



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

204148
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/28

(22) Prihlásené 03 06 77

(21) (PV 3651-77)

(40) Zverejnené 31 07 80

(45) Vydané 15 12 83

(75)
Autor vynálezu

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA Dr. Sc., BRATISLAVA,
ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA, AUGUSTÍN JOZEF PhMr. a
KUNIAK LUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob produkcie enzýmu α -amylázy

1

Vynález sa týka spôsobu produkcie enzýmu α -amylázy pomocou kvasinkovitého organizmu *Cryptococcus luteolus*.

V súčasnej dobe sa enzým alfa-amyláza získava izoláciou z produkčného prostredia baktérie *Bacillus subtilis* a *Streptococcus aureofaciens*. Produkcia alfa-amylázy je popísaná u niektorých kmeňov bývalého rodu *Endomycopsis*. Je to *Endomycopsis capsularis* (dnes *Saccharomycopsis capsularis*), popísaný H. Ebertovou [Folia microbiologica 11: 422—428, 1966], ďalej *Endomycopsis fibuliger* (dnes *Saccharomycopsis fibuliger*), *Endomycopsis javanensis* (dnes *Arthroascus javanensis*), *Endomycopsis lindneri* (dnes je to synonymum pre *Saccharomycopsis fibuliger*) a *Endomycopsis hordei* (dnes *Saccharomycopsis fibuliger* var. *hordei*), popísaná E. Matsutani, M. Sato a F. Hatori (US pat. 3 297 547) a konečne u *Schwanniomyces occidentalis* a *Schwanniomyces alluvius*. Nevýhodou spôsobov produkcie α -amylázy u týchto kmeňov je pomerne nízka aktivita α -amylázy, vysoká koncentrácia zdrojov uhlíka a zložitá separácia biomasy.

Uvedené nevýhody odstraňuje spôsob produkcie α -amylázy na tekutej živnej pôde, obsahujúcej zdroje asimilovateľného uhlíka, komplexné zdroje dusíka a minerálne živné soli, ktorého podstata spočíva v tom, že

2

kmeň *Cryptococcus luteolus* CCY 17-6-2b sa kultivuje na živnej pôde obsahujúcej 0,8 až 3 hmot. % kukuričného škrobu pri teplote 20 až 38 °C, po dobu 48 až 120 hodín, pri pH 4,7 až 6,8, pričom sa enzým α -amyláza získa odparením rastovej pôdy, alebo zrážaním síranom amónnym, alebo afinitným prečistením na sieťovanom škrobe.

Uvedený kmeň *Cryptococcus luteolus* 17-6-2b je uložený v čl. zbierke kvasiniek a kvasinkovitých organizmov v Bratislave.

Pôvodný kmeň *Cryptococcus luteolus* CCY 17-6-2, ktorý je saprofytického pôvodu, bol izolovaný z pôdy. Bol vyšľachtený trojnásobným pasážovaním na pôde pripravenej z 8 % gélu amylázy sieťovanej epichlórhydrínom, ponorenej do syntetickej Yeast Nitrogen Base (0,6 g/100 ml) pôdy pri teplote 20 až 38 °C, po dobu 48 až 120 hodín a pH 4,7 až 6,8. Nový vyšľachtený kmeň bol označený ako *Cryptococcus luteolus* CCY 17-6-2b.

Kmeň *Cryptococcus luteolus* CCY 17-6-2b má buňky oválne až pretiahle, málo jednotné. V tekutom prostredí tvorí prstenec až sliznatý povlak, na pevnom prostredí je sliznatý a krémovo žltastý. Nekvasí cukry. Asimiluje okrem D-glukózy ešte D-galaktózu, maltózu, sacharózu, laktózu, melibiózu, celobiózu, trehalózu, melezitózu, D-xyulózu, D-manitol, L-lyzín, rafinózu. Polysacharid, vy-

tváraný okolo buniek dáva jódšrobú reakciu. Neasimiluje ani 1-sorbózu, ani dusičňan draselný. K rastu potrebuje vitamíny v prostredí. Optimálna teplota rastu je 23 °C pri 5 °C alebo pri 42 °C nerastie. Produkuje ureázu, aktivita katalázy je vysoká, stekuje želatínu a rýchle autolyzuje.

