



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

245195

(11)

(B1)

/22/ Prihlásené 10 12 84
/21/ PV 9563-84

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 9/42

(40) Zverejnené 16 12 85

(45) Vydané 15 10 87

(75)
Autor vynálezu

BIELY PETER RNDr. CSc.; HRMOVÁ MÁRIA RNDr. CSc.;
VRŠANSKÁ MÁRIA RNDr. CSc., BRATISLAVA, DUČÁK JÁN ing., KEŽMAROK,
ZATROCH JÚLIUS ing., SVIT

(54) Spôsob prípravy enzýmov extracelulárnych celuláz

Spôsob prípravy enzýmov extracelulárnych celuláz. Uvedeného účelu sa dosiahne tak, že sterilné tekuté kultivačné medium obsahujúce 0,8 až 1,2 % hmot. mletého alebo strihaného celofánu o veľkosti častíc 1 až 10 mm² sa zaočkuje spórovou suspenziou *Trichoderma reesei* a kultivuje sa pri teplote 29 až 33 °C za premiešavania po dobu 8 až 12 dní, po ktorých sa oddelí kvapalný podiel. S výhodou sa zaočkuje spórovou suspenziou kmeňa huby *Trichoderma reesei* CCM F-766. Spôsob prípravy enzýmov extracelulárnych celuláz má použitie v potravinárskom, krmovinnárskom, farmaceutickom a chemickom priemysle.

Vynález sa týka spôsobu prípravy enzýmov extracelulárnych celuláz.

Základným problémom širokého využitia celulólytických enzýmov v potravinárskom, krmo-
vinárskom, farmaceutickom a chemickom priemysle je ich pomerne vysoká cena [C. R. Wilke,
R. D. Yang, A. F. Sciamanna, R. P. Freitas: Biotechnol. Bioeng. 23, 163 /1981/].

Jednou z ciest zníženia výrobných nákladov celulólytických enzýmov je hľadanie lacných
zdrojov uhlíka na kultiváciu produkčných mikroorganizmov. Celulázy sú induktívne extracelu-
lárne enzýmy, ktoré produkujú mikroorganizmy za prítomnosti celulózy v rastovom médiu.

Na produkciu mikrobiálnych celuláz sa vyskúšali najrozličnejšie zdroje uhlíka obsahujúce
celulózu. Patria medzi ne prírodné, upravované a chemicky čisté celulózy a hemicelulózy,
lignocelulózy, rôzne poľnohospodárske zvyšky, priemyselné a mestské odpady, ktoré môžu byť
rozpuštného alebo nerozpuštného charakteru [D. D. Y. Ryu, M. Mandels: Enzyme Microb. Technol.
2, 91 /1980/].

Najlepšími zdrojmi uhlíka na produkciu celuláz u kmeňa *Trichoderma reesei* QM6a a jeho
mutantov sú substráty, ktoré predstavujú prírodnú mikrokryštalickú celulózu [M. Mandels,
J. Weber: Adv. Chem. Ser. 95, 391 /1969/].

Surový celulázový preparát je možné v ďalšom kroku previesť do pevnej formy precipitáciou
acetónom tak, že sa riedi acetónom v objemovom pomere 3:1 [C. R. Wilke Int. Congr. Engin.
Food, Boston, 10 /1976/], alebo precipituje síranom amónnym medzi 20 a 40 % hmot. saturácie
[M. Nummi, M. L. Niku-Paavola, T. M. Enari, V. Raunio: FEBS Lett. 113, 164 /1980/]. Výrobná
cena čistej mikrokryštalickej celulózy predstavuje cenovú bariéru v procese výroby celulo-
lytických enzýmov.

Uvedenú nevýhodu v podstatnej miere odstraňuje spôsob prípravy enzýmov extracelulárnych
celuláz podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že sterilné tekuté kultivačné médium
obsahujúce 0,8 až 1,2 % hmot. mletého alebo strihaného celofánu o veľkosti častíc 1 až 10 mm²
sa zaočkuje spórovou suspenziou huby *Trichoderma reesei* a kultivuje sa pri teplote 29 až
33 °C za premiešavania po dobu 8 až 12 dní, po ktorých sa odstráni kvapalný podiel. Ďalej je
podstatou vynálezu, že sa zaočkuje spórovou suspenziou kmeňa huby *Trichoderma reesei* CCM
F-766.

Výhodou navrhovaného spôsobu produkcie enzýmov extracelulárnych celuláz je, že umožňuje
využitie odpadného celofánu, ktorý ako pomerne čistá celulóza je jediným zdrojom uhlíka a
súčasne induktorom syntézy enzýmov.

