

Stabilita, stabilizácia a aplikácia amyláz

VIERA HORVÁTHOVÁ - ERNEST ŠTURDÍK - ŠTEFAN JANEČEK

SÚHRN. V práci sú uvedené niektoré najdôležitejšie aplikačné oblasti amyláz, pri ktorých sú zväčša potrebné stabilné amylázy. Amylázy sú produkované širokým spektrom živých organizmov (mikroorganizmy, rastliny, živočíchy), ale pre praktické účely sa využívajú zväčša amylázy mikrobiálne, produkované mezofilnými, termofilnými, prípadne aj extrémofilnými mikroorganizmami.

V priemyselnej praxi sa uplatňujú väčšinou amylázy z mezofilných mikroorganizmov, ktoré v natívnom stave nemajú žiadajú stabilitu. Z tohto dôvodu sú v práci poznatky z oblasti ich modifikácie. Možnosti modifikácie amyláz sú viaceré a ich voľba závisí od rôznych faktorov, medzi ktorými sú dominantné najmä tie, ktoré vyplývajú zo vzťahu štruktúra-aktivity (v tesnej väzbe na prostredie, v ktorom pôsobia).

KLÚČOVÉ SLOVÁ: amylolytické enzýmy; stabilita; stabilizácia; použitie

Amylázy sú enzýmy produkované živočíchmi, rastlinami a mikroorganizmami a svojim pôsobením hydrolyzujú škrob. Škrob je rastlinný biopolymér zložený z amylózy a amylopektínu [1].

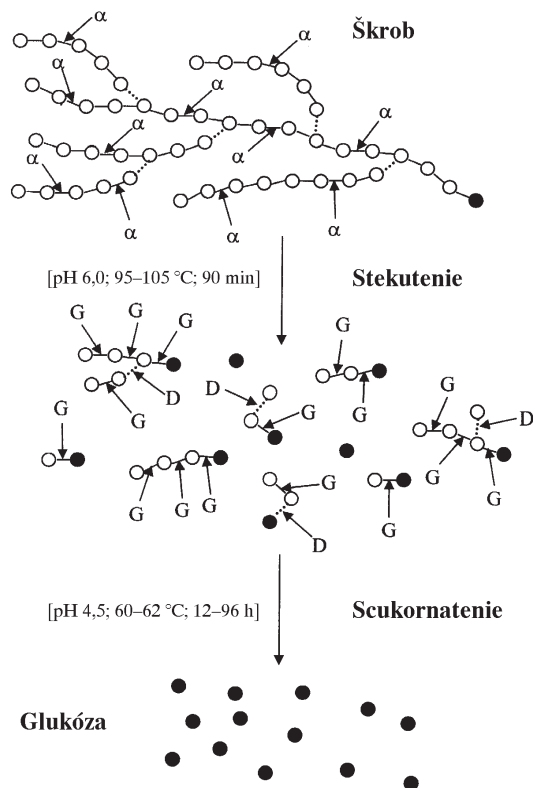
Priemyselná výroba glukózy zo škrobu je proces prebiehajúci v dvoch krokoch. Vyžaduje si prítomnosť viacerých amylolytických enzýmov (α -amylázu, β -amylázu, glucoamylázu, pululanázu), z ktorých každý má odlišný spôsob účinku svojho pôsobenia na škrob (obr. 1) [2]. Prvý krok (t. j. stekutenie) mení koncentrovanú škrobovú suspenziu (30–40 %) na roztok rozpustných dextrínov s rôznym stupňom polymerizácie. Počas druhého kroku (t. j. scukornatenia) sú tieto dextríny hydrolyzované na glukózu.

Solubilizovaný škrob je lepším substrátom pre amylázy ako nerozpustný škrob. Pretože mazovatenie škrobu sa uskutočňuje iba pri vysokej teplote (viac ako 70 °C podľa zdroja škrobu), jeho enzýmová hydrolýza sa v súčas-

Ing. Viera HORVÁTHOVÁ, Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Námestie J. Herdu 1, 917 00 Trnava. E-mail: vierabio@ucm.sk

Doc. Ing. Ernest ŠTURDÍK, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Ing. Štefan JANEČEK, CSc., Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 842 51 Bratislava.



OBR. 1. Priemyselná enzýmová hydrolýza škrobu na glukózu a vzor účinku amylolytických enzýmov [2].

— - α -1,4-glukozidické väzby, - α -1,6-glukozidické väzby, α - α -amyláza, G - glukozidáza, D - príbuzné enzýmy (pululanáza).

FIG. 1. Industrial enzymatic hydrolysis of starch into glucose and a pattern of action of amylolytic enzymes [2].

— - α -1,4 glucosidic linkages, - α -1,6 glucosidic linkages, α - α -amylase, G - glucosidase, D - debranching enzyme (pullulanase).

nosti vykonáva pri zvýšených teplotách (90–110 °C) s využitím termostabilných amyláz. Takéto amylázy môžu byť získané z mezofilných enzýmov ich chemickou modifikáciou alebo cieľenou mutagenézou [3-7], alebo sa používajú prirodzene stabilné amylázy z termofilných mikroorganizmov. Bakteriálne α -amylázy z *Bacillus stearothermophilus* a *Bacillus licheniformis* sú dobre charakterizované a široko využívané v škrobárskom priemysle. Termostabilné amylázy boli identifikované aj v termofilných a hypertermofilných archaeobaktériách [8-10].

V mikroorganizmoch boli identifikované dve hlavné skupiny škrobových hydroláz: α -amyláza (EC 3.2.1.1) a glukooamyláza (EC 3.2.1.3). α -amyláza (endohydroláza) štiepi α -1,4-D-glukozidové väzby medzi susediacim glukózovými jednotkami lineárnej amylózy náhodne, kým glukooamyláza (exohydroláza) katalyzuje uvoľnenie jednotlivých glukózových zvyškov z neredukujúceho konca amylózy a amylopektínu krok za krokom. Na rozdiel od α -amylázy, väčšina glukooamyláz je schopných hydrolyzovať α -1,6-väzby amylopektínu, hoci s menšou rýchlosťou akou hydrolyzuje α -1,4-väzby. Aj keď niekedy môžu byť tieto amylázy izolované obe z jedného organizmu, spravidla sú produkované rozdielnymi organizmami [11]. Glukooamyláza našla široké uplatnenie v potravinárstve a fermentačnom priemysle. Najčastejšie sa používa na hydrolýzu škrobu pri výrobe etanolu a pri výrobe glukózových sirupov [12]. Keďže α -amyláza spomedzi všetkých amyláz bola a je najrozpracovanejším predmetom štúdia (nielen z aspektov jej proteínovej štruktúry a funkcie, mechanizmu účinku, ale tiež priemyselnej aplikácie), aj v tomto článku je najviac pozornosti venovanej práve α -amyláze.

Prirodzená stabilita amylolytických enzýmov

α -amylázy sú stabilné v intervale pH 5,5–8,0 [13]. Výnimky však existujú na oboch stranách, najmä u mikroorganizmov; napr. alkalifilná α -amyláza *Bacillus* sp. A-40-2 s pH optimom 10,5 a acidofilná α -amyláza *Bacillus* sp. 11-1S s pH optimom 2,0 [14]. Tento široký rozsah hodnôt pH optima pre aktivitu jednotlivých α -amyláz naznačuje ich veľkú schopnosť evolučne sa prispôbiť podmienkam vonkajšieho životného prostredia [15].

Teplota je jedným z najvýznamnejších faktorov vonkajšieho prostredia [16] a je tiež pravdepodobne najlepšie optimalizovanou fyzikálnou premenou v chemických reakciách [17]. Spomedzi charakterizovaných termostabilných enzýmov priemyselné využitie najviac našli bakteriálne amylázy a proteázy pri steuku škrobu v potravinárstve a v priemysle detergentov [18].

