

ČESKOSLOVENSKÁ  
SOCIALISTICKÁ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

267 799

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 N 9/28

(21) PV 8264-88.M

(22) Prihlášené 14 12 88

(40) Zverejnené 12 07 89

(45) Vydané 02 07 90

(75)  
Autor vynálezu

ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE,  
POVAŽANOVÁ VIERA ing., KRUPINA,  
POLÍVKA LUDOVÍT doc. ing. CSc., TRNAVA,  
KOČAN JOZEF RNDr., SMOLENICE

(54)

Spôsob tepelnej stabilizácie aktivity  
enzýmu alfa-amylázy

(57) Riešenie sa týka spôsobu tepelnej stabilizácie enzýmu alfa-amylázy v prostredí vodných roztokov organických zlúčenín s dvoma až tromi hydroxylovými skupinami za prítomnosti chloridu vápenatého. Postup má využitie v textilnom priemysle pri odstraňovaní škrobových šliocht.

Vynález sa týka spôsobu tepelnej stabilizácie aktivity technického preparátu alfa-amylázy alfa-1,4-glukan glukohydroláza, EC 3.2.1.1., ktorý sa používa v textilnom priemysle v procese odstraňovania škrobových šliacht.

K odstraňovaniu škrobových šliacht sa používajú nestabilizované preparáty alfa-amylázy produkované niektorými metofilnými kmeňmi rodu *Bacillus*. Nevýhodou týchto enzýmov je, že neznášajú vyššie teploty, pri teplotách nad 60 °C sa tepelne denaturujú a v dôsledku toho strácajú svoje katalytické vlastnosti. Nie sú preto využiteľné v procesoch, kde odštieňovanie sa prevádza pri teplotách vyšších ako 70 °C. Existujú pritom celý rad metód k stabilizácii enzýmových aktivít. Tieto metódy využívajú chemické, fyzikálne alebo fyzikálno-chemické postupy k tepelnej stabilizácii enzýmových aktivít. Moderná koncepcia termostability enzýmov sa odvodzuje od dvoch základných teórií:

1. Zvýšená stabilita enzýmov sa pripisuje spoluúčasti ďalších zložiek bunky (lipidov, polysacharidov, proteínov apod.) na subcelulárnej úrovni. Výsledkom takto prirodzene imobilizovaných systémov, napr. v biomembránach je skutočnosť, že v týchto štruktúrach dochádza k uchovaniu katalytickej aktívnej konformácie aktívneho centra aj za teplotne extrémnych podmienok. Ovlivnením interakcií enzýmového proteínu s nosičom možno regulovať počet konformačných fluktuácií a tým potlačiť u enzýmov denaturačný prechod tak reverzibilného (Davidov, R.M., Vesterman, B.G., Genkin, M.V., Blumenfeld, L.A., Krylov, O.V.: Dokl. Akad. Nauk SSSR, 256, 491, 1981) ako aj ireverzibilného charakteru (Martinek, K., Klíbanov, A.M., Goldmacher, V.S., Berezin, I.V.: Biochim. Biophys. Acta, 485, 1 1977).
2. U termofilných mikroorganizmov sa zvýšená termostabilita enzýmov, katalytickou špecifitou analogických enzýmov produkovaných mezofilnými organizmami, odvodzuje od čiastočne pozmenenej konformácie, ktorá na úrovni primárnej štruktúry sa odlišuje od obdobných proteínov, produkovaných mezofilnými organizmami. Tak napr. termostabilná alfa-amyláza z *Bacillus stearothermophilus* (Manning, G.B., Campbell, L.L.: J. Biol. Chem. 236, 2952 1961) má na rozdiel od alfa-amylázy z *Bacillus subtilis* nezloženú štruktúrou, blízkou tzv. "random coil", u viacerých ďalších enzýmov z termofilných organizmov sa popisuje práve globulárna štruktúra enzýmového proteínu. U enzýmov niektorých termostabilných mikroorganizmov sa popisuje niekedy rigidnejšia štruktúra proteínu, ani tento aspekt (ako sa však zistilo pri detailnejších štúdiách) nemá obecnú platnosť (Amelunxen, R.E., Murdock, A.L.: Microbial life at extreme environments, Kasher, D. ed., Academic Press, London, New York, San Francisco, 217, 1978).

Z uvedeného teoretického prehľadu vyplýva, že existuje celý rad obecných techník, ktoré však v konkrétnych prípadoch stabilizácie enzýmov nie sú využiteľné z technických alebo ekonomických dôvodov.

