



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

205 577

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 13.11 78
(21) PV 7359-78

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/26

(40) Zverejnené 29 08 80
(45) Vydané 01 09 83

(75)
Autor vynálezu ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA, ŠVÁBOVÁ MÁRIA, VRÚTKY, KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc.,
AUGUSTÍN JOZEF PhMr., BRATISLAVA a MARVANOVÁ ĽUDMILA RNDr. CSc., BRNO

(54) Spôsob produkcie enzýmu α -amylázy

1

Vynález sa týka spôsobu produkcie fungálnej α -amylázy.

K produkcii α -amylázy v priemyslovom meradle sa v súčasnej dobe využíva predovšetkým bakteriálny kmeň *Bacillus subtilis*, *Streptomyces aureofaciens*, resp. *Aspergillus oryzae*. U rodu *Fusarium* je produkcia α -amylázy popísaná v literatúre u *Fusarium moniliforme* (Herhash. A. W., Acta Biol. Med. Ger. 1967/18 (1), str. 121-4), u *Fusarium Martii* (Stachowicz J. a Urbanek H., Zesz. Nauk, Univ. Lodz., Ser. 2, (1971) 42 (7), str. 61-8), u produkčného mutanta *Fusarium sp.* (Suzuki M., Kuno M., Nakao Y., Agric. Biol. Chem. (1976) 40 (2), str. 365-71) a u *Fusarium vasinfectum* (Sampathnarayanan A., Shanmugasunderan R. B., Arch. Biochem. Biophys. (1976) 118 (2), str. 317-22).

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 soli, ktorého podstatou spočíva v tom, že kmene rodu *Fusarium*:

<i>Fusarium acuminatum</i>	CCM F 357
<i>Fusarium acuminatum</i>	CCM F 423
<i>Fusarium aquaeductuum</i> var <i>medium</i>	CCM F 212

205 577

<i>Fusarium avenaceum</i>	CCM F 22
<i>Fusarium avenaceum</i>	CCM F 503
<i>Fusarium culmorum</i>	CCM F 163
<i>Fusarium culmorum</i>	CCM F 227
<i>Fusarium culmorum</i>	CCM F 553
<i>Fusarium decemcellulare</i>	CCM F 359
<i>Fusarium inflexum</i>	CCM F 574
<i>Fusarium lateritium</i>	CCM F 226
<i>Fusarium oxysporum</i>	CCM F 20
<i>Fusarium oxysporum</i>	CCM F 45
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>lycopersici</i>	CCM F 64
<i>Fusarium oxysporum</i>	CCM F 485
<i>Fusarium oxysporum</i>	CCM F 547
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	CCM F 546
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	CCM F 545
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisi</i> race 1	CCM F 65
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisi</i> race 1	CCM F 421
<i>Fusarium poae</i>	CCM F 584
<i>Fusarium sambucinum</i>	CCM F 562
<i>Fusarium semitectum</i> var. <i>majus</i>	CCM F 353
<i>Fusarium solani</i>	CCM F 454
<i>Fusarium solani</i>	CCM F 552
<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	CCM F 3
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	CCM F 554
<i>Fusarium tritinctum</i>	CCM F 352
<i>Fusarium culmorum</i>	CCM F 21
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisi</i> race 2	CCM F 422

sa kultivujú jednotlivé alebo v ich zmesi na živnej pôde obsahujúcej 0,1 až 3 hmot. % škrobu pri teplote 20 až 40 °C s výhodou 28 °C pri pH 4,5 až 6,3 s výhodou 5,2 po dobu 60 až 120 hodín, pričom α -amyláza sa získava zahustením produkčného média, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo afinitným prečistením.

Výhodou uvedeného postupu je produkcia α -amylázy aj na veľmi jednoduchých médiach neobsahujúcich α -(1 $\rightarrow$ 4) glukány, ako je poľnohospodársky odpad napr. celulóзовého typu. Uvedený spôsob umožňuje využiť filtračných techník pri izolácii biomasy.

Produkčná schopnosť uvedených kmeňov *Fusarium* je až 3,4 U/mg, pričom produkčná schopnosť známych producentov plesnovej α -amylázy napr. *Aspergillus oryzae* je 2,2 U/mg.

