



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

214 056

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 20 05 80
(21) PV 3509-80

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/28

(40) Zveřejněno 15 09 81

(45) Vydáno 01 07 84

(75)

Autor vynálezu PAZLAROVÁ JARMILA RNDr. CSc., FENCL ZDENĚK RNDr. DrSc., PRAHA

(54) Způsob kontinuální výroby α -amylázy

Předmětem vynálezu je způsob kontinuální výroby alfa-amylázy. Jako produkční kmen se používá s výhodou *Bacillus amylo-liquefaciens* A 32 CCM 3502. Vynález spočívá v přesné regulaci zředovací rychlosti a v udržování hladiny cukru v médiu během kontinuálního procesu na maximálně 3 g/l při pH 7,2 až 7,8.

Vynález se týká způsobu výroby α -amylázy kontinuální fermentací mikroorganismů.

Ke štěpení škrobu se užívají amylolytické enzymy různého původu. Jde především o amylázy rostlinného původu, které jsou obsaženy např. v ječmenném sladu. Pro nedostatek těchto rostlinných surovin a pro některé speciální účely, kdy je nutné mít k dispozici pouze jeden z komplexu amylolytických enzymů, se hledaly jiné zdroje a jako nejvýhodnější se ukázaly mikroorganismy, které jsou schopny produkovat buď směs, nebo jeden ze tří základních typů amylolytických enzymů, a to α -amylázu (E.C.3.2.1.1.), která se nahodile štěpí α -D (1,4) vazby v molekule škrobu a dextrinů, a konečným produktem její činnosti jsou oligodextriny a maltóza. Tento enzym neštěpí α -D (1,6) vazbu v amylopektinu. Dalšími typy jsou β -amyláza (E.C.3.2.1.2.) a glukooamyláza (E.C.3.2.1.3.), (T.E.Barman Enzyme Handbook, Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York 1969).

K produkci α -amylázy se z mikroorganismů používají buď plísňe, např. *Aspergillus Oryzae*, *Penicillium expansum*, a bacily, jako *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (J.C.Johnson. Industrial Enzymes, Noyes Data Corporation, New Jersey, USA, 1977).

Známy způsob výroby enzymu α -amylázy se provádí periodicky (vsádkově) kultivací na médiích obsahujících škrob a anorganické soli. Vyprodukovaný enzym se pak různým způsobem z média izoluje nebo se jen médium zahustí. Je známo, že uvedený způsob má řadu nevýhod, zejména: dlouhou dobu potřebnou k nárůstu mikroorganismů, vypouštění a čištění fermentoru po každé vsádce, časové ztráty vznikající po zaočkování, častou přípravu inokula a obtížnou automatizaci a řízení procesu. Proto se již řadu let studují možnosti, jak převést jednorázovou produkci enzymů na kontinuální proces, obdobný, jaký se používá při produkci mikrobiální biomasy nebo mikrobiálním čištěním odpadních vod. Jak vyplývá z literatury, zatím se tento problém pro exocelulární enzymy, jakými jsou amylázy nebo proteázy nepodařilo vyřešit, neboť v průběhu kontinuálního procesu začne hladina enzymu a specifická rychlost produkce klesat. L. G. Loginova, I. A. Tsaplina, Mikrobiologiya, Vol. 45, No. 3. p. 395, 1977, a dále U. S. Patent 3.826 715.

I když se v některém případě v kontinuálním procesu podařilo zvýšit celkovou produkci některého z těchto exocelulárních enzymů, bylo to na úkor jeho koncentrace, čímž se ztížila izolace enzymu do té míry, že žádný z těchto postupů nebyl ve výrobě realizován. Důvodem byla i skutečnost, že šlo o vícestupňové postupy, čímž se celý proces velmi komplikoval.

Hydrolytické enzymy, jako jsou amylázy a proteázy, jsou u bacilů syntetizovány až na konci exponenciální fáze růstu populace a během stacionární fáze před začátkem sporulace, neboť přebytek glukózy reprimuje syntézu těchto enzymů. Proto i zředovací rychlosti, které byly v kontinuálním procesu používány, byly nízké a odpovídaly růstové rychlosti na konci růstové fáze populace. Bylo zjištěno, že při těchto nízkých zředovacích rychlostech, kdy jsou růstové látky v médiu do značné míry vyčerpány, jsou v populaci bakterií preferovány neprodukční varianty, neboť tyto varianty jsou za podmínek omezeného růstu životaschopnější než buňky produkující enzym. Tímto selekčním tlakem se mění složení populace a výsledkem je pokles produkce enzymu. Proto se ukázalo, jako nutná podmínka, pracovat v kontinuálním procesu s kulturou, která se během kultivace neštěpí, to znamená, že je dostatečně stabilní, a zabránit přerůstání neprodukčních variant dostatečně vysokou hladinou živin, což se

projevuje i vyšší růstovou rychlostí.