V prípade tepelnej stabilizácie aktivity alfa-amylázy produkovanej mezofilnými zástupcami rodu *Bacillus*, uvedené nedostatky odstraňuje postup podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že enzýmový proteín alfa-amylázy o aktivite 0,5  $\mu$ kat až 1mkat sa rozpustí vo vodnom roztoku o objeme 1 dm<sup>3</sup> organických di- alebo trihydroxy-zlúčenín, napr. glykolu, dietylenglykolu, trietylenglykolu, glycerolu a to jednotlivo alebo ich zmesi o koncentrácii 0,1 až 10 % hmot. s obsahom chloridu vápenatého o koncentrácii 5 až 50 mmol.l<sup>-1</sup>. Uvedeným zásahom sa teplotné optimum alfa-amylázy predĺži od 40 °C až po 100 °C. Výhodou uvedeného postupu je jeho technická nenáročnosť, jednoduchosť prevedenia a skutočnosť, že teplotná závislosť aktivity takto upravenej alfa-amylázy vykazuje súvislú úroveň v širokom rozsahu teplôt, prakticky od 30 °C až po 100 °C. Výhodou je aj ekonomická nenáročnosť použitých vstupných surovín.

## Príklad 1

Enzým alfa-amyláza (*Bacillus subtilis*), 2 g o aktivite 0,5  $\mu$ kat sa rozpustí vo vodnom roztoku monoetylenglykolu (etán-1,2-diol, 1 dm<sup>3</sup>) o koncentrácii 0,1 % hmot. obsahujúcom chlorid vápenatý o koncentrácii 50 mmol.l<sup>-1</sup>. Zatiaľ čo pôvodný enzým stráca katalytickú aktivitu pri expozícii na 90 °C po dobu 5 minút, alfa-amyláza upravená uvedeným spôsobom si zachováva katalytickú aktivitu bez poklesu s porovnaním s aktivitou pri 30 °C aj pri expozícii na 100 °C po dobu 5 minút.

## Príklad 2

Enzým alfa-amyláza z *Bacillus licheniformis*, 1 g o aktivite 1 mkat sa rozpustí vo vodnom roztoku dietylenglykolu (2,2'-bis/etanol/éter, 1 dm<sup>3</sup>) o koncentrácii 5 % hmot. obsahujúcom chlorid vápenatý o koncentrácii 10 mmol.l<sup>-1</sup>. Zatiaľ čo pôvodný enzým stráca svoju aktivitu pri expozícii na 85 °C po dobu 5 minút, alfa-amyláza upravená uvedeným spôsobom si zachováva svoju katalytickú aktivitu bez poklesu s porovnaním s aktivitou pri 30 °C aj pri expozícii na 100 °C po dobu 10 minút.

## Príklad 3

Enzým alfa-amyláza z *Bacillus subtilis*, 1,5 g o aktivite 50  $\mu$ kat sa rozpustí vo vodnom roztoku trietylenglykolu (1,8-dihydroxy-3,6-dioxa-oktán, 1 dm<sup>3</sup>) o koncentrácii 10 % hmot. obsahujúcom chlorid vápenatý o koncentrácii 5 mmol.l<sup>-1</sup>. Zatiaľ čo pôvodný enzým stratil aktivitu pri expozícii na 90 °C po dobu 5 min., alfa-amyláza upravená uvedeným spôsobom si zachováva svoju katalytickú aktivitu bez poklesu s porovnaním s aktivitou pri 30 °C aj pri expozícii na 100 °C po dobu 5 minút.

## Príklad 4

Postupuje sa podľa príkladu 1, s tým rozdielom, že sa použije alfa-amyláza z *Bacillus stearothermophilus*, 2 g o aktivite 10  $\mu$ kat a k stabilizácii namiesto monoetylenglykolu sa použije glycerol.

## Príklad 5

Postupuje sa podľa príkladu 2 s tým rozdielom, že sa k stabilizácii použije ekvimolárna zmes monoetylenglykolu, dietylenglykolu, trietylenglykolu a glycerolu o úhrnnej koncentrácii 5 % hmot. Enzým alfa-amyláza stabilizovaný v uvedenom prostredí si zachováva svoju enzýmovú aktivitu bez poklesu aj pri expozícii na 100 °C po dobu 10 minút.

Vynález má využitie v procese stabilizácie alfa-amylázovej aktivity voči účinku vyšších teplôt, napríklad pre proces odstraňovania škrobových šlicht pri zvýšenej teplote.

## P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob tepelnej stabilizácie aktivity alfa-amylázy vyznačený tým, že enzýmový proteín alfa-amylázy o aktivite 0,5  $\mu$ kat až 1 mkat sa rozpustí vo vodnom roztoku 1 dm<sup>3</sup> organických di- alebo trihydroxy-zlúčenín, napr. glykolu, tj. etán-1,2-diolu, dietylenglykolu, tj. 1,5-dihydroxy-3-oxapentánu, trietylenglykolu, tj. 1,8-dihydroxy-3,6-dioxa-oktánu, glycerolu, jednotlivo alebo v ich ľubovoľnej zmesi o koncentrácii 0,1 až 10 % hmot. s obsahom chloridu vápenatého o koncentrácii 5 až 50 mmol.l<sup>-1</sup>.