



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

205298

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 N 9/26

/22/ Prihlášené 21 02 77  
/21/ • /PV 1112-77/

(40) Zverejnené 29 08 80

(45) Vydané 15 11 82

(75)  
Autor vynálezu

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. DrSc., BRATISLAVA,  
ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA, AUGUSTÍN JOZEF PhMr.  
a KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA

## (54) Spôsob produkcie $\alpha$ -amylázy

Vynález sa týka spôsobu produkcie alfa-amylázy.

V súčasnej dobe sa enzým alfa-amyláza získava izoláciou z produkčného prostredia baktérie *Bacillus subtilis* a *Streptomyces aureofaciens*. Spôsob produkcie alfa-amylázy je popísaný tiež u kmeňa *Saccharomycopsis capsularis* /H. Ebertová, *Folia microbiologica* 11:422-438, 1966/, *Saccharomycopsis fibuliger* a *Saccharomycopsis fibuliger* var. var. *hordei* /US patent číslo 3 297 547/. Nevýhodou produkcie alfa-amylázy baktériami je horšia separácia biomasy z kultivačnej pôdy a nižšia sacharifikačná schopnosť získanej alfa-amylázy.

Uvedené nevýhody odstraňuje spôsob produkcie alfa-amylázy na tekutej živnej pôde obsahujúcej zdroje asimilovateľného uhlíka a dusíka a minerálne živné soli, ktorého podstata spočíva v tom, že kmene *Schwanniomyces occidentalis* CCY 47-1-1 a CCY 47-1-4 a *Schwanniomyces alluvius* CCY 47-2-1 sa kultivujú jednotlivo alebo v ich zmesi na živnej pôde obsahujúcej 0,1 až 3 hmot. % rozpustného škrobu pri teplote 25 až 35 °C, pH 5 až 7, po dobu 48 až 60 hodín, pričom alfa-amyláza sa získa odparením rastovej pôdy, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo afinitným prečistením.

Výhodou uvedeného spôsobu produkcie alfa-amylázy je jednoduchá separácia biomasy od kultivačnej pôdy, zdravotná nezávadnosť biomasy oproti plesňovým fermentáciám a skutočnosť, že reakčný amylolytický produkt alfa-amylázy zo *Schwanniomyces* je bohatý na maltózu. Získaná aktivita alfa-amylázy je 44 U a špecifická aktivita je 2,9 U/mg biomasy, čo sa vyrovná produkčnej schopnosti plesňových producentov.

### Pr í k l a d 1

Z vypracovaného gélu z amylózy sa vyrežú trojúhelníkové profily o hrane 1,5 cm, vložia  
205298

do Petriho misky a zalejú sa roztokom kultivačnej pôdy "Yeast nitrogen base", Difco; 0,657 g na 100 ml destilovanej vody. Gély sa ponoria asi do poloviny svojej výšky. Po trojnásobnej opakovanej sterilizácii pri 100 °C v pare sa očkuje na povrchu gélu kultúra *Schwanniomyces occidentalis* CCY 47-1-1 a kultivuje sa pri 30 °C. Skvapalnená kultúra sa mikroskopicky kontroluje na biologickú čistotu a použije ako inokulum na pôdu obsahujúcu 1 % corn steep, 0,5 % síran amónny a 0,2 % dihydrofosforečnan draselný a 1 % rozpustený škrob /na 0,2 l/ v Erlenmayerovej banke /1 l/, pH nastavené na 6,2. Po 48 hodinách kultivácii pri 28 °C sa biomasa *Schwanniomyces occidentalis* odstráni centrifugáciou a získaný supernatant, obsahujúci alfa-amylázu, sa spracuje. Surový enzým sa získa zahustením kultivačnej pôdy na vákuovej odparke, alebo vyzrážaním so síranom amónnym pri 58 % saturácii síranu amónneho. Prečistený enzým možno získať za využitia afinitnej metódy.

Výhoda prípravy inokula na pôde, pozostávajúcej zo sieťovanej amylózy, spočíva v tom, že uvedený polysacharid je využiteľný predovšetkým populáciou o vysokej produkcii alfa-amylázy, ktorá sa relatívne oproti menej produkčnej populácii v rámci predkultivácie pomnoží.

#### P r í k l a d 2

Postupuje sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že kmeň *Schwanniomyces alluvius* CCY 47-2-1 sa kultivuje na živnej pôde obsahujúcej 10 g na 1 liter rozpustného škrobu, pri teplote 35 °C, pH = 5, počas 55 hodín.

#### P r í k l a d 3

Postupuje sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že *Schwanniomyces occidentalis* CCY 47-1-4 sa kultivuje na živnej pôde s obsahom 30 g na 1 l rozpustného škrobu, pri teplote 25 °C, pH 7, po dobu 60 hodín.

#### P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob produkcie alfa-amylázy na tekutej živnej pôde obsahujúcej zdroje asimilovateľného uhlíka a dusíka a minerálne soli, vyznačujúci sa tým, že kmene *Schwanniomyces occidentalis* CCY 47-1-1 a CCY 47-1-4 a *Schwanniomyces alluvius* sa kultivujú jednotlivito alebo v ich zmesi na živnej pôde obsahujúcej 0,1 až 3 hmotnostná % rozpustného škrobu pri teplote 25 až 35 °C, pH 5 až 7, po dobu 48 až 60 hodín, pričom alfa-amyláza sa získa odparením rastovej pôdy, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo afinitným prečistením.