



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

230889
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/30

(22) Prihlášené 10 01 83
(21) (PV 150-83)

(40) Zverejnené 13 01 84

(45) Vydané 15 11 86

{75}

Autor vynálezu

ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE, KUNIAK LUDOVÍT ing. CSc.,
BRATISLAVA, MARVANOVÁ LUDMILA RNDr. CSc., BRNO

(54) Spôsob produkcie enzýmu alfa amylázy

1

2

Spôsob produkcie enzýmu alfa amylázy.
Vynález sa týka oboru mikrobiológie, chémie a biochémie sacharidov, potravinárskej a farmaceutickej chémie.

Účelom vynálezu je získanie nového enzýmu alfa amylázy schopnej hydrolyticky štiepiť alfa-1,4-glukány škrobu na maltózové oligosacharidy s vysokým zastúpením maltózy i maltotriózy.

Uvedeného účelu sa dosiahne pomocou mikroskopickej huby *Blastobotrys proliferans* z rodu *Blastobotrys* Klopotek, čeľade *Moniliaceae*, rodu *Moniliales*, triedy *Deuteromycetes*, kultivovanej na vhodných živných pôdach.

Enzým alfa amylázu možno získať o pomerne vysokej špecifickej aktivite až 4,0 nkat/mg proteínu a vhodných vlastnostiach predovšetkým na vysoké zastúpenie maltózy a maltotriózy v škrobovom hydrolyzáte.

Vynález má využitie v mikrobiológii, biochémii a chémii sacharidov, potravinárskom a farmaceutickom priemysle.

Vynález sa týka spôsobu produkcie enzýmu alfa amylázy (alfa-1,4-glukán glukánohydroláza EC 3.2.1.1) pomocou mikroskopickéj huby *Blastobotrys proliferans* kultiváciou na vhodných pôdach.

Pre priemyselnú produkciu alfa-amylázy sa používajú najčastejšie nasledovné mikroorganizmy: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptomyces aureofaciens*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* a pod.

Sú však aj iné mikroorganizmy, u ktorých doteraz nebola známa schopnosť produkovať alfa amylázu. Pomocou gélovej metódy (A. O. č. 186 059) testovania mikroorganizmov na alfa amylolytickú aktivitu sme zistili výraznú produkciu alfa amylolytickej aktivity mikroskopickou hubou *Blastobotrys proliferans*.

Blastobotrys proliferans je novopopísaný druh rodu *Blastobotrys* Klopotek čelade *Moniliaceae* rodu *Moniliales*, triedy *Deuteromycetes* [Marvanová L.: Two new *Blastobotrys* species. Transactions of the British Mycological Society **66**, 217 (1976)] izolovaný z para orechov (*Bertholletia excelsa*) z poškodeného jadra. O produkciu hydroláz polysacharidov uvedeným druhom *Blastobotrys proliferans* nie je zatiaľ nič známe.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že kultiváciou kmeňa *Blastobotrys proliferans* CCMF-493, deponovaný ako CBS 522-75 v Holandsku a ATCC 34 216 v zbierke typových kultúr USA na živnej pôde obsahujúcej 1-4)- α -D-glukán ako induktor enzýmu pri teplote 37 °C a hodnote pH 4,8 po dobu 48 až 120 hodín produkuje enzým alfa amylázu, ktorý sa získa v surovom stave odparením rastovej pôdy prípadne v zušľachtenom stave zrážaním síranom amónnym, alebo organickými rozpúšťadlami, s výhodou etanolu a acetónu.

K ďalšej purifikácii nového enzýmu možno použiť napríklad afinitnej metódy.

