

Průmyslové enzymy

JIRÍ STÁRKA,

Oddělení obecné mikrobiologie biologické fakulty Karlovy university, Praha

577.15

Enzymy bakterií, kvasinek a plísní — 2. část*)

Mikrobiální enzymy mají mnoho možností uplatnění v technické praxi. Největší zájem je o plísňové a bakteriální amylázy; těmto enzymům byla věnována první část referátu [64]. Mikroorganismy jsou ovšem zdrojem téměř nepřehledné řady dalších enzymů, z nichž dosud jen některé byly studovány s praktickým aspektem. Souborné pojednání o těchto enzymech nedávno publikoval Hoogerheide [65]. Upozorníme proto jen na ty, které mají vztah k technické mikrobiologii a zejména ke kvasnému průmyslu.

Plísňové otruby (amylolytické) mají i poměrně značnou aktivitu *proteolytickou*. To platí zvláště o otrubách z *Aspergillus oryzae*. Podle našich pokusů 1 ml 10 % vodného extraktu přidáný k 5 ml 2 % kaseinové suspence rozloží 50 % kaseinu za 60 min. při mírně alkalickém pH. *Aspergillus niger* je asi 10krát slabší. Silnou *proteolytickou* aktivitu mají i aktinomyceety a byly činěny pokusy o využití jejich surového mycelia zbývajících po fermentaci antibiotik.

Komerčně vyráběné proteázy jsou převážně bakteriálního původu (*B. subtilis*). Jejich příprava je stejná opět jako u amyláz [57, 58]. Proteázy jsou však méně stabilní než amylázy a jsou proto náročnější na konečné zpracování na technicky použitelný preparát. Nejvíce se používají v koželužství, v textilním průmyslu k odstraňování želatinových lepidel a k odstraňování skvrn z oděvů a čalounů. Že ani tato poslední aplikace není maličkostí, svědčí to, že v USA činí ročně částku 1 000 000 dolarů. Pro náš potravinářský průmysl je zvlášť významné užití proteáz k hydrolyse bílkovin v pivě, aby bylo zabráněno tvorbě zákalů během skladování. Vynikajícími producenty *proteolytických* enzymů jsou aktinomyceety [48, 49] a plísně [1, 2, 3, 4], dokonce i *Penicillium notatum* [9]. Zvlášť vhodné jsou členové skupiny *Aspergillus flavus oryzae*, které lze kultivovat na půdě se sojovou moukou [5, 6], a *Aspergillus niger* [34] nebo na otrubách [7]. Selekcí vhodných kmenů se zabývalo několik prací [53, 54]. Byl připraven i krystalický preparát z *Aspergillus oryzae* typu trypsinu [8].

Pektolytické enzymy [41, 42], t. j. pektinmethylesteráza a polygalakturonáza se připravují stejně jako amylázy buď na lískách na otrubách (na př. německý Filtragol, produkt *Aspergillus wentii* a *Aspergillus aureus*), nebo submersně v tancích na pektinových substrátech. Nejvhodnější jsou penicilia a aspergily. Preparátů se užívá k čerání ovocných šťáv a moštů, v nichž pektin způsobuje nepříjemné rosolovatění. Dosud však zůstává nedořešený problém tvorby sedimentu kyseliny pektinové, který není enzymem napaden. Nicméně se těchto preparátů běžně užívá a pektolytickým enzymům je věnována velká pozornost [35, 36, 37, 38, 43]. Zdrojem může být i *Penicillium notatum* a *Penicillium chrysogenum* [39, 40].

V obchodě jsou četné preparáty (Pektinol, Polyzym, Oryzym, Pektosin, Filtrazym, Pektozym, Pectoclarol) různých vlastností a upravené k různým účelům. V roce 1954 byl v Bulharsku připraven práškový enzymový preparát Bystrin.

Poměrně málo zpráv je o mikrobiálních *lipázách*. Některé patenty uvádějí přípravu lipolytických preparátů na obilných substrátech z různých *aspergillů* [26], které se zdají i podle našich výsledků nejvhodnějšími producenty. Lipázových preparátů lze použít všude, kde nelze provést zmydlení tuku chemicky (na př. při koncentrování olejových roztoků některých vitaminů), ale též při výrobě sýrů, vydělávání koží a j. [24, 25]. Také bakteriální lipázy mohou najít uplatnění v technickém použití. Vynikajícím producentem je rod *Pseudomonas*. Někteří zástupci tohoto rodu dosahují maximální produkce lipáz za značně vysokých teplot (až 75 °C); při nižších teplotách (30 °) je tvorba zastavena, ačkoli růst je dobrý [47].

