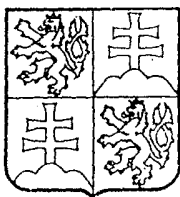


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 904

(21) PV 6176-87, Y
(22) Přihlášeno 21 08 87

(40) Zveřejněno 13 10 89
(45) Vydáno 12 02 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. 4

C 12 N 9/10

(75) Autor vynálezu

GOTTVALDOVÁ MARIA RNDr.,
HRABOVÁ HANA ing.,
KUČERA JIŘÍ ing. CSc.,
ŠILLINGER VLADIMÍR ing., PRAHA

(54)

Způsob separace enzymu cyklodextrin
glukosyltransferázy

(57) Kultivační kapalina nebo roztok enzymu se při teplotě 0 až 25 °C a pH 5,0 až 8,5 na 1 až 4 hodiny uvede do styku se škrobem nebo modifikovaným škrobem, škrob s enzymem se promyje vodou a při teplotě 40 až 60 °C se inkubuje ve vodě ke ztekucení škrobu a získání finálního enzymového koncentrátu. Obě operace lze provádět vsádkově i průtokově. Získá se enzym zba-vený všech bílkovinných nečistot.

Vynález se týká způsobu separace enzymu cyklodextrin glukosyltransferázy z kultivační kapaliny po kultivaci bakterií, produkujících tento enzym nebo z roztoků tento enzym obsahujících.

K separaci cyklodextrin glukosyltransferázy se používá dosud srážení roztoku enzymu síranem amonným, ethanolem nebo acetonem, zahušťování enzymu odpařením za snížené teploty nebo zahušťování ultrafiltrací. Byla také popsána izolace enzymu sorpcí na nativní škrob a na cyklodextriny vázané na nerozpustný nosič nebo sítěné epichlorhydrinem.

Nevýhody uvedených postupů spočívají v energetické nebo investiční nákladnosti, ve vzniku velkého množství silně znečištěných odpadních vod a také v tom, že enzym není během separace čištěn, ale pouze koncentrován. Izolace enzymu cyklodextrin glukosyltransferázy afinitní sorpcí na nativní škrob vyžaduje práci s velkými objemy kapaliny, protože enzym může být sorbován pouze vsádkovým způsobem. Pro kontinuální izolaci enzymu ve sloupci nelze nativní škrob použít, protože vlivem nejednotné velikosti zrn a obecně malého průměru zrn dochází k vysokému tlakovému odporu sloupce škrobu, dovolujícímu pouze pomalý průtok, zcela nepoužitelný pro průmyslové izolace. Sorpce enzymu na sítěný cyklodextrin může být použito i kontinuálně, ale při sítění je většina molekul cyklodextrinu stericky blokována a výsledná kapacita sorbentu je proto velmi nízká. O mnoho vyšší není ani kapacita sorbentů připravených kovalentní vazbou cyklodextrinu na nerozpustný nosič. Ani v těchto případech není metoda použitelná pro průmyslovou výrobu.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob podle vynálezu, spočívající v tom, že kultivační kapalina nebo roztok enzymu se uvede do styku se škrobem nebo modifikovaným škrobem při teplotě 0 až 25 °C a pH 5,0 až 8,5 na dobu 1 až 4 hodiny a po promytí škrobu s enzymem vodou se škrob inkubuje ve vodě při teplotě 40 až 60 °C ke ztekucení škrobu a získání enzymového koncentráту, přičemž obě operace mohou být provedeny jak vsádkově, tak i v průtoku.

Po ztekucení škrobu uvedeným postupem je získán enzymový koncentrát, neobsahující žádné další enzymy a stabilizovaný hydrolyzátem škrobu.

Výhodou postupu podle vynálezu je zejména to, že sorpce může být provedena filtrací roztoku enzymu vrstvou škrobu nebo modifikovaného škrobu, čímž se dosáhne technologického zjednodušení. Další výhodou je to, že enzym je zbaven všech bílkovinných nečistot, které by mohly nepříznivě ovlivnit jeho použití.

Příklad 1

100 ml kultivační kapaliny po kultivaci *Bacillus macerans*, obsahující cyklodextrin glukosyltransferázu o aktivitě 200 j./ml je při teplotě 5 °C a pH 7,0 filtrovaného vrstvou houbovitého škrobu o celkovém objemu 1 ml. Po filtraci celého množství je sloupec promyt vodou za stejné teploty. Škrob je potom suspendován v 5 ml vody a míchán 2 hodiny při 50 °C. Je získáno 6 ml roztoku enzymu s výtěžkem enzymové aktivity 81,3 %. Jedna jednotka enzymové aktivity (j.) je definována jako množství enzymu, které sníží absorpci škrobového roztoku jódu při 660 nm o 1 % za minutu při 40 °C a pH 5,5.

Příklad 2

100 ml kultivační kapaliny po kultivaci *Bacillus macerans* o aktivitě cyklodextrin glukosyltransferázy 200 j./ml je mícháno při 5 °C s jedním gramem houbovitého škrobu v perlové formě 4 hod. Potom je škrob odseparován a promyt vodou za stejné teploty. Škrob s enzymem je potom inkubován 4 hodiny při 50 °C do ztekucení. Je získán roztok s výtěžkem enzymové aktivity 73,6 %.

Příklad 3

100 ml kultivační kapaliny po kultivaci *Bacillus macerans* o aktivitě cyklodextrin glukosyltransferázy 200 j./ml se filtruje přes 1 ml houbovitého škrobu při teplotě 10 °C a pH 6,5. Potom je vrstva škrobu promyta vodou za stejné teploty a škrob se sorbovaným enzymem je zpracován stejně jako v příkladu 1. Je získán koncentrát cyklodextrin glukosyltransferázy s výtěžkem enzymové aktivity 79,8 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob separace enzymu cyklodextrin glukosyltransferázy z roztoku obsahujících tento enzym, vyznačující se tím, že kultivační kapalina nebo roztok enzymu se uvede do styku se škrobem nebo modifikovaným škrobem při teplotě 0 až 25 °C a pH 5,0 až 8,5 na dobu 1 až 4 hodiny a po promytí škrobu s enzymem vodou se škrob inkubuje ve vodě při teplotě 40 až 60 °C ke ztekucení škrobu a získání enzymového koncentráту, přičemž obě operace mohou být provedeny jak vsádkově, tak i v průtoku.