

## Průmyslová výroba plísňových glukogenních amyláz

MILOŠ KULHÁNEK, Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Praha

577.154.31

Problematickou přípravu glukamylázy a enzymatické hydrolýzy škrobu v glukózu se zabýval předcházející článek [1]. Toto sdělení podává přehled o vývoji a současném stavu technologie plísňových amyláz, zejména glukamylázy.

Plísňové amylázy je možno vyrábět povrchovou kultivací na tuhé živné půdě, nejčastěji otrubách nebo hloubkovou fermentací v tekutých půdách ve fermentačních tancích [2–5, 22, 23]. V laboratorním měřítku byla také popsána klidová kultivace na povrchu tekutých půd [3, 7].

Kultivaci plísně na otrubách k výrobě plísňové amylázy zavedl *Takamine* [8]. Otruby ovlhčené zředěnou kys. chlorovodíkovou se po sterilaci zaočkují sporami plísně a rozprostřou v několika-centimetrové vrstvě na perforovaných plechových tácech nebo síťových lískách. Po kultivaci v klimatizované komoře se plísňové otruby extrahují vodou, popř. s přísadou chloridu sodného. Srážením extraktu rozpouštědly (metanol, aceton, etanol, isopropanol), popř. síranem amonným a sušením při nízké teplotě se připravuje amylázový koncentrát. Nevyžaduje-li se vysokého stupně purifikace, je možno extrakt sušit rozprašováním [2, 9]. Tohoto jednoduchého a spolehlivého způsobu kultivace se používá dodnes jak v průmyslu, tak i při laboratorních pracích na přípravě plísňových otrub. Později bylo popsáno kontinuální mechanizované uspořádání kultivace na tácech [10, 11] a patentováno zařízení pro mechanizovanou výrobu amylázových preparátů povrchovou kultivací [12]. Přes tyto možnosti mechanizace používala i v tomto oboru průkopnická americká firma *Takamine Laboratory* v r. 1957 stále starého jednoduchého postupu — táci umístěných na vozíčkách v kultivačních komorách [13]. Tohoto způsobu se také používá s úspěchem v Japonsku při výrobě glukamylázy za použití kmenů *Rhizopus* [5].

Jiný způsob kultivace plísní na otrubách, kterého používal po určitou dobu i *Takamine*, je kultivace v pomalu rotujících větraných bubnech [10, 2, 5]. Pěstování na tácech dává ve srovnání s otáčivými bubny rychlejší růst a produkci enzymu [14]. Nověji je udávána jako další nevýhoda kultivace v rotačních bubnech tvorba vrstvy zmazovatělých otrub na vnitřní stěně bubnu, která podporuje růst anaerobní infekce [15] a porušování rostoucího mycelia pohybem substrátu [5]. Otáčivých bubnů se používá v některých závodech pro sterilaci a chlazení otrub a z hlediska kontaminace jejich bezpečnější zaočkování, popř. ke kultivaci v etapě klíčení spor plísně — prvních 10 až 20 hodin po zaočkování. Po naklíčení se provádí kultivace na tácech. Tímto způsobem je vyráběno velké množství takadiastázy [13, 5]. Z jiných způsobů kultivace plísní na otrubách byla zkoušena kultivace ve větraných nádobách s jalovým dnem [16, 17, 5] a v komůrkách přepažených síťovinou [9]. Jiné uspořá-

dání je při kultivaci na pohyblivých pásech [2], které se rovněž v průmyslové praxi neužalo.

Ze všech těchto způsobů přípravy amyláz na tuhém substrátu se provozně používá kultivace na lískách (tácech), jakožto nejvýhodnějšího způsobu [18]. Touto metodou byla do začátku padesátých let vyráběna většina obchodních enzymů mikrobiálního původu [19]. V dalších letech začalo se používat submersního způsobu. Jeden z největších výrobců enzymů v USA, firma *Takamine*, vyráběla v r. 1957 již více než polovinu své produkce submersní kultivací a další výstavbu uvažovala jen v tomto směru [13]. Zhruba stejný podíl na celkové průmyslové výrobě enzymů mají obě metody dosud [5]. Submersní metoda je univerzálnější, pracuje s uzavřenými fermentory a vyžaduje minimum ruční práce. Naproti tomu má značnou spotřebu energie na míchání a pohon kompresorů pro vzdušnění tlakovým vzduchem. Vyžaduje pečlivou kontrolu průběhu fermentace, která je snadno proveditelná. Kontaminace při ní jsou často vážným problémem. Metoda je výhodná, jestliže je možno použít přímo filtrát půdy bez izolace enzymu k další operaci — ke zcukerňování škrobnatých surovin v lihovarství [3], při výrobě antibiotik nebo při výrobě glukozového sirupu ze škrobu.