Avšak pre tento spôsob ekonomického zhodnotenia odpadného celofánu je možné použiť len
chemicky čistý celofánový odpad, aby nedochádzalo k inhibícii rastu produkčných mikroorganizmov
v dôsledku prítomnosti toxických látok.

Takýmto spôsobom sa znižuje cena celuláz o hodnotu, ktorú je potrebné vynaložiť na iný
uhlíkový substrát. Ďalšou výhodou je, že sa takto využíva odpad, ktorý sa ekonomicky zhodnocuje
a súčasne sa odstraňuje nelakovaný celofánový podiel, ktorý ináč znečisťuje životné prostredie
v okolí závodov. Tento substrát doteraz nebol využívaný k produkcii celuláz.

Kmeň *Trichoderma reesei* CCM F-766 bol získaný mutagenezou v lineárnom akcelérátore z kmeňa
Trichoderma reesei QM 9123, ktorý pochádza z pôvodného kmeňa *Trichoderma reesei* QM6a označo-
vaného do roku 1977 ako *Trichoderma viride* [M. Mandels, J. Weber, R. Parizek: Appl. Microbiol.
21, 152 /1971/].

Kmeň *Trichoderma reesei* CCM F-766 je uložený v Československej zbierke mikroorganizmov
Univerzity J. E. Purkyně v Brne, trída Obráncu míru 10 pod uvedeným číslom. Na pevnom glukó-
zovom médiu rastie vo forme riedkeho až hustejšieho vatovitého mycéliárneho porastu. Mycélium

neskôr na okrajoch a potom na celej ploche sporuluje. Fialidy sa tvoria buď priamo na hlavnom vlákne alebo na postranných vetvách jednotlivito alebo v riedkych praslenoch. Sú fľaškovitého tvaru kratšie alebo dlhšie, široké 2,5 až 3 μm . Konídie sú guľovité alebo široko oválne s jemne drsným povrchom. Ich dĺžka je 3,6 až 4,8 μm a šírka 3,5 až 4 μm .

Kmeň *Trichoderma reesei* CCM F-766 je z hľadiska produkcie celuláz vysokoprodukčný, keďže na celulóзовých substrátoch produkuje približne 3 až 4krát vyššie výťažky enzýmov ako pôvodný kmeň *Trichoderma reesei* QM6a.

Kmeň produkuje na mikrokryštalickej celulóze alebo v prítomnosti oligosacharidov ako sú napr. soforóza, laktóza a celobióza inducibilný kompletný celulázový enzýmový systém, t.j. endo-1,4-beta-D-glukanázu /EC 3.2.1.4/ a exo-1,4-beta-D-glukanázu /EC 3.2.1.91/ a ďalej beta-D-glukozidázu /EC 3.2.1.21/. Syntéza celulázového komplexu je reprimovaná vysokou koncentráciou ľahko využiteľných uhlíkových substrátov ako napr. glukóza.

Pr í k l a d 1

Spórovou suspenziou huby *Trichoderma reesei* CCM F-766 sa zaočkuje sterilné tekuté kultivačné médium obsahujúce 0,2 % hmot. dihydrofosforečnanu draselného, 1,4 % hmot. síranu amónneho, 0,03 % hmot. močoviny, 0,03 % hmot. chloridu vápenatého, 0,03 % hmot. síranu horečnatého, 0,005 % hmot. síranu železnatého, 0,00016 % hmot. síranu mangánatého, 0,00014 % hmot. síranu zinočnatého, 0,0002 % hmot. chloridu kobaltnatého, 0,1 % hmot. mykologického peptónu /Oxoid/ a 0,2 % hmot. detergentu obsahujúceho ako účinnu látku polyoxyetylén sorbitan monoleát /Tweene 80/.

Ako jediný zdroj uhlíka kultivačné médium obsahuje 1,2 % hmot. mletého, chemicky čistého celofánu o ploche častíc približne 1 až 5 mm^2 , ktoré sa získajú tak, že celofánové fólie sa melú na mlyne /Weverk/. Kultivácia produkčného mikroorganizmu prebieha po dobu 8 dní pri teplote 29 °C na rotačnej trepačke /2,5 Hz/.