Z dôvodov ekonomickej výhodnosti hydrolýzy škrobu pri nízkych hodnotách pH a pri vysokých teplotách je veľký záujem o acido- a termostabilné α -amylázy. Pri porovnaní pH- a termostabilných α -amyláz z vláknitých húb a baktérií je vo všeobecnosti pre α -amylázy z vláknitých húb charakteristická zvýšená acidostabilita a pre bakteriálne α -amylázy zvýšená termostabilita. Objasňuje sa to ochrannou funkciou sacharidových zvyškov u vláknitých húb a pevnejšou štruktúrou proteínovej globule u baktérií [13]. Z enzýmov využívaných v priemysle je najpoužívanejšia termostabilná α -amyláza z *Bacillus licheniformis* [19], ktorá je schopná steukovať škrob až do teplôt

110 °C [20]. Ako jedna z najnižších hodnôt teplotného optima pre aktivitu α -amylázy sa udáva 25 °C, a to pre α -amylázu z *Fusarium oxysporum*, avšak väčšina udávaných teplôt je v intervale 50–60 °C [1], pričom vysokočisté preparáty rýchlo strácajú aktivitu nad 50 °C [13,17].

Glukoamylázy sú vo všeobecnosti aktívne v kyslej oblasti pH s optimálnymi hodnotami okolo pH 4,5–5,0. Teplotné optimum pre väčšinu mikrobiálnych glukoamyláz je medzi 40–60 °C [11]. Výnimku tvorí napr. purifikovaná a charakterizovaná glukoamyláza z anaeróbnej termofilnej baktérie *Clostridium thermosaccharolyticum* s pH optimom 5,0 a teplotným optimom 70 °C atakujúca predovšetkým polysacharidy [21].

Pre glukoamylázu z *Aspergillus awamori* var. *kawachii* bolo zistené, že pozostáva z troch typov: GA I, GA I' a GA II, pričom GA I a GA I' boli optimálne aktívne pri pH 3,8, kým GA II pri pH 4,0, ale ich pH-stabilita varíovala v rozsahoch 2,0–10, 2,5–6,5 a 4,0–7,0 [11]. Líšili sa aj v izoelektrických bodoch, ktoré boli 3,55; 3,45 a 3,28. Pri 60 °C bola stabilná iba GA I, kým GA I' a GA II už boli nestabilné [11].

Komerčný prípravok glukoamylázy z *Aspergillus niger* pozostáva aspoň zo 6 enzýmových druhov, z ktorých 5 foriem bolo plne charakterizovaných s pH optimom varíujúcim medzi 3,5–5,0 [11].

Glukoamyláza z *Aspergillus terreus* je glykoproteín s izoelektrickým bodom 3,4 a optimálnou aktivitou pri pH 4,0 a teplote 60 °C. Zaujímavosťou je jeho stabilita v rozsahu pH 3,0–7,0 [11].

Aminokyselinové zloženie glukoamyláz sa mení v závislosti od pôvodu [11].

Prirodzene extrémostabilné amylolytické enzýmy

Záujem o extrémostabilné enzýmy je podmienený predovšetkým tým, že väčšina priemyselných procesov prebieha pri iných ako fyziologických podmienkach, teda pri vyšších tlakoch, vyšších teplotách, extrémnych hodnotách pH, a pod. Prvou možnosťou, ako získať biokatalyzátory pre tieto procesy, je izolovať enzýmy z mikroorganizmov, ktoré prirodzene existujú v extrémnych životných podmienkach, ako sú napr. termofily z horúcich prameňov Yellowstoneského národného parku a halofily zo soľou saturovaných vôd Mŕtveho mora.

Medzi potenciálnych producentov extrémostabilných enzýmov patria teda barofilné, acidofilné a alkalofilné mikroorganizmy [20]. Extrémofilné mikroorganizmy sú prispôbené životu pri vysokých teplotách vo vulkanických prameňoch, pri nízkych teplotách v studených polárnych oblastiach,

pri vysokom tlaku v morských hĺbkach, pri veľmi nízkych alebo vysokých hodnotách pH (0–3 alebo 10–12), alebo pri veľmi vysokých koncentráciach solí (5–30 %) [10]. V poslednom desaťročí bolo izolovaných množstvo (viac než 60) hypertermofilných archaebaktérií, ktoré sú schopné rásť pri teplotách okolo bodu varu vody. Metabolizmus a špecifické biologické funkcie hypertermofilných mikroorganizmov sú umožňované pomocou proteínov a enzýmov, ktoré sú schopné vykonávať svoje funkcie aj v extrémnych podmienkach. Mnohé tieto enzýmy preukazujú jedinečné črty, ako napr. extrémnu termostabilitu, odolnosť voči chemickým denaturantom (detergentom, chaotropným činidlám, organickým rozpúšťadlám) a extrémom pH. Tieto enzýmy teda môžu byť použité aj ako modely pre návrh proteínov s novými vlastnosťami, ktoré budú zaujímavé pre priemyselné využitie [10].

Škrobové hydrolázy z hypertermofilných mikroorganizmov, ktoré sú aktívne pri teplotách okolo a nad 100 °C a v pH kompatibilnom pre oba kroky hydrolýzy škrobu, sú zaujímavé pre použitie v procese biokonverzie škrobu [10]. Vo veľkom meradle našli zatiaľ uplatnenie len termostabilné enzýmy z termofilných mikroorganizmov [20].

Stabilitu termostabilnej α -amylázy pri 90 °C a pH 6,5 v sérii *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus* a *Bacillus licheniformis* Tomazic a Klibanov [22,23] pripísali hlavne prídavným solným mostíkom zahrňujúcich pár špecifických lyzínových zvyškov. Podobne α -amylázy z *Bacillus stearothermophilus* [24], ako aj mutantná α -amyláza z *Bacillus amyloliquefaciens* [25] boli stabilizované proti tepelnej denaturácii pomocou iónových interakcií. Avšak stabilita mezofilných α -amyláz nebola doteraz zvýšená tak podstatne ako v prípade proteáz, ktoré boli stabilizované až na úroveň prirodzene termostabilných proteáz [1].

Extrémne termostabilné α -amylázy boli charakterizované z archaebaktérií *Pyrococcus woesslei*, *Pyrococcus furiosus* (teplotné optimum 100 °C) a *Thermococcus profundus* (teplotné optimum 80 °C) [10]. Amylolytická aktivita bola pozorovaná aj v hypertermofilných archaebaktériách rodov *Sulfolobus*, *Desulfurococcus* a *Staphylothermus* [2,10].

Naproti tomu produkcia glukoamyláz v termofilných a hypertermofilných baktériách a archaebaktériách je zriedkavá. Boli purifikované glukoamylázy z *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39 E, *Clostridium thermosaccharolyticum* a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571 s teplotným optimom okolo 70 °C [10].

Termostabilné a termoaktívne pululanázy z extrémofilných mikroorganizmov boli identifikované v *Thermococcus aggregans*, *Thermococcus celer*, *Thermococcus hydrothermalis*, *Thermococcus litoralis*, *Desulfurococcus mucosus* a *Staphylothermus marinus* [10]. Ich teplotné optimá sú v rozmedzí 90 °C

a 105 °C, pričom vykazujú svoju termostabilitu aj v neprítomnosti substrátu a vápenatých iónov. Niektoré charakteristiky amylolytických enzýmov z termofilných archaeobaktérií sú prezentované v tabuľke 1.