Při přípravě enzymatického koncentráту je zpravidla nutno fermentační půdu před izolací zahustit. Povrchová metoda naopak vyžaduje mnoho prostoru a ruční práce, používá však pouze nízkotlakých ventilátorů. Vyžaduje minimální kontrolu, která je však obtížnější [14]. Doba fermentace je při ní obvykle zhruba poloviční ve srovnání se submersním způsobem. Při přípravě glukamylázy je hlavní nevýhodou submersní metody to, že se při ní nejčastěji získají značně nižší koncentrace enzymu v substrátu než při povrchové kultivaci [5]. Pro používané plísně jsou zpravidla podmínky submersní fermentace méně fyziologické než povrchový růst a použitý kmen krotu musí být pro ně adaptován již při kultivaci v laboratoři [13]. Z téhož důvodu je k inokulaci substrátu plísní při submersní fermentaci doporučováno vegetativní, nikoli sporové inokulum, připravené i několikanásobným pasázováním za submersních podmínek [20].

Podle existujících údajů lze soudit, že v USA je glukamyláza nyní převážně vyráběna submersní fermentací za použití černých aspergilů (*Aspergillus niger*, *awamori*, *phoenicis*). V Japonsku jsou zřejmě používány k výrobě glukamylázy kmeny rhizopů (pravděpodobně *Rhizopus niveus*, *formosensis* nebo *javanicus*), kultivované na otrubách lískovou metodou. Obsah transglukozidáz přítomných v enzymovém komplexu, který při hydrolýze škrobu vytvářejí nežádoucí oligosacharidy, zejména isomaltózu, je možno snížit vhodným způsobem [1, 5].



Glukamylázy se používá v USA asi od r. 1955 v průmyslu zpracovávajícím kukuřici k výrobě glukózových sirupů. Prudkým rozvojem probíhá výroba krystalické glukózy hydrolýzou škrobu glukamylázou. Zahájení této výroby v krátké době bylo předpověděno v r. 1958 [14]. V r. 1962 činila již výroba krystalické glukózy tímto postupem v Japonsku přes 30 tis. t ročně [21], v r. 1964 již kolem 300 tis. t ročně [5].

U nás bylo vyzkoušeno kolem 190 kmenů rodu *Aspergillus* a *Rhizopus* z hlediska produkce glukamylázy. Jako nejvýhodnější byl nalezen kmen *Aspergillus awamori*, který vytvářel nejvíc glukamylázy jak při povrchové, tak i při submersní fermentaci a měl nízký obsah transglukozidáz. Oběma způsoby připravené glukamylázové koncentráty se vyrovnaly zahraničním obchodním preparátům. Byly vypracovány postupy, při nichž je možno připravit ze škrobu krystalickou glukózu s výtěžkem kolem 95 % nebo je možno roztok glukózy po enzymatické hydrolýze škrobu přímo, bez izolace glukózy, hydrogenovat v sorbitol. Při přípravě sorbitolu je nutno získat roztok glukózy prakticky prostý jiných cukrů a je proto třeba použít poněkud většího množství enzymu, než postačuje při přípravě krystalické glukózy.

Obsah glukamylázových jednotek v 1 g sušených plísňových otrub byl zhruba o řád vyšší než obsah jednotek v 1 ml půdy po submersní fermentaci. Povrchová fermentace trvala 2 dny, submersní vyžadovala 4 dny. Podle ekonomického vyhodnocení získaných výsledků, se zdá být příprava glukamylázového koncentrátu povrchovou metodou na otrubách výhodnější než příprava submersní fermentací. Submersní postup by však bylo možno realizovat v nynějších fermentorech, zatímco pro povrchovou metodu by bylo nutno vybudovat nové zařízení.

#### ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРОИЗВОДСТВО ПЛЕСНЕВЫХ АМИЛАЗ

В статье рассматриваются производственные процессы и методы приготовления плесневых глюкогенных амилаз. Уделяется внимание как поверхностному методу, так и погружению. Сравниваются преимущества и недостатки приведенных методов.

#### INDUSTRIELLE ERZEUGUNG VON AMYLASE AUF SCHIMMELPILZ- BASIS

In dem Artikel wird eine Übersicht der Produktionsverfahren zur Herstellung glukogener Amylase auf Schimmelpilzbasis mit Oberflächen- und submersen Kulturen gegeben. Die Vorteile und Mängel der einzelnen Herstellungsverfahren werden erörtert.

#### INDUSTRIAL PRODUCTION OF FUNGAL AMYLASES

The article deals with the processing methods employed at plants manufacturing fungal glucogenous amylases. Both surface and submersion methods are discussed and their relative merits and demerits evaluated.

#### Souhrn

Je podán přehled literatury o způsobech výroby a rozsahu průmyslového využití plísňových glukogenních amyláz. Jsou srovnávány obě průmyslově používané metody — povrchová a submersní. Autor našel z asi 190 vyzkoušených kmenů *Aspergillus* a *Rhizopus* jako nejvýhodnější pro povrchovou i submersní přípravu glukamylázy *Aspergillus awamori*. Podle ekonomického zhodnocení dosažených výsledků se zdá být za uvažovaných podmínek povrchová metoda poněkud výhodnější než submersní, submersní postup by však bylo možno realizovat v běžných fermentorech. Hydrolýzou škrobu glukamylázovými koncentráty, připravenými oběma metodami, byla připravena krystalická glukóza s výtěžkem asi 95 % nebo by bylo možno získaný roztok bez izolace glukózy hydrogenovat v sorbitol.

#### Literatura

- [1] Kulhánek, M.: „Průmysl potravin“, v tisku.
- [2] Sova, V.: „Průmysl potravin“, 4, 1953: 151.
- [3] Dyr, J.: Lihovarství I, SNTL, Praha, 1955.
- [4] Prescott, S. C. — Dunn, C. G.: Industrial microbiology, McGraw Hill Book, New York, 1959.
- [5] Arima, K. v knize Starr, M. P.: Global impacts of applied microbiology, Almqvist & Wiksell, Stockholm, 1964.
- [6] Stárka, J.: Čs. biologie, 3, 1954: 320.
- [7] Schröder, H.: „Z. allg. Mikrobiol.“, 1, 1961: 201.
- [8] Takamine, J.: US patent č. 991560 a 991561, 1911.
- [9] Beckhorm, E. J.: „Wallerstein Labs. Commun.“, 23, 1960: 201.
- [10] Underkofler, L. A. — Severson, G. M. — Goering, K. J. — Christensen, L. M.: „Cereal Chem.“, 24, 1947: 1.
- [11] Jeffreys, G. A.: „Food Inds.“, 20, 1948: 688, 825, 826.
- [12] Malcher, J. — Hošek, K. — Chmelař, V.: čs. patent 95314, 1958.
- [13] Forbath, T. P.: „Chem. Eng.“, 64, 1957: 226.
- [14] Underkofler, L. A. — Barton, R. R. — Renner, S. S.: „Appl. Microbiol.“, 6, 1958: 212.
- [15] Kujawski, M. — Piller, K.: „Przemysł Spożywczy“, 1961: 12.
- [16] Hao, L. C. — Fulmer, E. I. — Underkofler, L. A.: „Ind. Eng. Chem.“, 35, 1943: 814.
- [17] Drew, B. — Just, F. — Treumann, H.: „Brantweinwirtschaft“, 102, 1962: 636.
- [18] Underkofler, L. A. — Hickey, R. J.: Industrial Fermentations II, Chemical Publishing, New York, 1954.
- [19] Owen, S. P.: „Ann. Rev. Microbiol.“, 14, 1960: 99.
- [20] US patent č. 2893921, 1959.
- [21] Fukumoto, J.: Abstr. VIIIth intern. congress microbiol., Montreal, 1962: 73.
- [22] Dyr, J.: Kvasná chemie a technologie I, SNTL, Praha 1965.
- [23] Windisch, W. W. — Mhatre, N. S.: „Adv. Appl. Microbiol.“, 7, 1965: 273.

Došlo do redakce 18. 12. 1965.