Po odstránení narastenej biomasy a zvyškov celofánu, ktoré predstavujú 5 až 10 % hmot. počiatočného množstva celofánu, sa získa tekutina obsahujúca v 1 ml 0,5 až 0,6 jednotiek celulázy. Za jednotku aktivity je považované také množstvo enzýmu, ktoré v 0,05 mol.l^{-1} acetátovom tlmivom roztoku o pH 5,4 pri teplote 50 °C uvoľní v 0,5 ml inkubačnej zmesi obsahujúcej filtračný papier dĺžky 2 cm a šírky 1 cm /Whatman 1/ redukujúce sacharidy rovné 1 umólu ekvivalentov glukózy [M. Mandels, J. Weber: Adv. Chem. Ser. 95, 391 /1969/].

Získaná aktivita celulólytických enzýmov dosahuje približne 50 % hladiny celuláz stanovených v médiu s 1 % hmot. mikrokryštalickou celulózu. Napriek týmto rozdielom vo výťažku aktivity celuláz enzýmové systémy huby *Trichoderma reesei* QM 9414 produkované na celofáne a mikrokryštalickej celulóze vykazujú podobné enzýmové zloženie.

Metódou izoelektrickej fokusácie na horizontálnych polyakrylamidových géloch s následnou detekciou enzýmov pomocou replík sa v odsolených prepatátoch enzýmov nezistujú podstatné rozdiely v zastúpení mnohotných foriem endo-1,4-beta-D-glukanáz a endo-1,4-beta-D-xylanáz.

Pr í k l a d 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije ako zdroj uhlíka 0,8 % hmot, strihaný celofán o ploche častíc 5 až 10 mm^2 . Kultivácia produkčného mikroorganizmu prebieha po dobu 12 dní pri teplote 31 °C na rotačnej trepačke /2,5 Hz/. Po odstránení narastenej biomasy a zvyškov celofánu, ktoré predstavujú 15 až 25 % hmot. počiatočného množstva celofánu, sa získa tekutina obsahujúca v 1 ml 0,2 až 0,4 jednotiek celulázy.

P r í k l a d 3

Postupuje sa ako v príklade 2 s tým rozdielom, že kultivácia produkčného mikroorganizmu prebieha po dobu 12 dní pri teplote 33 °C na rotačnej trepačke /2,5 Hz/. Po odstránení narastenej biomasy a zvyškov celofánu, ktoré predstavujú 30 až 60 % hmot. počiatočného množstva celofánu, sa získa tekutina obsahujúca v 1 ml 0,05 až 0,075 jednotiek celulázy.

Surový tekutý enzýmový preparát pripravený podľa príkladu 1 a 2 je medziproduktom pri príprave surovej prečistenej práškovej celulázy, pričom sa postupuje známymi spôsobmi [M. Ferenčík, B. Škárka: Biochemické laboratórne metódy, Bratislava, Alfa, 566 /1981/].

P r í k l a d 4

Surový tekutý enzýmový preparát sa zahusťuje na rotačnej vákuovej odparke alebo ultrafiltráciou pri teplote 20 až 22 °C a tlaku 4 až 5 kPa na 1/10 pôvodného objemu. Z takto zahusteného preparátu sa separujú nízkomolekulové balastné látky v celofánových dialyzačných trubiciach v destilovanej vode pri teplote 4 °C a v ďalšom sa roztok celulázy lyofilizuje. Enzýmový preparát sa uchováva v práškovej forme v exikátore pri teplote 4 °C.

Vynález môže nájsť široké použitie na produkciu extracelulárnych celuláz, ktorými sa dajú využiť mechanicky predupravené substráty obsahujúce celulózu /rastlinné prírodné celulózy, hemicelulózy a lignocelulózy, poľnohospodárske zvyšky a priemyselné a mestské odpady/ na produkciu sacharidov, ktoré môžu slúžiť na prípravu mikrobiálnych bielkovín pre potravinársky a krmovinársky priemysel alebo pre produkciu palív ako aj iných látok vhodných pre farmaceutický a chemický priemysel.

P R E D M E T V Y N Á Ľ E Z U

1. Spôsob prípravy enzýmov extracelulárnych celuláz v sterilnom tekutom kultivačnom médiu vyznačujúci sa tým, že sterilné tekuté kultivačné médium obsahujúce 0,8 až 1,2 hmot. mletého alebo strihaného celofánu o veľkosti častíc 1 až 10 mm² sa zaočkuje spórovou suspenziou huby *Trichoderma reesei* a kultivuje sa pri teplote 29 až 33 °C za premiešavania po dobu 8 až 12 dní, po ktorých sa oddelí kvapalný podiel.

2. Spôsob prípravy enzýmov extracelulárnych celuláz podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa zaočkuje spórovou suspenziou kmeňa huby *Trichoderma reesei* CCM F-766.