Prístupy vedúce k zvýšenej stabilite amylolytických enzýmov

Stabilizácia enzýmov z mezofilov je považovaná [20] za najlepší spôsob získania stabilných biokatalyzátorov. V princípe existujú tri možnosti, ako získať stabilné amylázy:

- izolácia z extrémofilných mikroorganizmov;
- produkcia v geneticky modifikovaných neextrémofilných mikrobiálnych producentoch;
- stabilizácia nestabilných amyláz ich modifikáciou.

TAB. 1. Amylolytické enzýmy z termofilných archaeobaktérií a niektoré ich charakteristiky [2].

TAB. 1. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes and some of their characteristics [2].

Archaeobaktéria ¹	Miesto výskytu mikroorganizmu ²	Enzým ³	Teplotné optimum ⁴ [°C]	pH optimum	Lokalizácia enzýmu ⁵
<i>Desulfurococcus mucosus</i>	horúce sírne pramene	α -amyláza pululanáza	100 100	5,5 5,0	nd
<i>Pyrococcus furiosus</i>	lokality podmorských sopečných výbuchov	α -amyláza α -amyláza α -glukozidáza pululanáza	100 100 105–115 98	6,5–7,5 5,0 5,0–6,0 5,5	intracelulárny extracelulárny intracelulárny extracelulárny
<i>Pyrococcus woesei</i>	lokality podmorských sopečných výbuchov	α -amyláza α -glukozidáza pululanáza	100 110 100	5,5 5,0–5,5 6,0	extracelulárny intracelulárny
<i>Staphylothermus marinus</i>	lokality morských hydrotermálnych ventilov	α -amyláza	100	5,0	nd
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	vulkanické horúce pramene	α -amyláza α -glukozidáza	nd 105	nd 4,5	extracelulárny intracelulárny
<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	lokality morských hydrotermálnych ventilov	α -amyláza α -glukozidáza pululanáza	75–85 110 95	5,0–5,5 5,0–5,5 5,5	extracelulárny intracelulárny extracelulárny
<i>Thermococcus profundus</i>	lokality morských hydrotermálnych ventilov	α -amyláza	80	5,5–6,0	extracelulárny

nd - autormi nebolo uvedené.

nd - not given by the authors.

1 - *Archaea*, 2 - habitat, 3 - enzyme, 4 - optimal temperature of activity, 5 - enzyme localization.

Posledná z uvedených možností môže byť uskutočnená tromi spôsobmi: chemickou modifikáciou, imobilizáciou, proteínovým inžinierstvom [26].

Zvýšenie termostability u α -amyláz (a stability vôbec) je žiadané predovšetkým z priemyselného hľadiska. V súčasnosti rastie význam zvýšenej stability enzýmových preparátov určených na použitie v medicíne [13]. Boli popísané stabilizujúce účinky hovädzieho sérového albumínu, kationov Na^+ , K^+ , NH_4^+ , 2-merkaptotanolu a glycerolu [13], polyolov [13,27] a dimetyl-sulfoxidu [27] na rôzne α -amylázy. Všeobecne je známy podporný účinok vápnika [13].

Extrémotabilné enzýmy môžeme získať aj metódami génového inžinierstva. Prvým krokom je izolovať celý genóm alebo jeho časť z termofilného mikroorganizmu, za ktorým nasleduje jeho vnesenie do genetickej výbavy vhodného mezofila. Schopnosť klonovať gény termofilov v mezofilných produkčných kmeňoch zvýšila potenciál priemyselného použitia termostabilných enzýmov. Napríklad gény kódujúce termostabilnú α -amylázu a neutrálnu proteázu z *Bacillus stearothermophilus* boli klonované a exprimované v mezofilnom kmeni *Bacillus subtilis* [20].

Chemická modifikácia

Mozhaev a kol. [28] rozdelili stratégie na získanie stabilizovaných enzýmov chemickou modifikáciou na 4 skupiny metód:

- a) modifikácie s bifunkčnými činidlami (zosieťovanie povrchových funkčných skupín),
- b) modifikácie s nepolárnymi činidlami,
- c) zavedenie nových polárnych alebo nabitých skupín (tvorba doplnkových vodíkových alebo iónových väzieb),
- d) hydrofilizácia proteínového povrchu (ochrana pred nevýhodným hydrofóbnym kontaktom s vodou).

Zo štúdií využívajúcich chemickú modifikáciu dosiahli stabilizáciu α -amylázy *Bacillus subtilis* Urabe a kol. [29] a Hora [30]. V prvom prípade bola stabilizácia v dôsledku acetylácie s *p*-nitrofenylacetátom pozorovaná len nad teplotou 70 °C, čo autori dávali do súvisu s existenciou tzv. relaxačnej teploty [29], kým v druhom prípade acyláciou s esterami NH_2 skupín enzýmu bola zvýšená rezistencia voči termodenaturácii v súvislosti s polaritou zavedenej acylovej skupiny [30]. Brumm a Teague [24] však acyláciou dosiahli podstatnú redukciu stability α -amylázy z *Bacillus stearothermophilus*. Relaxačná teplota 63–64 °C bola tiež nájdená pri zisťovaní termoinaktivačnej kinetiky α -amylázy z *Bacillus subtilis* stabilizovanej modifikáciou D-glukóno- δ -laktónom [29-31].

Imobilizácia

Imobilizácia je proces, v ktorom sa za použitia jednej z imobilizačných metód zabráni biologickému materiálu pohybovať sa nezávisle od svojho okolia [32]. Klíbanov [26] definoval imobilizáciu ako konverziu enzýmu zo stavu mobilného (vo vode rozpustného) do stavu imobilného (vo vode nerozpustného). Imobilizačné techniky možno rozdeliť do piatich skupín [20]:

- a) kovalentné pripojenie na pevný nosič;
- b) adsorpcia na pevný nosič;
- c) uchytenie v polymérnych géloch;
- d) zosieťovanie s bifunkčnými činidlami;
- e) enkapsulácia.

Kombináciou a modifikáciou týchto základných metód môžu vzniknúť aj ďalšie. Úspešnosť metódy závisí v značnej miere od správneho výberu nosiča [32]. Imobilizácia ako proces ukotvenia bioaktívneho komponentu zaznamenala v posledných 15 rokoch prudký rozvoj, pretože v porovnaní s klasickými metódami, využívajúcimi voľné enzýmy, bunky, bunkové organely a tkanivá, má mnoho výhod (napr. vysoká stabilita a odolnosť voči strihovým procesom a kontaminácii, veľká reakčná rýchlosť podmienená vysokou koncentráciou katalyzátora, jednoduchá separácia enzýmov z kultivačného média a možnosť opakovaného použitia enzýmov) [33]. Nasadenie imobilizovaných buniek môže v značnej miere prispieť aj ku kontinuálizácii celého fermentačného procesu.

Jednotlivé imobilizačné techniky sa líšia svojou podstatou aj mechanizmom, preto je ťažké ich navzájom porovnávať. Pravdepodobne najpoužívanejšou zo všetkých imobilizačných metód je uzavretie biokomponentu do trojrozmerného matrixu, ktorého póry sú menšie ako enzým, prípadne bunka. Je to tak zrejme preto, lebo táto metóda je nenáročná na prípravu a k dispozícii je široká paleta nosičov zo skupiny polysacharidov, proteínov alebo syntetických polymérov [32].

Technológia imobilizovaných buniek je súčasťou biotechnológií zameralých aj na výrobu enzýmov. Enzýmy sú produkované vo vsádzkových alebo kontinuálnych procesoch a následne izolované z média ultrafiltráciou, odparovaním, reverznou osmózou alebo zrážaním. Systém využívajúci imobilizované bunky znižuje náklady spojené so separáciou buniek a produktov.