Príklad 1

Fusarium culmorum CCM F 163 sa pomnoží na rastovej pôde obsahujúcej 2 g gélu pripraveného sieťovaním amylózy epichlórhydrínom ponoreného do polovice výšky gélu v Yeast Nitrogen Base rastovej pôde (fa Oxoid), 0,6 g/100 ml a kultivácia prebieha na povrchu gélu po dobu

60 hodín pri teplote 28 °C (pH 5,6), kedy dochádza k stekuteniu gélu. Nahromadená biomasa (0,21 g) *Fusarium culmorum* sa použije k fermentácii na pôde obsahujúcej 10 g kukuričného výluhu, 2 g síranu amónneho, 2 g dihydrogén fosforečnanu draselného a 1 g rozpustného škrobu na 1 liter vody (pH 5,6) v 5 Erlenmajerových bankách 1 liter 200 ml produkčnej pôdy. Po 96 hodinách fermentácie na reciprokej trepačke pri 25 °C sa biomasa oddelila filtráciou a supernatant sa zrážal síranom amónnym v množstve 620 g/liter pri 15 °C. Dialyzovaný surový enzým (2-krát 24 hodín) oproti destilovanej vode (2 litre) sa lyofilizoval. Výsledná aktivita 72 IU, špecifická aktivita 0,914 IU/mg.

Príklad 2

Fusarium inflexum CCM F 574 sa pomnoží na rastovej pôde so sieťovaným gélom amylózy, tak, ako je uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že nahromadená biomasa *F. inflexum* (0,19 g) sa použije k fermentácii na pôde obsahujúcej 5 g kvasničného autolyzátu, 2 g síranu amónneho a 30 g škrobu na liter vody (pH 5,6). Po 120 hodinách fermentačného procesu pri 40 °C na reciprokej trepačke sa biomasa *F. inflexum* odstráni centrifugáciou a α -amyláza sa izolovala z filtrátu afinitnou metódou, prídavkom 20 g sieťovaného škrobu (počet glukozylových jednotiek na 1 priechu väzbu 20). Po premiešaní (10 minút) pri 7 °C (pH nastavené na 4,7) sa tekutý produkt odstránil centrifugáciou (1000 g, 5 minút), sediment sieťovaného škrobu s α -amylázou sa premyl 2-krát 300 ml 0,02 M fosforečnanovým pufrom pH 4,7. Uvoľnenie enzýmu sa previedlo 0,05 M fosforečnanovým pufrom pH 7,2 (120 ml). Po dialýze roztok α -amylázy možno zahustiť lyofilizáciou. Výsledná aktivita 42 IU, špecifická aktivita 68,5 IU/mg proteínu.

Príklad 3

Tak, ako v príklade 2, s tým rozdielom, že ako produkčný kmeň sa použije *Fusarium avenaceum* CCM F 22. Výsledná aktivita 38 IU, špecifická aktivita 27,5 IU/mg proteínu.

Význam vynálezu spočíva v tom, že α -amyláza získaná podľa vynálezu má význam v pivovarníctve na prípravu sirupov, štiav a sladidiel a v poľnohospodárstve pri komplexnom zužitkovaní poľnohospodárskych odpadov v procese sacharifikácie.

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 kmeňe rodu *Fusarium*:

<i>Fusarium acuminatum</i>	CCM F 357
" <i>acuminatum</i>	CCM F 423
" <i>aquaeductum</i> var <i>medium</i>	CCM F 212
" <i>avenaceum</i>	CCM F 22
" <i>avenaceum</i>	CCM F 503
" <i>culmorum</i>	CCM F 163
" <i>culmorum</i>	CCM F 227

205 577

<i>Fusarium culmorum</i>	CCM F 553
" <i>decemcellulare</i>	CCM F 359
" <i>inflexum</i>	CCM F 574
" <i>lateritium</i>	CCM F 226
" <i>oxyssporum</i>	CCM F 320
" <i>oxyssporum</i>	CCM F 45
" <i>oxyssporum</i> var. <i>lycopersici</i>	CCM F 64
" <i>oxyssporum</i>	CCM F 485
" <i>oxyssporum</i>	CCM F 547
" <i>oxyssporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	CCM F 546
" <i>oxyssporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	CCM F 545
" <i>oxyssporum</i> f.sp. <i>pisii</i> race 1	CCM F 65
" <i>oxyssporum</i> f.sp. <i>pisii</i> race 1	CCM F 421
" <i>poae</i>	CCM F 584
" <i>sambucinum</i>	CCM F 562
" <i>semitectum</i> var. <i>majus</i>	CCM F 353
" <i>solani</i>	CCM F 454
" <i>solani</i>	CCM F 552
" <i>solani</i> var. <i>coeruleum</i>	CCM F 3
" <i>sporotrichioides</i>	CCM F 554
" <i>tritinetum</i>	CCM F 352
" <i>culmorum</i>	CCM F 21
" <i>oxyssporum</i> f.sp. <i>pisii</i> race 2	CCM F 422

sa kultivujú jednotlivo alebo v ich zmesi na živnej pôde obsahujúcej 0,1 až 3 hmot. % škrobu pri teplote 20 až 40 °C s výhodou 28 °C pri pH 4,5 až 6,3 s výhodou 5,2 po dobu 60 až 120 hodín, pričom α -amyláza sa získa zahustením produkčného média, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo afinitným prečistením.