -amylázy u uvedených kmeňov je nevýhodný pomer oligosacharidov maltózového typu a D-glukózy ako reakčných produktov amylolytickej reakcie, resp. ťažkosti pri separácii biomasy z kultivačného média.

Uvedené nevýhody odstraňuje spôsob produkcie α -amylázy na tekutej živnej pôde obsahujúcej zdroje asimilovateľného uhlíka, komplexné zdroje dusíka a minerálne živné sili, ktorého podstata spočíva v tom, že kmene druhu *Aureobasidium pullulans*:

Aureobasidium pullulans CCY 27-1-2

27-1-11

27-1-15

27-1-17

27-1-19

27-1-23

27-1-36

27-1-39

27-1-40

205 427

sa kultivujú jednotlivo alebo v ich zmesi na živnej pôde obsahujúcej 0,1 až 3 hmot. % škrobu pri teplote 20 až 40 °C, pH 5 až 7, po dobu 60 až 90 hodín, pričom α -amyláza sa získava v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo afinitným prečistením adsorbciou na sietovanom α -1,4-glukáne.

Výhodou uvedeného postupu je, že α -amyláza *Aureobasidium pullulans*, na rozdiel od bakteriálnej α -amylázy katalyzuje hydrolýzu α -1,4-glukánov škrobu za vzniku D-glukózy a oligosacharidov maltózového typu v pomere 1:1, čo umožňuje lepšie využitie reakčného produktu. Uvedený spôsob umožňuje využiť filtračných techník pri izolácii biomasy a využitie filtrátu fermentačnej pôdy k izolácii pullulánu, ako vedľajšieho produktu. α -amyláza získaná podľa vynálezu má výhodné použitie predovšetkým v pivovníctve, pri príprave sirupov a štiav a k príprave sladidiel.

Príklad 1

Aureobasidium pullulans CCY 27-1-11 sa pomnoží na rastovej pôde obsahujúcej 2 g /8 %/ gélu pripraveného sietovaním amylózy epichlórhydrínom pomoreného do polovice výšky v Yeast Nitrogen Base rastovej pôde /fa Oxoid/ 0,6 g/10 ml a kultivuje sa povrchovo po dobu 36 hodín pri 28 °C, kedy dochádza k stekucovaniu gélu. Nahromadená biomasa /0,11 g/ *Aureobasidium pullulans* sa použije k fermentácii na pôde obsahujúcej 10 g kukuričného výluhu, 2 g síranu amónneho, 2 g kyslého fosforečnanu draselného a 1 g rozpustného škrobu na 1 liter vody. Rastová pôda bola nastavená na pH 6,0. Po 72 hodinách kultivácie na reciprokej trepačke pri 28 °C sa odstredila biomasa /5000 g po dobu 10 minút/ a zvyšné bunky sa odstránili filtráciou. Supernatant sa zrážal síranom amónnym v množstve 740 g/liter pri 15 °C. Dialyzovaný enzým /2 x 24 hodín oproti destilovanej vode/ sa lyofilizoval. Výsledná aktivita 68 IU, špecifická aktivita 1,236 IU/mg proteínu.

Príklad 2

Aureobasidium pullulans CCY 27-1-17 sa pomnoží na rastovej pôde so sietovaným gélom amylózy tak, ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že nahromadená biomasa 0,13 g *Aureobasidium pullulans* sa použije k fermentácii na pôde obsahujúcej 5 g kvasničného autolyzátu, 2 g síranu amónneho, 2 g kyslého fosforečnanu amónneho a 1 g škrobu na liter vody. Rastová pôda bola nastavená na pH 7,0. Po 72 hodinách kultivácii na reciprokej trepačke pri teplote 20 °C sa biomasa *Aureobasidium pullulans* odcentrifugovala /5000 g, po dobu 10 minút/ a α -amyláza zo supernatantu sa izolovala afinitnou metódou, prídavkom 20 g sietovaného škrobu /počet glukózových jednotiek na jednu priečnu väzbu 29/. Po premiešaní /10 minút/ sa supernatant odstránil, sediment so sietovaným škrobom sa premyl 2 x 300 ml 0,05 molárnym fosforečnanovým tlmivým roztokom pH 6,0, pri teplote 5 °C. Uvoľnenie enzýmu sa prevedie 0,1 M fosforečnanovým tlmivým roztokom pH 4,0 /80 ml/. Po dialýze roztok α -amylázy možno zahustiť lyofilizáciou. Výsledná aktivita 93 IU, špecifická aktivita 61,2 IU/mg proteínu.

Príklad 3

Tak, ako uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že ako produkčný kmeň sa použije Aureo-

basidium pullulans CCY 27-1-39 a koncentrácia škrobu vo fermentačnej pôde je 30 g na 1 liter, kmeň sa kultivuje pri teplote 40 °C, pH 5, po dobu 90 hodín. Výsledná aktivita 73 IU, špecifická aktivita 1,51 IU/mg proteínu.

Vynález má použitie pri priemyselnej výrobe α -amylázy pomocou uvádzaných mikroorganizmov s výhodou, že sa jedná o nepatogénne mikroorganizmy, takže sa produkovaný enzým môže aplikovať v potravinárskom priemysle.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob produkcie enzýmu α -amylázy na tekutej živnej pôde obsahujúcej zdroje asimilovateľného uhlíka, komplexné zdroje dusíka a minerálne živné soli, vyznačujúci sa tým, že kmene druhu *Aureobasidium pullulans*:

Aureobasidium pullulans CCY 27-1-2

27-1-11

27-1-15

27-1-17

27-1-19

27-1-23

27-1-36

27-1-39

27-1-40

sa kultivujú jednotlivo alebo v ich zmesi na živnej pôde obsahujúcej 0,1 až 3 hmotnostných % škrobu pri teplote 20 až 40 °C, pH 5 až 7, po dobu 60 až 90 hodín, pričom α -amyláza sa získava v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo afinitným prečistením adsorbciou na sietovanom α -1,4-glukáne.