Tyto nevýhody odstraňuje způsob kontinuální výroby α -amylázy fermentací mikroorganismů, jehož podstatou je, že se produkční aktivita kontinuálně fermentovaného mikroorganismu, který produkuje α -amylázu, udržuje regulací zředovací rychlosti v rozmezí mezi 0,18 - 0,32 (h^{-1}), hladina redukujících cukrů v médiu, přepočtená na maltózu, v průběhu kontinuálního procesu se udržuje maximálně na 3 g/l a pH se řídí autoregulací v rozmezí 7,2 až 7,8. Jako vysokoprodukční kmen mikroorganismu pro kontinuální výrobu α -amylázy je výhodné použít zejména kmen *Bacillus amyloliquefaciens*, uložený ve sbírce mikroorganismů pod č. CCM 3502 nebo kmen *Bacillus subtilis* A 32.

K produkci bylo použito několik typů médií. Jako zdroj uhlíku sloužil buď čistý škrob, nebo rostlinné substráty obsahující škrob, jako např. rozemletá zrna, otruby apod. Obsah škrobu v kultivační půdě se může pohybovat od 0,5 hmot.% až do 10 hmot.%. Dusíkaté látky byly převážně organického původu s přidavkem minerálního dusíku. Jako organický dusíkatý zdroj lze použít hydrolyzát kaseinu, zahuštěný kukuřičný extrakt nebo syrovátku, respektive směs těchto dusíkatých látek. Obsah dusíku v médiu, je-li použit 1% zdroj uhlíku, by měl být 2 g/l, a je výhodou, je-li část tohoto dusíku organického původu. Půda se doplňuje minerálními solemi, jako jsou fosfáty, soli obsahující železo, mangan, vápník a hořčík. Množství těchto látek závisí na jejich množství v organických surovinách. Celkový obsah fosforu v půdě dostačuje v rozmezí od 0,01 do 0,1 g/l, železa od 0,001 do 0,01 g/l, manganu od 0,001 do 0,01 g/l, vápníku od 0,01 do 0,1 g/l a hořčíku od 0,01 do 0,1 g/l. pH se upravuje před sterilizací média na hodnoty mezi 6,8 - 7,5, pH se dále nemusí upravovat, neboť v průtokové kultivaci je udržována téměř konstantní autoregulací na hodnotách mezi 7,2 až 7,8. Teplota při fermentaci nemá klesnout pod 27 °C a nemá přesáhnout 32 °C. Kultivace probíhá za aerobních podmínek v případě fermentoru míchaného normalizovanou turbínou a přivádí se 1/2 až 1 objem vzduchu/min. Po rozkvašení, které trvá asi 18 až 20 hodin, kdy se v médiu již naprodukuje enzym a pH stoupne k hodnotě 8,0 i vyšší, se zahájí průtok zředovací rychlostí $D = 0,18$ až $0,32$ (h^{-1}). Během dalších 24 hodin se koncentrace enzymu stabilizuje a zůstává již po celou dobu další fermentace nezměněna. Je to umožněno tím, že v kontinuálním procesu zůstává hladina redukujících cukrů velmi nízká a je na úrovni koncentrace z konce jednorázové kultivace. Tím se neprojevují jejich katabolická represe, která jinak ve vsádkové (periodické) kultivaci brání tvorbě enzymu.

Průběh fermentací za různé zředovací rychlosti a jednotlivé typy fermentací na různých médiích jsou uvedeny v příkladech provedení. Hodnoty získané analýzou kontinuálních kultivací jsou uvedeny dále v přiložené tabulce a představují průměr z několika kontinuálních fermentací, z nichž každá trvala průměrně 20 dnů.

Příklad 1.

Živná půda skládající se z 1,0 hmot. % škrobu, 2,0 hmot. % kukuřičného extraktu, 0,3 hmot. % $(NH_4)_2SO_4$, 0,03 hmot. % KH_2PO_4 a mikroelementů (0,015 g $FeCl_3$, 0,007 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ na litr), pH se před sterilizací upraví NaOH na hodnoty 6,8 až 7,5. Médium se po sterilizaci zchladí na teploty 27 - 32 °C a inokuluje se 1 až 3 % tekuté kultury vyselektovaného vysokoprodukčního kmene *Bacillus amyloliquefaciens* CCM 3502, narostlé předem na syntetické

půdš. Kultivuje se v míchaném fermenteru za aerobních podmínek 18 až 20 hodin. Za tuto dobu se vytvoří v kultuře 50 až 60 j α -amylázy/ml. Po zavedení průtoku o $D = 0,2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ se během 20 až 24 hodin zvýší množství enzymu α -amylázy na 90 - 100 j/ml. Složení média kontinuálně vstupujícího do fermentoru je stejné jako pro periodickou kultivaci, pH během kontinuální kultivace není třeba regulovat, setrvává na slabě alkalických hodnotách. Z vyfermentovaného média obsahujícího α -amylázu, které kontinuálně odchází z fermentoru, lze separací biomasy izolovat enzym α -amylázu známým izolačním postupem.