Bakteriálne kmene *Bacillus brevis* a *Halobacterium salinarum*, imobilizované na agare, algináte a polyvinylalkohole, boli použité na produkciu termostabilnej a halofilnej α -amylázy [34,35]. Glukoamyláza bola produkovaná imobilizovaným mycéliom *Aspergillus niger* [35] alebo kvasinkami *Saccharomyces diastaticus* [36].

Imobilizované termofilné baktérie boli tiež použité na produkciu α -amylázy a pululanázy [37]. Bunky *Bacillus megaterium* imobilizované s použitím stroncia ako najvhodnejšieho kationu pre alginátový gél produkovali β -amylázu [38]. Z imobilizačných techník je zaujímavé zvýšenie stability prirodzene termostabilnej α -amylázy z *Bacillus licheniformis* kovalentnou imobilizáciou ku γ -aminopropylovým skupinám aktivovaného skla [39]. Schellenberger a Ulbrich [40] túto stabilizáciu vysvetlili možnou ochranou tzv. rozvíjajúceho miesta prítomného v každej enzýmovej molekule, t. j. blokovaním natívnej dráhy jej rozvinutia. Bolo však zistené [31], že imobilizácia nie vždy vedie k stabilizácii enzýmu.

Proteínové inžinierstvo

Cielená mutagenéza ako jedna z aplikácií génového inžinierstva dovoľuje získať proteíny, ktoré sa líšia od pôvodných (prírodných) iba v jednej alebo niekoľkých vopred presne definovaných aminokyselinách. Cieľom proteínového inžinierstva je vo všeobecnosti zlepšiť vlastnosti enzýmu, najmä v oblasti jeho stability, či už termostability, pH stability, alebo zvýšiť stabilitu voči oxidácii, prípadne ťažkým kovom [33].

Mnoho termostabilných enzýmov je produkovaných takými termofilmi, ktoré z rôznych dôvodov nemusia byť vhodné na priemyselné procesy. Aplikácia génového inžinierstva ponúka možnosti aj v tejto oblasti problémov, a to takým spôsobom, že sa celý genóm alebo lepšie len jeho časť inkorporuje do vhodného producenta. Z dvoch najvhodnejších mikroorganizmov (*Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*) má vďaka svojej nepatogenite, neprodukcii endotoxínov a sekrécii génových produktov do kultivačného média lepšie predpoklady *Bacillus subtilis*. Mnohé proteíny pripravené v *Escherichia coli* sú často inaktívne v dôsledku neúspešnej konformácie, a tak sa v súčasnosti zdôrazňuje sekrečná produkcia proteínov kvasinkami (*Saccharomyces cerevisiae*) [33]. Najperspektívnejším prístupom sa dnes zdá byť chemická syntéza génu študovaného proteínu. Takýto gén možno do proteínovej podoby previesť analogicky ako izolované prírodné gény a zmenami v jeho sekvencii sa dajú vyvolať alternácie jednotlivých aminokyselín významných z hľadiska katalýzy, väzby substrátu a pod., čím možno zdokonaľiť funkciu známych proteínov (enzýmov), vysvetľovať vzťahy štruktúra-funkcia a tiež zvýšiť ich termostabilitu [33].

Použitie amylolytických enzýmov

Oligo- a polysacharidy vďaka svojej výnimočnej štruktúre a funkčnej diverzite poskytujú priestor pre enzýmy zodpovedné za ich štiepenie (glykozidázy, polysacharidové lyázy), úpravy (transglykozidázy), biosyntézu (glykyltransferázy) a odstraňovanie nesacharidových bočných reťazcov (sacharidové esterázy) [41].

Jeden z najrozšírenejších polysacharidov je škrob. Je nerozpustný a neskvasiteľný. Jeho rozklad prebieha za prítomnosti prebytku vody a je katalyzovaný buď kyslým prostredím alebo enzýmov. Hydrolýza škrobu vo fermentačnom priemysle prebieha výlučne enzýmov [42].

V dôsledku svojej komplexnej štruktúry je škrob metabolizovaný celým súborom enzýmov (tab. 2). Tri amylázy (α -, β - a glukaoamyláza) sú najviac známe enzýmy využívajúce škrob ako substrát. Na rozdiel od kyselín pôsobia špecificky [41-43].

Škrob sa priemyselne hydrolyzuje v dvoch krokoch:

1. pomocou α -amyláz (pracujú za zvýšenej teploty) sa stekutí,
2. použitím glukaoamyláz (nie sú termostabilné) nastáva scukornatenie [43].

TAB. 2. Amylolytické enzýmy bežne používané v škrobárskom priemysle [63]

TAB. 2. Enzymes commonly used in industrial starch-degradation [63].

Enzým ¹	Štiepná väzba ²	Endo/Exo-enzým ³	Zdroj enzýmu ⁴	Teplota ⁵ [°C]	pH	Produkty ⁶
α -amylázy ⁷	α -(1,4)	endo	<i>A. oryzae</i> <i>A. niger</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i> cereálie	50–55 50–55 85–90 95–105 85–90 55	5–6 5–6 6–6,5 6–6,5 6–6,5 5–6	α -maltóza α -maltóza dextríny a maltodextríny dextríny a maltodextríny dextríny a maltodextríny maltóza
β -amylázy ⁸	α -(1,4)	exo	<i>B. circulans</i> <i>B. polymyxa</i> cereálie	55	5,5	β -maltóza β -maltóza β -maltóza
glukoamylázy ⁹	α -(1,4), α -(1,6)	exo	<i>A. niger</i> <i>A. oryzae</i> <i>Rhizopus delamar</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	60 60 55 55	4–5 4–5 3–5 3–5	β -glukóza β -glukóza β -glukóza β -glukóza
pululanázy ¹⁰	α -(1,6)	endo	<i>B. acidopullulyticum</i> <i>Klebsiella aerogenes</i>	50–60 50–60	5	hydrolyzované dextríny hydrolyzované dextríny
izoamylázy ¹¹	α -(1,6)	endo	<i>Pseudomonas amy-loderatomosa</i>			hydrolyzované dextríny

1 - enzyme, 2 - cleaved linkage, 3 - endo/exo-activity, 4 - sources of the enzyme, 5 - temperature, 6 - products, 7 - α -amylases, 8 - β -amylases, 9 - glucoamylases, 10 - pullulanases, 11 - isoamylases.

Ideálne by bolo spraviť z hydrolýzy škrobu jednokrokový proces. Preto sa neustále hľadajú buď vhodné enzýmy, alebo vhodné možnosti zefektívnenia celého procesu (stabilizácia enzýmov). Termostabilita amyláz je rôzna. α -amyláza je spravidla podstatne stabilnejšia ako β -amyláza [41]. Z amyláz je najstabilnejšia bakteriálna. Najmenej stabilná je α -amyláza z vláknitých húb.

Glukoamyláza je typická amyláza produkovaná vláknitými hubami (najvýznamnejší producenti sú *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*) [42]. Z amyláz je glukoamyláza najviac používaná pri priemyselnej produkcii glukózových sirupov. Glukoamyláza môže zapríčiniť polymerizáciu glukózy (reverziu), pričom čím vyššia je východisková koncentrácia škrobu, tým viac produktov reverzie sa vytvára. Napriek tomu ich množstvo je oveľa menšie ako pri kyslej hydrolýze škrobu [43,44].