Uvedený kmeň *Blastobotrys proliferans* predstavuje alternatívne využitie v procesoch produkcie alfa amylázy, napríklad sacharifikácie polysacharidov škrobu. Použitie takto získanej alfa amylázy, predovšetkým v čistom stave, je vhodné pri výrobe alternatívnych sladidiel, a to s ohľadom na vysoké zastúpenie maltózy a maltotriózy v enzymatickom hydrolyzáte (až 55 %). Táto skutočnosť zvyhodňuje využitie enzymového produktu tam, kde vysoký obsah glukózy v hydrolyzáte nie je želaný (dietná strava pre fenylketonurikov, bombonársky sirup a pod.). Výhodné zloženie hydrolyzátu predurčuje enzymatickú hydrolýzu pomocou alfa amylázy *Blastobotrys proliferans* k príprave vzácnych oligosacharidov maltóзовého typu. Na druhej strane výhodou je skutočnosť, že nový preparát obsahuje aj alfa glukozidázu (alfa-glukozid glukohydroláza EC 3.2.1.20) a možno preto neprečistený enzým využiť k sacharifikácii 1-4)- α -D-glukánov škrobu až na glukózu.

Príklad 1

Blastobotrys proliferans CCMF-493 sa pomnoží na rastovej pôde obsahujúcej 2 g gélu pripraveného sieťovaním amylázy (A. O. čís. 186 059) ponoreného do polovice výšky do Yaest Nitrogen Base rastovej pôdy (Oxoid), pH 4,8, 0,6 g/100 ml a kultivuje sa povrchovo po dobu 48 hodín pri teplote 37 °C, kedy dochádza k stekutiu gélu. Nahromadená biomasa (0,07 g) sa použije k fermentácii na pôde obsahujúcej 22 g kukuričného výluhu a 2 g zemiakového škrobu a 0,5 g KH_2PO_4 na 1 liter vody (pH 4,8) po dobu 72 hodín. Po 72. hodinách sa biomasa *Blastobotrys proliferans* odfiltruje a surový enzým alfa amyláza sa získa odparením fermentačnej pôdy na vakuovej odparke (celková aktivita 1,8 nkat/1 l, špecifická aktivita 2,6 nkat/1 mg proteínu).

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako fermentačná pôda sa použijú gluténové vypalky (18 %), 3 g škrobu a 0,5 g KH_2PO_4 v 1 l vody (pH 4,8), pričom fermentácia beží po dobu 120 hodín. Surový enzým alfa amyláza má celkovú aktivitu 2,2 $\mu\text{kat}/1\text{ l}$ a špecifickú aktivitu 3,5 nkat/1 mg proteínu.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že získaná fermentačná pôda sa spracováva srážaním etanolom v objemových pomeroch etanol ku fermentačnej pôde 2 : 1. Získaný precipitát po presušení sa spracováva afinitnou metódou (A. O. č. 157 955) a zušľachtená alfa amyláza má aktivitu 1,6 μkat a špecifickú aktivitu 4,0 nkat/mg, pričom neobsahuje viac ako 0,05 nkat α -glukozidázovej aktivity.

Príklad 4

Postup podľa príkladu 3 s tým rozdielom, že k zrážaniu enzýmu sa použije acetón. Získaná zušľachtená alfa amyláza má aktivitu tak, ako je uvedené v príklade 3.

Príklad 5

Postup podľa príkladu 3 s tým rozdielom, že k zrážaniu sa použije síran amónny o stupni saturácie 0,7. Získaná zušľachtená alfa amyláza má aktivitu a špecifickú aktivitu tak, ako je uvedené v príklade 3.

Vynález má využitie jednak pri príprave alfa amylázy osobitných vlastností pre základný výskum, príprave vzácnych cukrov, resp. príprave zmesných cukrov pre potravinárske a farmaceutické účely.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob produkcie enzýmu alfa amylázy pomocou mikroskopickéj huby *Blastobotrys proliferans*, vyznačený tým, že sa kultivuje kmeň *Blastobotrys proliferans* CCMF-493 na živnej pôde obsahujúcej (1→4)- α -D-glukán ako induktor enzýmu pri teplote 37 °C a hodnote pH 4,8 po dobu 48 až 120 hodín a en-

zým alfa amyláza sa získava v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne v prečistenom stave zrážaním síranom amonným, alebo organickými rozpúšťadlami, s výhodou etanolom alebo acetónom a v čistom stave použitím afinitnej metódy.