Větší zájem byl v poslední době projevem o *celulázách*. Jsou produkovány jak bakteriemi, tak houbami. Kultivovali jsme submersně celulólytické bakterie zvl. *Sporocytophaga myxococcoides* a získali metabolické tekutiny se zřetelnou aktivitou celuláz. Chromatograficky jsme sledali jako meziprodukt odbourávání celulosy i karboxymethylcelulosa, celobiosu, která je dále štěpena na glukosu. Podobně významnou aktivitu měly i naše kmeny *Aspergillus oryzae* a některé vyšší houby patříce mezi *Basidiomycetes*, které produkovaly tento enzymový systém za submersních podmínek [63]. Množí se zprávy o významných producentech celuláz [18, 19, 20, 21, 52]. Také *Aspergillus oryzae* vykazuje celulólytickou aktivitu [22, 23].

Je třeba se zmínit i o dextransacharáze, enzymu, který vylučuje do prostředí *Leuconostoc mesenteroides*. Tento enzym odštěpuje z molekuly sacharosy fruktosu a z glukosylových zbytků syntetizuje polysacharid dextran, známou náhradu krevního plazmatu. Dextransacharáza může být oddělena od buněk, aniž je tím pozměněna její syntetická aktivita, což má dalekosáhlé výhody pro výrobu dextranu hlavně při jeho čištění a preparaci k farmaceutickému použití. Aby se dosáhlo vytváření dextranu jen v určité vhodné molekulové váze, stačí přidat do reagující směsi malé množství již hotového dextranu žádaných vlastností [55]. Byl též patentován obdobný způsob, užívající celulosních bakterií *Cellvibrio fulva* [56].

Éra antibiotik přinesla potřebu jejich analytického stanovení. V případě penicilinu koná služby bakteriální *penicilináza* (z *B. cereus* a *B. subtilis*), přeměňující penicilin na kyselinu penicilinovou. Na základě jejího účinku byla vypracována rychlá metoda stanovení penicilinu. Penicilináza se vyrábí submersně, precipituje se organickými srážedly a dává se na trh jako suchý enzymový koncentrát se standardní aktivitou [32, 33]. Od roku 1951 soustřeďují na sebe zájem farmaceutického průmyslu dva enzymy, *streptokináza* a *streptodornáza*, produkované hemolytickými streptokoky a užívané k odstranění nekrotic-

*) První část byla otisknuta v Kvasném průmyslu 1 (1955), 83

kých tkání nebo pyogenních membrán na ranách a spáleninách, při čemž zdravá tkáň není napadena [13, 14, 15, 16, 66].

Některé enzymy nejsou uvolňovány mikroorganismem do prostředí v podstatném množství a jsou proto extrahovány přímo z buněk. Tohoto typu jsou především invertáza, laktáza, kataláza, glukosooxydáza a j. Buňky produkčních mikroorganismů jsou destručovány, extrahovány vhodným rozpouštědlem a enzym je z roztoku vysrážen. Invertáza může být získána i z autolysováných kvasnic pod toluenem a vysrážena alkoholem. Kataláza se vyrábí ze submersně pěstovaných plísní a bakterií a užívá se jí k některým speciálním účelům všude, kde je třeba odstranit peroxid vodíku. Glukosooxydáza, známá též pod jménem notatin, je získávána buď z mycelia penicilii produkujících penicilin, nebo z kultur *Aspergillus niger*. Jejím účinkem je glukosa oxydována na kyselinu glukonovou a vznikající H_2O_2 je zneškodněna katalázou. V průmyslovém měřítku se užívá glukosooxydázy k odstranění glukosy z vajec, určených k sušení. Glukosa ve vejcích i po vysušení reaguje s fosfolipidy (kefalin) a dává produktu nepříjemnou chuť i barvu a tak omezuje skladovací dobu hotového výrobku [10, 11, 12, 30, 50]. Glukosooxydáza se osvědčila i při stabilizaci ovocných vín [61] a při analytickém stanovení glukosy vedle jiných redukujících cukrů ve fermentačních tekutinách, syrupech a pod. [62]. Byl ohlášena i patent, užívající glukosooxydázy k přípravě kyseliny glukonové z glukosy [51].