V európskom systéme výroby a predaja škrobu a výrobkov z neho dochádza v posledných rokoch k značným zmenám. V rámci EÚ klesá podpora exportu, v nasledujúcich 10 rokoch sa očakáva znižovanie cien a rentability produkcie, pokiaľ by všeobecný nedostatok nespôsobil podstatné zvýšenie svetových cien. Vývoj však môže byť ovplyvnený aj novými netradičnými technológiami využitia škrobu a jeho derivátov. Do roku 2000 sa očakávalo zvýšenie svetovej ceny pšenice, lebo celý blok EÚ chcel znížiť jej množstvo a podporu jej exportu, čo je výsledok dohody GATT. Následkom je aj zníženie svetových zásob pšenice. Dalším faktorom, ktorý ovplyvňuje riadenie hospodárstva so škrobom v rámci EÚ, je rozširovanie EÚ o Poľsko, Maďarsko, Českú republiku a Slovensko. Najmä s Poľskom sa ráta ako s hlavným dodávateľom zemiakového, prípadne aj pšeničného škrobu, pokiaľ sa v Poľsku podarí zvýšiť výkonnosť poľnohospodárstva s finančnou a technickou pomocou EÚ [45]. V rokoch 2000–2005 sa tiež predpokladá rozvoj nepotravinárskeho využitia (napríklad na ekologické obaly) s odhadnutou spotrebou 100 tisíc ton ročne.

Dosiaľ je hlavnou surovinou pre výrobu škrobu kukurica, pretože je vysoko efektívna. Donedávna však bola hlavnou škrobárskou surovinou pšenica, aj napriek zložitému výrobnému postupu a relatívne malým výrobným prevádzkam, čo však bolo spôsobené hlavne dotáciami v rámci EÚ i každého štátu. Vhodnou surovinou pre výrobu a spracovanie škrobu sú zemiaky vzhľadom na to, že majú jednoduché spracovanie. Nevýhodou je však kolísanie výšky a kvality úrody a tiež vysoké náklady na likvidáciu odpadov. Ostatné škrobárske suroviny v rámci EÚ predstavujú minimálne položky. Tu je zaujímavá ryža a hlavne jačmeň, ktorý by mohol byť zaujímavý pre Fínsko, pretože sa dá úspešne pestovať i v severných oblastiach [45]. Viac než polovica produkcie všetkého škrobu je hydrolyzovaná a predávaná ako glukózový sirup, izoglukóza a glukóza. Rozhodujúcimi faktormi sú: cena, sprievodné

zložky vznikajúce pri fermentácii alebo syntéze, sladivosť, pocit vyvolávajúci v ústach, vlastnosti pri aplikácii a skladovaní, zdravotné a legislatívne aspekty. Sacharóza je podstatne sladšia ako glukózový sirup, čo môže byť výhodou, ale niekedy aj nevýhodou. Izoglukóza, najmä Isosweet 55 pre nealkoholické nápoje, veľmi úspešne súťaží v USA so sacharózou. Vzhľadom ku stanoveným kvótam pre jednotlivé štáty EÚ nie je predpoklad pre zmenu súčasného stavu až do roku 2005. Výroba fruktózy zo škrobu alebo inulínu je v rámci štátov EÚ veľmi obmedzená, a tak nekladie zvýšené požiadavky na spotrebu škrobu. Glukózový sirup výrazne potláča kryštalizáciu hotových výrobkov, a preto má veľký význam ako prísada do zmrzlín, džemov a cukroviniek. Glukózové sirupy s vysokým obsahom maltózy nahrádzujú sladové extrakty v pivovarníctve. Glukóza je základnou surovinou pre výrobu sorbitolu a vitamínu C [45].

Predpokladá sa, že v najbližšom období sa udrží spotreba škrobu v tradičných oblastiach, ako sú: natívne a modifikované škroby pre výrobu papiera a lepeniek, glukózové sirupy pre potraviny, nápoje a fermentačný priemysel, natívne a modifikované škroby pre potraviny a krmivá, polyoly (hlavne sorbitol) pre výrobu vitamínu C, zubných pást a energetických potravín, glukóza, maltodextríny a dextríny pre potravinárske účely, výrobu lepidiel, úpravu textilu. Rozvoj výroby bioetanolu bude pokračovať len vo Francúzsku, prípadne v štátoch bývalej východnej Európy. Celková spotreba škrobu v krajinách EÚ bude v ďalšom období stúpať priemerne o 2 %, pričom tento trend bude ovplyvňovaný ďalšími faktormi, ako je napríklad vstupom lacnejšieho škrobu zo štátov východnej Európy, samozrejme až keď sa ich poľnohospodárstvo dostane na porovnateľnú ekonomickú úroveň [45].

V európskom meradle je trh s amylolytickými enzýmami z veľkej miery ovplyvňovaný dánskou firmou Novo Nordisk, ktorá patrí k popredným svetovým výrobcam humánnych liečiv (najmä penicilínu a inzulínu) a k najväčším svetovým výrobcam enzýmov. Jej strategické smery pre aplikáciu enzýmových preparátov sú tieto: modifikované škroby, bielkovinové hydrolyzáty, textilný priemysel, detergenty, pekárstvo [46].

Oblasť spracovania škrobu je rozdelená podľa druhu procesu a vznikajúceho produktu na 3 základné skupiny [46]. Do prvej skupiny patria amylolytické preparáty určené na štiepenie škrobu. Ide o prípravky komerčných názvov Ban a Termamyl.

Ban je α -amyláza produkovaná kmeňom *Bacillus amyloliquefaciens* pracujúca pri relatívne vysokých teplotách (70–80 °C) a pri pH 5,5–6,5. Je k dispozícii v kvapalnej forme alebo ako mikrogranulát. Používa sa v škrobárstve, liehovarníctve a v papierenskom priemysle [47]. Pri stekutení škrobu sa môže uplatniť aj preparát Termamyl určený na potravinárske účely [48–51] a preparát Liqouzyme [52] vhodný pre nepotravinárske aplikácie.

Preparát Termamyl sa vyrába vo viacerých typoch: L, LS a S. Termamyl 120 L, Type L [48] je kvapalný enzýmový prípravok, ktorý obsahuje termostabilnú α -amylázu produkovanú geneticky modifikovaným kmeňom *Bacillus licheniformis*, škrob štiepi rýchlo na rozpustné dextríny a oligosacharidy. Aplikáciami oblastami pre tento preparát sú najmä škrobárstvo, liehovarníctvo, pivovarníctvo a cukrovarníctvo. V škrobárstve sa používa pre kontinuálne skvapalnenie škrobu v parných injektoroch alebo v podobných zariadeniach pracujúcich pri teplotách až do 105–110 °C využívajúcich výhodu extrémne tepelnej stability tohto enzýmu. V liehovarníctve sa využíva nielen tepelná stabilita enzýmu, ale aj jeho široká pH tolerantnosť a nízke požiadavky na vápnik, čím sa minimalizuje riziko vápenatých usadenín v technologických zariadeniach. V pivovarníctve sa používa pre skvapalnenie surogátov, kde varný program zjednodušuje za súčasného zvýšenia ich podielu. V cukrovarníctve sa používa na rozklad škrobu, ktorý sa nachádza v cukrovej trstine, čím sa v konečnom dôsledku uľahčí filtrácia aj rafinácia [48].

Podobným preparátom je Termamyl^R, Type LS, ktorý obsahuje tepelne stabilnú bakteriálnu α -amylázu. Je vyvinutý pre škrobárstvo, kde sa používa na stekutenie škrobu v parných prúdových varičoch operujúcich pri teplotách okolo 105 °C [50].

Termamyl^R 120 L, Type S [51] je kvapalný enzýmový preparát potravinárskej kvality, určený na aplikácie hlavne v pivovarníckom a liehovarníckom priemysle. Má relatívne širokú pH tolerantnosť a veľmi nízke požiadavky na vápnik, preto možno často vynechať nastavenie pH aj prídavok vápnika. Toto procesy zjednodušuje a tiež minimalizuje riziko tvorby usadenín.