Příklad 2.

Syntetická živná půda, skládající se z 1,0 hmot.% škrobu, 0,56 hmot.% NH_4NO_3 , 0,28 hmot.% $\text{Na}_3\text{citrátu} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,13 hmot.% KH_2PO_4 , 0,05 hmot.% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,01 hmot.% KCl , 0,01 hmot.% $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, doplněných 0,2 % hydrolyzátu kaseinu a mikroelementy jako v příkladu 1. Před sterilizací se pH upraví na hodnoty 6,8 až 7,5. Médium se po sterilizaci zchladí na teploty 27 - 32 °C a inokuluje se 1 až 3 % tekuté kultury kmene *Bacillus subtilis* A 32. Za 18 až 20 hodin periodické kultivace se vytvoří v kultuře 27-30 j/ml. Po zavedení průtoku $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ se během 20 až 24 hodin zvýší množství enzymu na 40 až 50 j/ml. Další postup je stejný jako v příkladu 1.

Příklad 3.

Živná půda skládající se z 50 obj.% syrovátky, 1,0 hmot.% škrobu, 1,0 hmot.% kukuřičného extraktu, 0,3 hmot.% KH_2PO_4 , mikroelementů jako v příkladu 1, se před sterilizací upraví NaOH na pH 6,8 až 7,5. Další postup včetně inokulace vysokoprodukčním kmenem *Bacillus subtilis* A 32 je stejný jako v příkladu 2. Za 18 až 20 hodin se vytvoří v kultuře 40 - 50 j α -amylázy/ml. Po zavedení průtoku $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ se během 20 až 24 hodin zvýší množství enzymu α -amylázy na 70 až 80 j/ml. Další postup je stejný jako v příkladu 1.

Tabulka představuje hodnoty získané kultivací vyselektovaného vysokoprodukčního kmene *Bacillus amyloliquefaciens* na médiu uvedeném v příkladu 1.

Tabulka

Typ kultivace	zředovací rychlost $D \text{ (h}^{-1}\text{)}$	sušina g/l	α -amyláza +j/ml	redukující cukry g/l	pH
periodická	0	7,3	53,5	2,5	8,55
kontinuální	0,05	7,75	27,5	0,6	7,90
"	0,1	9,5	45,0	1,4	7,80
"	0,2	8,4	97,0	2,2	7,50
"	0,3	8,0	88,0	2,4	7,25
"	0,4	7,5	21,0	4,0	7,10

+j = jednotky k určení α -amylázy byly tyto: 1 jednotka enzymu je rovna 1 mg maltózy, která se vytvoří během třiminutové reakce z roztoku 1% škrobu za standardních podmínek. P. Bernfeld: Amylases α and β . Methods in Enzymology; edited by S. P. Colowick and N.O. Kaplan, Academic Press New York 1955, Vol. 1., 149-158.

Tabulka srovnává výsledky dosažené v periodické kultivaci s výsledky získanými kontinuální kultivací za různých zředovacích rychlostí. Médium, které bylo použito v těchto fer-

mentacích, je uvedeno v příkladu 1. Nízké hodnoty zředovací rychlosti nejsou vhodné, právě tak jako hodnoty nad 0,32. Za optimálních hodnot zředovací rychlosti jsou hodnoty produkce α -amylázy na objemovou jednotku vyšší nežli na konci periodické kultivace.

Z těchto výsledků vyplývá, že s pomocí vhodného kmene a za daných kultivačních podmínek lze úspěšně realizovat kontinuální proces produkce α -amylázy, kdy zůstává zachována vysoká koncentrace enzymu, obvykle převyšující hladinu dosahovanou v periodické kultivaci, přičemž objem média ve fermentoru se kontinuálním průtokem vymění za cca 3,5 až 5 hodin, tzn., že produktivita zařízení se zvyšuje minimálně 4 x, neboť ve srovnání s jednorázovou kultivací, kde vlastní fermentace trvá 18 až 24 hodin, se ušetří i čas nutný k vypouštění fermentoru, jeho vyčištění, napouštění nového média, jeho sterilizace a zaočkování.

P Ř E D M Ě T V Y N Á Ě Z U

1. Způsob kontinuální výroby α -amylázy fermentací mikroorganismů, vyznačený tím, že produkční aktivita kontinuálně fermentovaného mikroorganismu, který produkuje α -amylázu, se udržuje regulací zředovací rychlosti v rozmezí mezi 0,18 až 0,32 h⁻¹, hladina redukujících cukrů v médiu, přepočtená na maltózu, v průběhu kontinuálního procesu se udržuje maximálně na 3 g/l a pH se řídí autoregulací v rozmezí 7,2 až 7,8.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že jako mikroorganismus se použije kmen *Bacillus amyloliquefaciens* CCM 3502.