Reaguje-li tento enzymový systém (glukosooxydáza + kataláza) s přebytkem glukosy v uzavřeném prostoru, jako je na příklad láhev piva, ovocného syru nebo kompotová konzerva, je vyčerpán téměř veškerý kyslík jak z roztoku, tak i z prostoru vyplněného vzduchem. Tak lze zabránit nevídaným změnám chuti, způsobeným oxidací.

Z dalších enzymů by bylo třeba se zmínit alespoň

o ureáze, kterou lze získat z některých mikroorganismů [46, 67], o fosfatázách a sulfatázách [44, 45], hyaluronidáze čili hyáze, užívané v lékařství, lysozymu, rozpouštějícím za živa některé bakterie [61], acylázách, štěpících acylderiváty směsi D- a L-aminokyselin na čisté L-aminokyseliny a D-acylaminokyseliny, takže je lze dále oddělit [27] a o řadě dalších enzymů, právě tak jako o dalších možnostech aplikace mikrobiálních enzymů na příklad ve farmacii [28, 29]. Tak na příklad glukuronidáza (ketodáza) se používá k odštěpení glukuronidových zbytků z komplexních ketosteroidů [60].

Zajímavou práci uveřejnil Simpson [68], který použil pentosanázy při výrobě pšeničného škrobu a zvýšil výnos ze 60 na 90 %.

Účelem tohoto referátu však není ukázat všechny a zvlášť teoretické možnosti použití mikrobiálních enzymů. Jeho snahou je podat přehled celé šířky problému a zejména zvýšit zájem o tento obor, spadající především do kvasného, ale i do farmaceutického a potravinářského průmyslu, obor, který je nyní ve stadiu počátečního růstu a vývoje a který v blízké budoucnosti nepochybně přinese další překvapení. Bylo by žádoucí, aby výrobě i výzkumu průmyslových enzymů byly u nás umožněny poloproduční zkoušky, založené na důkladném výzkumu laboratorním. Náš průmysl, jinak jistě velmi pokročilý, má zde co dohánět. Jestliže kapitalistické státy jako USA, Velká Británie a jiné vyrábějí již po celá desetiletí bohatou škálu technických enzymových preparátů i čistěných enzymů mikrobiálního původu, jistě tak nečiní se ztrátou. Příkladem nám může být i Bulharsko, které před nedávnem začalo vyrábět „bystrin“. V SSSR je ostatně vyráběna řada enzymových preparátů a máme zprávy, že jejich výzkumu je věnována značná energie [59]. Ostatně i dosažení úspěchů našich pracovníků v oboru plísňových amyláz mohou zde být význačnou pobídkou.