Liquouzyme^R 120 L, Type S je kvapalný enzýmový preparát technickej kvality, ktorý obsahuje termostabilnú bakteriálnu α -amylázu. Aplikuje sa pri výrobe palivového a technického etanolu na stekutenie škrobu v škrobových záparách. Má tiež širokú pH toleranciu a nízke nároky na vápnik [52].

Pre scukornatenie škrobnatých surovín je možné aplikovať nasledovné preparáty: AMG (300L, 300 MG, 1000 BG), Promozyme 200L alebo Fungamyl 800L [53-57] alebo aj zmesné preparáty San Super 240L [58] a DextrozymeTM [46].

AMG 300L je glukoamyláza získaná z vybraného kmeňa *Aspergillus niger*, existuje v dvoch štandardných formách, a to kvapalná a granulovaná [55].

Promozyme 200L je pululanáza odolná voči teplu a kyselinám, ktorá hydrolyzuje body vetvenia škrobu. Preparát sa používa v spojení s AMG na výrobu sirupov bohatých na glukózu a spolu s β -amylázou na získanie sirupov bohatých na maltózu [46].

Fungamyl 800L je fungálna α -amyláza získaná z vybraného kmeňa *Aspergillus oryzae*. Vyhovuje kritériam pre potravinárske enzýmy [56,57].

Preparát San Super 240L je možné použiť v liehovarníctve. Jeho hlavnou zložkou je glukoamyláza a má vyvážený obsah α -amylázy a proteinázy. Používa sa na scukornatenie zápary obsahujúcej skvapalnený škrob. Doporučuje sa pridávať ho, až keď je zápara ochladená na 55 °C a hodnota pH je asi 5,5 [50].

DextrozymeTM je vyrovnaná zmes glukoamylázy a pululanázy, ktorá premieňa dextríny na glukózu. Vďaka svojej aktivite pri odštiepovaní bočných refazcov je tento preparát vhodný najmä pri výrobe glukózových sirupov [46].

Ďalšou aplikačnou oblasťou v škrobárstve je izomerizácia glukózy použitím imobilizovanej glukózoizomerázy pod komerčným názvom Sweetzyme T. Preparát bol vyvinutý špeciálne na dlhodobé použitie v kontinuálnom procese v reaktoroch s pevným lôžkom katalyzátora [46].

Pri výrobe alkoholu zo škrobových prírodných materiálov sa používa štandardná vsádzková (batch) operácia, pri ktorej sa varí surový materiál (zrno, zemiaky, atď.) pri vysokej teplote (150 °C) s cieľom jeho deštrukcie a mazovatenia škrobu. Týmto sa škrob pripraví pre následné enzýmové štiepenie na skvasiteľné sacharidy. Varný proces bol revidovaný a nahradený postupom pracujúcim pri maximálnych teplotách medzi 60-95 °C [59]. V tabuľke 3 sú uvedené enzýmy používané v tomto procese s naznačením najlepších (optimálnych) podmienok pre ich použitie a dávkovanie.

Amylolytické enzýmy možno aplikovať aj v pekárskom priemysle. Firma Novo Nordisk odporúča pre oblasť pekárskeho priemyslu viacero nielen amylolytických enzýmov tak, aby sa dosiahol požadovaný efekt. Z komerčných amylolytických preparátov možno použiť napríklad Fungamyl Super MA alebo Novamyl [60].

Fungamyl Super MA je amyláza z vláknitej huby *Aspergillus oryzae*. Má synergický účinok s enzýmami, ako sú xylanázy a maltogénna amyláza [60].

TAB. 3. Použitie enzýmových preparátov firmy Novo Nordisk pri výrobe etanolu [59].
TAB. 3. Use of Novo Nordisk enzymes in alcohol production [59].

Technologický krok ¹	Enzýmový preparát ²	Teplota ³ [°C]	pH
Stekutenie ⁴	Termamyl 120L	85–95	6–6,5
	Ban 240L	70–80	6–6,5
	Fungamyl 800L	60–65	5–6
Scukornatenie ⁵	San Super 240L	50–55	5–6
Štiepenie proteínov ⁶	Neutrase 0,5L	40–45	5–5,6

1 - process step, 2 - enzyme preparation, 3 - temperature, 4 - liquefaction, 5 - saccharification, 6 - protein breakdown.

TAB. 4. Použitie amylolytických preparátov firmy Novo Nordisk pri odšlichtovaní [61].

TAB. 4. Novo Amylases for desizing [61].

Komerčný názov ¹	Deklarovaná sila ²	Rozsah teplôt na aplikáciu ³
Dezyme 140L*	140 KNU.ml ⁻¹	do 70 °C
Dezyme 280L	280 KNU.ml ⁻¹	do 70 °C
Dezyme 800MG**	800 KNU.g ⁻¹	do 70 °C
Aquazym 120L	120 KNU.g ⁻¹	do 70 °C
Thermozyme 140L	140 KNU.ml ⁻¹	70–115 °C
Thermozyme 280L	280 KNU.ml ⁻¹	70–115 °C
Thermamyl 60L	60 KNU.g ⁻¹	70–115 °C

* - L sú kvapalné enzýmové preparáty, ** - MG sú mikrogranulované enzýmové preparáty. Jednotka enzýmovej aktivity 1 KNU (Kilo Novo Unit) je definovaná ako množstvo α -amylázy, ktoré rozštiepi 5,26 g škrobu fy Merck, Amylum Solubile Erg.B.6, (Batch 9947275) za hodinu pri štandardnej metóde Novo Nordisk pre stanovenie aktivity α -amylázy pri nasledujúcich štandardných podmienkach: substrát - rozpustný škrob; pH 5,6; čas reakcie 7–20 min; teplota 37 °C.

* - L refers to liquid enzyme products, ** - MG refers to microgranulated enzyme preparations. The enzyme activity unit KNU (Kilo Novo Unit) is defined as the amount of α -amylase which breaks down 5.26 g of the starch fy Merck, Amylum Solubile Erg.B.6, (Batch 9947275) per hour using a standard method of Novo Nordisk for the determination of α -amylase activity under the following conditions: substrate - soluble starch; pH 5,6; reaction time 7–20 min; temperature 37 °C.

1 - trade name, 2 - standard strenght, 3 - application temperature range.

Novamyl je purifikovaná bakteriálna maltogénna amyláza, ktorá redukuje retrogradáciu škrobu. Má synergický účinok v kombinácii s preparátmi ako sú Fungamyl Super MA a Novozym 667, čo je purifikovaná 1,3-špecifická lipáza z *Humicola lanuginosa* (donor)/*Aspergillus oryzae* (akceptor) [60].

Amylolytické enzýmy sa môžu využívať aj v odšlichtovacom procese v textilnom priemysle, kde sa použitím enzýmových preparátov dosahuje úplné odstránenie škrobu bez poškodenia vlákna v dôsledku veľmi špecifického účinku amylolytických enzýmov, ktoré atakujú škrob bez ovplyvnenia celulóзовého vlákna. Toto enzýmové odstraňovanie škrobovej vrstvy je bezpečné a kompletne a odporúča sa pre odstraňovanie všetkých typov vrstiev obsahujúcich škrob ako v natívnej, tak aj v modifikovanej forme [61]. Kedysi sa používali amylázy z vláknitých húb, pankreasu alebo sladu. Dnes prevažuje použitie bakteriálnych amylázových preparátov. Firma Novo zásobuje textilný priemysel vysokokvalitnými amylázami už viac než 20 rokov. Od roku 1975 produkty Novo používané na tento účel môžu pracovať pri mier-nych, ale aj vysokých teplotách. Sú vyrábané v rôznych štandardných silách (tabuľka 4).

