



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

205 315

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 24 06 77

(21) PV 4192-77

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/26

(40) Zverejnené 29 08 80

(45) Vydané 01 08 83

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

(54) Spôsob produkcie α -amylázy

1

Vynález sa týka spôsobu produkcie α -amylázy. V súčasnej dobe sa enzým α -amyláza získava izoláciou z produkčného prostredia baktérie *Bacillus subtilis* a *Streptomyces aureofaciens*. Spôsob produkcie α -amylázy je tiež popísaný u kmeňa *Saccharomycopsis capsularis* (H. Ebertová, *Folia mikrobiologica* 11:422-438, 1966), *Saccharomycopsis fibuliger* a *Saccharomycopsis fibuliger* var. *hordei* (US patent č. 32975 47). Nevýhodou spôsobu produkcie α -amylázy baktériami je horšia separácia biomasy z kultivačnej pôdy a nižšia sacharifikačná schopnosť získanej α -amylázy.

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

<i>Botrytis allii</i>	CCM F - 17
" <i>fabae</i>	CCM F - 59
" <i>byssoides</i>	CCM F - 14
" <i>squamosa</i>	CCM F - 15
" <i>convallariae</i>	CCM F - 345
" <i>globosa</i>	CCM F - 346
" <i>paeoniae</i>	CCM F - 02168
" <i>cinerea</i>	CCM F - 314

205 315	<i>Botrytis cf. narcissicola</i>	CCM F - 597
"	<i>cf. narcissicola</i>	CCM F - 598

sa kultivujú jednotlivito alebo v zmesi na živnej pôde obsahujúcej 0,1 až 3 hmot. % rozpustného škrobu pri teplote 20 až 40 °C, pH 4 až 5 po dobu 60 až 120 hodín, pričom α -amyláza sa získa zahustením produkčného média, prípadne vyzrážaním acetónom alebo etanolom alebo adsorbciou na sieťovaný škrob.

Kmene *Botrytis* použité k produkcii α -amylázy sú uložené v čs. zbierke mikroorganizmov, Univerzita J. E. Purkyně, Brno, Obránců míru 10.

Výhodou uvedeného spôsobu produkcie α -amylázy je jednoduchá separácia biomasy od kultivačnej pôdy, zdravotná nezávadnosť biomasy oproti plesňovým fermentáciám, pričom produkčná schopnosť uvedených kmeňov sa vyrovná produkčnej schopnosti známych producentov α -amylázy, ktorá je 2,2 U/mg biomasy.

Príklad 1

Z vypratého gélu amylozy pripraveného podľa AO 186 059, 1978 sa vyrežú trojuholníkové profily o strane 4 cm, vložia sa do Petriho misky a zalejú sa roztokom kultivačnej pôdy Yeast Nitrogen Base 0,6 g/100 ml (Oxoid) s gélom amylozy ako jediným zdrojom uhlíka tak, aby pol gélu vyčnievalo nad hladinu kultivačného roztoku. Po sterilizácii pri 100 °C sa očkuje na povrch kultúra *Botrytis squamosa* CCM F - 15 a kultivuje sa pri 25 °C. Amylózový gél je skvapalnený v priebehu 32 hodín účinkom enzýmu α -amylázy produkovaného do média a získaná biomasa *Botrytis squamosa* CCM F - 15 sa použila ako inokulum na pôdu obsahujúcu 25 g vylisovaných hroznových šupiek, 0,2 g chloridu amónneho, dihydrogénfosforečnanu draselného v 200 ml 0,2 % roztoku škrobu vo vode (pH je upravené na 5,0), za povrchovej kultivácie po dobu 96 hodín pri teplote 20 °C α -amyláza sa vylučuje do média. Po ukončení kultivácie sa biomasa odstráni filtráciou. Filtrát sa ďalej prečistil centrifugáciou (5000 g, 10 minút) od zvyškov z hroznových šupiek a nezým sa získal buď zrážaním acetónom (600 ml) alebo v prečistenom stave afinitnou metódou za aplikácie postupu podľa (AO č. 157 955, 1974). Výsledná aktivita α -amylázy 89 U, špecifická aktivita 6,3 U/mg.

Príklad 2

Postupovalo sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že kmene *Botrytis allii* CCM F - 17, *Botrytis fabae* CCM F - 59 a *Botrytis cynerea* CCM F - 314 sa kultivujú na živnej pôde obsahujúcej 3 % roztok škrobu vo vode pri pH = 4, pri teplote 40 °C počas 120 hodín. Špecifická aktivita α -amylázy je 12,1 U/mg.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob produkcie α -amylázy na tekutej živnej pôde obsahujúcej zdroje asimilovateľného uhlíka a dusíka a minerálne živné soli, vyznačujúci sa tým, že kmene

<i>Botrytis allii</i>	CCM F - 17
" <i>fabae</i>	CCM F - 59

Botrytis byssoidea	CCM F - 14
" squamosa	CCM F - 15
" convallariae	CCM F - 345
" globosa	CCM F - 346
" paeoniae	CCM F - 02168
" cinarea	CCM F - 314
" cf. narcissicola	CCM F - 597
" cf. narcissicola	CCM F - 598

sa kultivujú jednotlivě alebo v zmesi na živnej pôde obsahujúcej 0,1 až 3 hmot. % rozpustného škrobu pri teplote 20 až 40 °C, pH 4 až 5, po dobu 60 až 120 hodín, pričom α -amyláza sa získa zehustením produkčného média, prípadne vyzrážaním acetónu alebo etanolom alebo adsorbciou na sieťovaný škrob.