Výhodou spôsobu produkcie α -amylázy podľa vynálezu je: pomerne vysoká aktivita α -amylázy aj pri práci s jednoduchými fermentačnými pôdami, o nižšej koncentrácii zdroja uhlíka ako u fermentačných pôd napríklad pre *Bacillus subtilis*; jednoduchšia separácia biomasy po ukončení fermentačného procesu; výhodnejší charakter produktu amylolytickej reakcie katalyzovanej enzýmom z *Cryptococcus luteolus* (obsah D-glukózy až 34 %) ako u α -amylázy *Bacillus subtilis*; možnosť využitia biomasy na krmovinárske účely.

Príklad 1

Z vypratého gélu pripraveného zo sieťovaného $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glukánu podľa A. O. číslo 186 059, sa vyrežú trojúhelníkové profily o hrane 1,5 cm a vložia do Petriho misky a zalejú sa roztokom kultivačnej tekutiny Yeast Nitrogen Base (Difco), 0,657 g na 100 ml destilovanej vody. Gély sa ponoria asi do polovice svojej výšky. Po trojnásobne opakovanej sterilizácii pri 100 °C v pare (1 hodina) sa očkuje na povrch gélu kultúra *Cryptococcus luteolus* CCY 17-6-2b a inkubuje sa pri 23 °C po dobu 48 hodín. Namnožená biomasa *C. luteolus* na stekutenom géli (0,21 gramu) sa použila ako inokulum na produkčnú pôdu (2 l), pozostávajúcu z 0,8 % kukuričného výluhu, 0,8 % kukuričného škrobu, 0,2 % síranu amónneho a 0,3 % dihydrofosforečnanu draselného vo vode (pH

6,1). Kultivácia prebiehala po dobu 85 hodín pri 25 °C. Po ukončení kultivácie sa biomasa *C. luteolus* odstránila centrifugáciou (3000 gramov, 5 min.) a supernatant sa zahustil na vákuovej odparke. Získaný surový enzým α -amyláza mal celkovú aktivitu 34,3 U a špecifickú aktivitu 0,081 U/mg.

Príklad 2

Postupovalo sa tak ako v príklade 1, s tým rozdielom, že kmeň *Cryptococcus luteolus* CCY 17-6-2b sa kultivuje na živnej pôde obsahujúcej 2 % kukuričného škrobu pri teplote 20 °C po dobu 120 hodín a pH 4,7. Namiesto zahustenia vo vákuovej odparke sa enzýmový preparát spracováva ďalej afinitnou metódou za využitia sieťovaného škrobu (AO č. 157 955). Získaný prečistený enzým mal špecifickú aktivitu 11,4 U/mg.

Príklad 3

Postupovalo sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že kultivácia sa prevádzala na živnej pôde obsahujúcej 3 % kukuričného škrobu pri teplote 38 °C po dobu 60 hodín a pH 6,8. Enzým α -amyláza sa získava zrážaním so síranom amónnym (680 g/l). Získaný enzýmový preparát mal špecifickú aktivitu 0,11 U/mg.

Význam vynálezu spočíva v použití α -amylázy v potravinárstve (pečivársky a pivovarský priemysel), príprava sirupov apod.) a v textilnom priemysle. Amylázový hydrolyzáť sa používa k príprave atypických sladidiel a čistých oligosacharidov (maltóza, maltotrióza, maltotetraóza) ako aj D-glukózy s využitím v chémii sacharidov a v klinickej praxi.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob produkcie enzýmu α -amylázy na tekutej živnej pôde obsahujúcej zdroje asimilovateľného uhlíka, komplexné zdroje dusíka a minerálne živné soli, vyznačujúci sa tým, že kmeň *Cryptococcus luteolus* CCY 17-6-2b sa kultivuje na živnej pôde obsahu-

júcej 0,8 až 3 hmot. % kukuričného škrobu pri teplote 20 až 38 °C po dobu 48 až 120 hodín pri pH 4,7 až 6,8, pričom sa enzým α -amyláza získava odparením rastovej pôdy, alebo zrážaním síranom amónnym, alebo afinitným prečistením na sieťovanom škrobe.