Amylolytické preparáty je možné tiež aplikovať do detergentných prípravkov. Napríklad už spomenuté preparáty z rady Termamyl (Termamyl[®]) a Ban spolu s lipolytickými (Lipolase[™], Lipolase Ultra) a proteolytickými (Esperase[®], Alcalase[®], Durazym[®]) preparátmi sú súčasťou detergentov [62].

Glukoamylázy sa používajú pri hydrolýze škrobu na alkohol a v pivovárníctve pri výrobe nízkoenergetického piva. Spolu s α -amylázami sa používajú v pekárskom priemysle pri štandardizácii múky, kde je nedostatok týchto enzýmov. Rozklad škrobu vedie ku kvalitnému kvasnému procesu.

Priemyselné cyklodextrínglukanotransferázy sú produkované druhmi rodu *Bacillus*. Cyklodextríny produkované týmito mikroorganizmami majú schopnosť viazať a chrániť „hostovskú“ molekulu. Táto vlastnosť sa využíva v potravinárstve (solubilizácia molekúl, odstraňovanie nežiaducich materiálov), vo farmaceutickom priemysle (zvýšenie rozpustnosti liečiv a ich ochrana, čo vedie k aplikácii nižšej dávky, a pod.) [63].

Záver

Amylolytické enzýmy majú svoje praktické uplatnenie v rôznych odvetviach priemyslu (potravinárskych aj nepotravinárskych), pretože ich substrátom sú škroby (škrobové materiály), ktoré sú v prírode a priemyselnej praxi hojne rozšírené. Z praktického hľadiska je veľmi dôležité poznať prostredie, v ktorom konkrétna amyláza pôsobí (alebo bude pôsobiť), pretože len tak sa dajú využiť všetky poznatky o ich štruktúre a aktivite a doslova pripraviť amylázy s takými parametrami, ktoré plne vyhovujú konkrétnej technológii.

V praxi sú žiadané amylázy hlavne termostabilné, pretože priemyselná degradácia škrobu na glukózu prebieha pri vyššej teplote, ako je teplotné optimum väčšiny natívnych amyláz. Existuje viacero ciest, ako získať takéto amylolytické preparáty. Termostabilné amylázy môžeme izolovať z ich prirodzených zdrojov (napríklad niektorých mikroorganizmov: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, extrémofilné mikroorganizmy) alebo ich izolovať z mezofilných mikroorganizmov, ktorých natívne amylázy nie sú termostabilné, ale následnou modifikáciou ich upraviť tak, aby tento parameter bol zabezpečený, samozrejme s ohľadom na ostatné faktory prostredia, kde konkrétna amyláza pôsobí. Tu je tiež viacero možností (chemická modifikácia, imobilizácia, genetická úprava a ich ďalšie variácie a kombinácie), ale pri výbere treba zohľadniť všetko to, čo vplýva nielen na úspešné pôsobenie danej amylázy, ale aj na celkovú nákladovosť konkrétnej aplikácie.

Stabilizácia α -amyláz by sa mala orientovať predovšetkým na využitie ich

známych štruktúrnych črt v kombinácii s metódami, napr. chemickej modifikácie alebo cielenej mutagenézy. Boli opísané mnohé prípady zámeny jednotlivých aminokyselinových zvyškov vedúce k zvýšeniu termostability u rôznych proteínov. Tieto prípady poukazujú na úlohu vodíkových väzieb, hydrofóbného efektu, disulfidových a soľných mostíkov [1]. Štúdie na α -amylázach boli zamerané na objasnenie úlohy vybraných aminokyselinových zvyškov [25,31,64,65], čo by malo umožniť dosiahnuť úspešnú stabilizáciu týchto enzýmov [1].

Literatúra

1. JANEČEK, Š. - BALÁŽ, Š.: α -Amylases and approaches leading to their enhanced stability. *FEBS Letters*, 304, 1992, s. 1-3.
2. LÉVEQUE, E. - JANEČEK, Š. - HAYE, B. - BELARBI, A.: Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 2000, s. 3-14.
3. JANEČEK, Š. - BALÁŽ, Š. - ROSENBERG, M. - STREDANSKÝ, M.: Chemical stabilization of *Bacillus subtilis* α -amylase by modification with D-glucono- δ -lactone. *Biotechnology Techniques*, 6, 1992, s. 173-176.
4. JOYET, P. - DECLERCK, N. - GAILLARDIN, C.: Hyperthermostable variants of a highly thermostable α -amylase. *Biotechnology*, 10, 1992, s. 1579-1583.
5. CHEN, H. M. - FORD, C. - REILLY, P. J.: Identification and elimination by site-directed mutagenesis of thermostable aspartyl bonds in *Aspergillus awamori* glucoamylase. *Protein Engineering*, 8, 1995, s. 575-582.
6. DECLERCK, N. - MACHIUS, M. - CHAMBERT, R. - WIEGAND, G. - HUBER, R. - GAILLARDIN, C.: Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase: thermodynamic studies and structural interpretation. *Protein Engineering*, 10, 1997, s. 541-549.
7. LI, Y. - COUTINHO, P. M. - FORD, C.: Effect on thermostability and catalytic activity of introducing disulfide bonds into *Aspergillus awamori* glucoamylase. *Protein Engineering*, 11, 1998, s. 661-667.
8. LEUSCHNER, C. - ANTRANIKIAN, G.: Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 1995, s. 95-114.
9. SUNNA, A. - MORACCI, M. - ROSSI, M. - ANTRANIKIAN, G.: Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles*, 1, 1997, s. 2-13.
10. NIEHAUS, F. - BERTOLDO, C. - KÄHLER, M. - ANTRANIKIAN, G.: Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 1999, s. 711-729.
11. PANDEY, A.: Glucoamylase research: An overview. *Starch/Stärke*, 47, 1995, s. 439-445.
12. JAMES, J. A. - BYONG, H. L.: Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology - a review. *Journal of Food Biochemistry*, 21, 1998, s. 1- 52.
13. JANEČEK, Š. - BALÁŽ, Š.: Štruktúra a stabilita α -amyláz. *Chemické listy*, 86, 1992, s. 830-838.
14. UCHINO, F.: A thermophilic and unusually acidophilic amylase produced by a thermophilic acidophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 1982, s. 7-13.
15. VIHINEN, M. - MÄNTSÄLÄ, P.: Microbial amylolytic enzymes. *Critical Reviews in Bioche-*