Literatura

- [1] Dion W. M., Can. J. Research C 28 (1950), 577.
- [2] Dion W. M., Can. J. Research C 28 (1950), 586.
- [3] Lulla B. S., Research 3 (1950), 581.
- [4] Lulla B. S., Bioch. Biophys. Acta 7 (1951), 244.
- [5] Dingle J., Solomons G. L., J. Appl. Chem. 2 (1952), 395.
- [6] Dworschack R. G. a sp., Arch. Bioch. Bophys. 41 (1953), 48.
- [7] Maxwell M. E., Australian J. Appl. Sci. 1 (1950), 348.
- [8] Crewther W. G., Lepnox F. G., Nature 165 (1950), 680.
- [9] Yuki J. Repts. Inst. Chem. Research, Kyoto Univ. 19 (1950), 103 (Chem. Abstr. 45 [1951] 5198a).
- [10] Anonym., Agr. Food Chem. 1 (1953), 194.
- [11] Anonym., Chem. Eng. News 31 (1953), 772.
- [12] Anonym., Chem. Week 72 (1953), 88.
- [13] Bernheimer A. W., Trans. N. Y. Acad. Sci. (Ser. II), 14 (1952), 137.
- [14] Anonym., Chem. Week 68 (1951), 22.
- [15] Anonym., Chem. Week 68 (1951), 29.
- [16] Elliot S. D., Trans. N. Y. Acad. Sci. (Ser. II), 14 (1952), 137.
- [17] Sherry S., Trans. N. Y. Acad. Sci. (Ser. II), 14 (1952), 138.
- [18] Saunders R. R. a sp., J. Biol. Chem. 174 (1948), 697.
- [19] Whitaker D. R., Science 116 (1952), 90.
- [20] Reese E. T. a sp., Physiol. Plantarum 5 (1952), 379.
- [21] Reese E. T., Levinson H. S., Physiol. Plantarum 5 (1952), 345.
- [22] Jermyn M. A., Australian J. Sci. Res. 5 B (1952), 409.
- [23] Jermyn M. A., Australian J. Sci. Res. 5 B (1952), 433.
- [24] Ramakrishnan C. V., Science 113 (1951), 125.
- [25] Ramakrishnan C. V., Experientia 7 (1951), 434.
- [26] Smythe C. V., Drake B. B., U. S. Pat. 2 480 090 (1949).
- [27] Neuberg C., Mandl J., Enzymologia 14 (1950), 128.
- [28] Bersin T., Südd. Apoth. Zeitg., 90 (1950), 801.
- [29] Schenck G., Deutsch. Apoth. Ztg. 25 (1953), 445.
- [30] Loesche H. W. von, Agr. Food Chem. 1 (1953), 794.
- [31] Webb M., J. Gen. Microbiol. 2 (1948), 280.
- [32] Kato K., J. Antibiot. Japan 5 (1952), 631.
- [33] Pollock M. R., Brit. J. Exp. Pathol. 34 (1953), 251.
- [34] Brockaja S. Z., Mikrobiologija 23 (1954), 153.
- [35] Wood R. K. S., Nature 167 (1951), 771.
- [36] White L. S., Fabian F. W., Appl. Microbiol. 1 (1953), 243.
- [37] Schubert E., Nature 169 (1952), 131.
- [38] Schubert E., Arch. Biochem. Biophys. 38 (1952), 78.
- [39] Phaff H. J., Arch. Biochem. 15 (1947), 67.
- [40] Lulla B. S., Johar D. S., Current Sci. 22 (1953), 79.
- [41] Lineweaver H., Jansen E. F., Adv. Enzymol. 11 (1951), 267.
- [42] Kertész Z. J., The Pectic Substances, N. York (1951).
- [43] Gaponenkov T. K., Mikrobiologija 23 (1954), 317.
- [44] Povolockaja K. L., Skorobogatova E. P., Biochimija 12 (1947), 268.
- [45] Howell A. Jr., Fitzgerald R. J., J. Bact. 66 (1953), 437.
- [46] Larson A. D., Kallio R. E., J. Bact. 68 (1954), 67.
- [47] Nashif S. A., Nelson F. E., J. Dairy Sci. 36 (1953), 459, 471, 698.
- [48] Tytell A. A. a sp., Feder. Proc. 13 (1954), 312.
- [49] Goldsmith M. T., Textile Res. J. 20 (1950), 613.
- [50] Baldwin R. R. a sp., Food Technol. 7 (1953), 275.
- [51] Baker D. L., U. S. Pat. 2 651 592 (1953).
- [52] Siu R. G. H., Reese E. T., Botan. Rev. 19 (1953), 377.
- [53] Matsushima K., Ferment. Technol. Japan 31 (1953), 367, 387, 389.
- [54] Matsushima K., Ferment. Technol. Japan 32 (1954), 14.
- [55] Tsuchiya H. M., Chem. Eng. News 31 (1953), 3960.
- [56] Anonym., Brit. Pat. 675 025 a 675 085 (1952).
- [57] Damodaran M. a sp., Bioch. Biophys. Acta 17 (1955), 99.
- [58] Grutter F. H., J. Bact. 69 (1955), 728.
- [59] Komarova L. I., Mikrobiologija 24 (1955), 646.
- [60] Warner-Chilcott Labs., inserát, N. York (1955).
- [61] Yang H. Y., Food Res. 20 (1955), 42.
- [62] Damodaran M., Singh K. J. Sci. and Ind. Res. (India) 13 B (1954), 419.
- [63] Stárka J., Č. mykologie 9 (1955), 97.
- [64] Stárka J., Kvasný průmysl 2 (1956), 83.
- [65] Hoogerheide J. C. v Industrial Fermentations, vol. 2. N. York (1954).
- [66] Pakula R. a sp., Med. Doświadc. i Mikrobiol. 6 (1954), 335.
- [67] Larson A. D., Kallio R. E., J. Bact. 68 (1954), 67.
- [68] Simpson F. J., Bact. Proceedings 24 (1954).