- mistry and Molecular Biology, 24, 1989, s. 329-418.
16. BROCK, T. D.: Life at high temperatures. *Science*, 158, 1967, s. 1012-1019.
 17. WARD, O. P. - MOO-YONG, M.: Thermostable enzymes. *Biotechnology Advances*, 6, 1988, s. 39-69.
 18. ZAMOST, B. J. - NIELSEN, H. K. - STARNES, R. L.: Thermostable enzymes. *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 1991, s. 71-82.
 19. MOZHAEV, V. V. - MARTINEK, K.: Structure-stability relationships in proteins: New approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microbiology and Technology*, 6, 1984, s. 50-59.
 20. JANEČEK, Š.: Strategies for obtaining stable enzymes. *Process Biochemistry*, 28, 1993, s. 435-445.
 21. SPECKA, U. - MEYER, F. - ANTRANIKIAN, G.: Purification and properties of the thermoactive glucoamylase from *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1991, s. 2317-2323.
 22. TOMAZIC, S. J. - KLIBANOV, A. M.: Why is one *Bacillus* α -amylase more resistant against irreversible thermoinactivation than another? *Journal of Biological Chemistry*, 263, 1988, s. 3092-3096.
 23. TOMAZIC, S. J. - KLIBANOV, A. M.: Mechanisms of irreversible thermal inactivation of *Bacillus* α -amylases. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 1988, s. 3086-3091.
 24. BRUMM, P. J. - TEAGUE, W. M.: Reduced stability *Bacillus stearothermophilus* α -amylase for food applications. *Biotechnology Letters*, 10, 1988, s. 445-450.
 25. SUZUKI, Y. - ITO, N. - YUUKI, T. - YAMAGATA, H. - UDAKA, S.: Amino acid residues stabilizing a *Bacillus* α -amylase against irreversible thermoinactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 1989, s. 18933-18938.
 26. KLIBANOV, A. M.: Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science*, 219, 1983, s. 722-727.
 27. BRUMM, P. J. - TEAGUE, W. M.: Effect of additives on the thermostability of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase. *Biotechnology Letters*, 11, 1989, s. 541-544.
 28. MOZHAEV, V. V. - MELIK-NUBAROV, N. S. - ŠIKŠNIS, V. A. - MARTINEK, K.: Strategy for stabilizing enzymes. Part two: Increasing enzyme stability by selective chemical modification. *Biocatalysis*, 3, 1990, s. 189-196.
 29. URABE, J. - NANJO, H. - OKADA, H.: Effect of acetylation of *Bacillus subtilis* α -amylase on the kinetics of heat inactivation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 302, 1973, s. 73-79.
 30. HORA, J.: Stabilization of *Bacillus subtilis* α -amylase by amino-group acylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 310, 1973, s. 264-267.
 31. MONSAN, P. - COMBES, D.: Enzyme stabilization by immobilization. *Methods in Enzymology*, 137, 1988, s. 584-598.
 32. NAVRÁTIL, M. - ŠTURDÍK, E.: Chemické aspekty imobilizovaných systémov v biotechnológiach. *Chemické Listy*, 94, 2000, s. 380-388.
 33. JANEČEK, Š.: Stabilizácia enzýmov. [*Ašpirantské minimum.*] Bratislava : Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, 1990. 41 s.
 34. STEFANOVA, M. E. - TONKOVA, A. I. - DOBREVA, E. P. - SPASOVA, D. I.: Agar-gel immobilization *Bacillus brevis* cells for production of thermostable α -amylase. *Folia Microbiologica*, 43, 1998, s. 42-46.
 35. BAGAI, R. - MADAMAR, D.: Continuous production of halophilic α -amylase through whole-cell immobilization of *Halobacterium salinarum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 62, 1997, s. 213-218.
 36. FURUTA, H. - ARAI, T. - HAMA, H. - SHIOMI, N. - KONDO, A. - FUKUDA, H.: Production of glucoamylase by passively immobilized cells of a flocculant yeasts, *Saccharomyces diastaticus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84, 1997, s. 169-171.

37. KLINGEBERG, M. - VORLOP, K. D. - ANTRANIKIAN, G.: Immobilization of anaerobic thermophilic bacteria for the production of cell-free thermostable α -amylases and pullulanases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 1990, s. 494-500.
38. RAY, R. R. - JANA, S. C. - NANDA, G.: β -Amylase production by immobilized cells of *Bacillus megaterium* B-6. *Journal of Basic Microbiology*, 35, 1995, s. 113-116.
39. ULBRICH, R.: Comparison of chemical and thermal stability of soluble and immobilized α -amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus oryzae*. *Biomedica et Biochimica Acta*, 47, 1988, s. 821-830.
40. SCHELLENBERGER, A. - ULBRICH, R.: Protein stabilization by blocking the native unfolding nucleus. *Biomedica et Biochimica Acta*, 48, 1989, s. 63-67.
41. ANTRANIKIAN, G.: Microbial degradation of starch. In: WINKELMANN, G. (ed.): *Microbial degradation of natural products*. Weilheim : VCH, 1992, s. 28-50.
42. ILLÁŠ, M.: Aplikácia enzýmov Novo vo fermentačnom priemysle. Trnava : Biotech Trnava, 1999. 14 s.
43. TREGUBOV, N. N. - ŽAROVOVÁ, J. J. - ŽUŠMAN, A. J. - SIDOROVOVÁ, J. K.: *Technológia škrobu a výrobkov zo škrobu*. Bratislava : Alfa, 1986. 484 s.
44. DRDÁK, M. - STUDNICKÝ, J. - MÓROVÁ, E. - KAROVIČOVÁ, J.: *Základy potravinárskych technológií*. Bratislava : Malé centrum, 1996. 495 s.
45. GORDON, I. - KRISHNAKUMAR, I. V.: The EU market for starch and derivatives. *European Food Drink Review*, 8, 1995, s. 66-70.
46. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: NovoNordisk - Enzyme für die Starke - Industry. 1990. 6 s.
47. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: BAN. 1996. 3 s.
48. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Termamyl 120 L, Type L. 1996. 4 s.
49. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Use of Termamyl® for Starch Liquefaction. 1990. 4 s.
50. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Termamyl® Type LS. 1994. 2 s.
51. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Termamyl® Type S. 1994. 2 s.
52. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Liquozyme® 120 L Type S. 1998. 2 s.
53. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Use of amyloglucosidase and Promozyme® in the production of high dextrose syrup. 1990. 4 s.
54. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Use of Fungamyl® and amyloglucosidase in the production of high maltose conversion syrups. 1989. 4 s.
55. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: AMG. 1996. 3 s.
56. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Fungamyl. 1994. 2 s.
57. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Fungamyl® Super 500 BG. 1997. 2 s.
58. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: SAN Super. 1991. 2 s.
59. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Use of Novo Nordisk enzymes in alcohol production. 1991. 6 s.
60. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: One page guide to baking enzymes. 1997. 2 s.
61. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Novo enzymes for the textile industry. Recipes for enzymatic desizing. 1990. 6 s.
62. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Dezyme TM. 1989. 2 s.
63. LÉVEQUE, E.: Clonage d'un gène codant pour une α -amylase à partir de l'archaebactérie thermophile *Thermococcus hydrothermalis* AL 662. Etude des parentés phylogénétiques avec les autres α -amylases. [Dizertačná práca.] Université de Reims-Champagne-Ardenne, 1998. 242 s.
64. HOLM, L. - KOIVULA, A. K. - LEHTOVAARA, P. M. - HEMMINK, A. - KNOWLES, J. K. C.: Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermo-*

- philus* α -amylase. Protein Engineering, 3, 1990, s. 181-191.
65. VIHINEN, M. - OLLIKKA, P. - NISKANEN, J. - MEYER, P. - SUOMINEN, I. - KARP, M. - HOLM, L. - KNOWLES, J. - MÄNTSÄLÄ, P.: Site directed mutagenesis of a thermostable α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues. Journal of Biochemistry, 107, 1990, s. 267-272.

Do redakcie došlo 26.9.2000.

Stability, stabilization and application of amylases

HORVÁTHOVÁ, V. - ŠTURDÍK, E. - JANEČEK, Š.: Bull. potrav. Výsk., 40, 2001, p. 1-20.

SUMMARY. This review presents some of the most important application fields of amylases using predominantly the stable amylases. Amylolytic enzymes are produced by a wide spectrum of living organisms, such as microorganisms, plants and animals. From the practical point of view, however, mainly microbial amylases produced by mesophilic, thermophilic and/or extremophilic microorganisms have been used. Since the amylases from mesophilic microorganisms utilized in the industry do not possess the requested stability, this work presents the survey of the knowledge on their modification. There are several possibilities how to modify the amylases. The choice of modification depends on various factors among which dominate those resulting from the structure-activity relationships (closely related to the environment of their action).

KEYWORDS: amylolytic enzymes; stability; stabilization; utilization