



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

226614

(11) (B1)

(22) Prihlásené 14 01 81
(21) (PV 269-81)

(40) Zverejnené 26 08 83

(45) Vydané 15 02 86

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/14

(75)
Autor vynálezu

FARKAŠ VLADIMÍR ing. CSc., BRATISLAVA, LABUDOVÁ IVICA ing., KOŠICE,
BAUER ŠTEFAN dr. ing. DrSc., BRATISLAVA, FERENCZY LAJÓŠ dr., SZEGED

(54) Kmeň mikroorganizmu *Trichoderma reesei* MHC 22 CCF 1855

1

Vynález sa týka nového kmeňa mikroorganizmu *Trichoderma reesei* MHC 22 CCF 1855, ktorý produkuje celulázový enzýmový komplex obsahujúci zvýšenú hladinu beta-glukozidázy.

Imperfektná mikroskopická huba *Trichoderma reesei* QM 9414 produkuje pri povrchovej a submerznej kultivácii na vhodnom substráte celulázový enzýmový komplex, schopný hydrolyzovať natívnú celulózu, to znamená komplexnú zmes polysacharidov typu celulózy a hemicelulózu na mono- a nižšie oligosacharidy. Pretože hladina beta-glukozidázy v produkovanej celulázovej systéme je veľmi nízka (Sternberg D.: Appl. Environ. Microbiol. 31, 648 /1976/) v hydrolyzáte celulózy prevláda celobióza ako hlavný degradačný produkt (Ghose T. K., Bisaria V. S.: Biotechnol. Bioeng. 21, 131 /1979/). Nakoľko celobióza je len veľmi slabo užívaná kvasinkami používanými na ďalšie zhodnocovanie celulóзовých hydrolyzátoov je žiaduce, aby všetka celobióza v hydrolyzáte bola konvertovaná najprv na glukózu. V praxi sa to doteraz riešilo pridávaním exogénnej beta-glukozidázy z iného zdroja ku zmesi enzýmov z *Trichoderma reesei* (Sternberg D., Vijaykumar P., Reese E. T.: Can. J. Microbiol. 23, 139 /1977/), alebo rozkladom celobiózy v kontinuálnom reaktore obsahujúcom imobilizovanú beta-glukozidázu (Sachdev R. K., Ghose T. K.: Proceedings of the Symposium on Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals and Microbial Protein (I. K. Ghose, ed.) Indian Institute of Technology, Delhi, /1977/.

Kmeň *Trichoderma reesei* MHC 22 CCF 1855, ktorý je predmetom tohto vynálezu, odstraňuje tieto nevýhody tým, že produkuje za rovnakých podmienok zhruba trojnásobne vyššiu hladinu enzýmu beta-glukozidázy, čo sa prejaví v zvýšení koncentrácie glukózy na úkor celobiózy v hydrolyzáte celulózy. Napr. po 2 hod. hydrolyzy je mólový pomer glukóza : celobióza 0,28 s enzýmom *Trichoderma reesei* QM 9414, zatiaľ čo pri použití enzýmu z kmeňa MHC 22 je tento pomer 4,3. Kmeň MHC 22 CCF 1855 je uložený v zbierke Katedry botaniky University Karlovy.

226614

v Praze 2, Benátská 2. Kmeň MHC 22 sa získal ožarovaním konídií kmeňa *Trichoderma reesei* QM 9414 získaného z American Culture Collection of Fungi (QM), University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, USA, UV-svetlom počas 5 minút. Hlavnou výhodou nového kmeňa je zvýšená produkcia beta-glukozidázového komponenta produkovaného celulólytického enzýmového systému. Pri pestovaní na 1 % mikrokryštalickej celulóze ako zdroji uhlíka dosahuje špecifická aktivita beta-glukozidázy 0,50 až 0,70 j/mg extracelulárneho proteínu, zatiaľ čo s materským kmeňom QM 9414 je špecifická aktivita beta-glukozidázy 0,20 až 0,25 j/mg extracelulárneho proteínu.

Jednotkou aktivity beta-glukozidázy sa rozumie množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje hydrolýzu 1 μ molu p-nitrofenyl-beta-D-glukopyranozidu za 1 minútu za podmienok stanovenia podľa (Berghem L. E. R., Pettersson L. G.: Eur. J. Biochem. 53, 55 /1973/). Morfológia: mycélium vláknité, husto vetvené, zriedkavo septované, hemisférický apex. Priemer hýf 0,8 až 1,5 μ m. Konídiionosiče kratšie a rozvetvené, fialidý zvyčajne jednotlivé, striedavé, alebo protistojace. Konídiá hojné, zeleno až zelenohnedo pigmentované, elipticko ovoidné, priemer 2,3 až 3,0 μ m, alebo niekedy elipsoidné, priemer 2,5 až 3,0 x 3,8 až 4,5 μ m. Pri submerznej kultivácii občasné chlamydospóry, sférické, priemer do 8,0 μ m. Konídiácia indukovateľná svetlom. V pôde obsahujúcej dostatok všetkých živín produkuje žltý, vo vode rozpustný pigment.

Mikroorganizmus rastie na: D-glukóze, D-galaktóze, D-manóze, laktóze, melibióze, D-fruktóze, D-xyulóze, L-arabinóze, D-arabinóze, celobióze, eskulíne, trehalóze, škrobe, etanole, glycerole, D-erytritole, D-ribitole, D-manitole, D-sorbitole, dulcitol, m-inozitole, acetáte, sukcináte, fumaráte, maláte, citráte, glukoronáte, celulóze, alebo rastie na: maltóze, rafinóze, L-sorbóze, arbutíne, salicíne, inulíne, laktáte, tartráte a malonáte, nerastie na: sacharóze, alfa-metyl-D-glukozide, melezitóze, L-ramnóze.

P r í k l a d

Kmeň *Trichoderma reesei* MHC 22 sa kultivuje vo fermentori v živnom médiu nasledovného zloženia (v gramoch na liter): močovina 0,3; síran amónny 1,4; dihydrogénfosforečnan draselný 0,2; heptahydrát síranu horečnatého 0,3; chlorid vápenatý 0,3; kvasničný extrakt 0,1; mikrokryštalická celulóza 10,0; Tween 80 2,0; peptón 1,0; síran železnatý $5 \cdot 10^{-6}$; hydrát síranu manganatého $1,4 \cdot 10^{-6}$; chlorid zinočnatý $1,7 \cdot 10^{-6}$; chlorid kobalnatý $2 \cdot 10^{-6}$.

Teplota kultivácie je 28 °C, prevzdušňovanie 0,15 až 0,30 v/v/min., rýchlosť otáčok miešadla 300 až 1,500 ot./min v závislosti na konštrukcii fermentora. Ako inokulum sa použije baničková kultúra v logaritmickú fázu rastu vypestovaná submerzne z konídií v rovnakom médiu aké bolo použité vo fermentorovej kultivácii. Objem inokula je 10 % z objemu fermentačnej zmesi. Kultivácia prebieha počas 5 až 7 dní, pričom sa sleduje celková celulózová aktivita (Mandels M., Antreotti R., Roche C.: Biotechnol. Bioeng. Symp. 6, 21 /1976/) a aktivita beta-glukozidázy v médiu. pH kultúry sa počas kultivácie udržiava v rozmedzí 4,0 až 4,5. Keď celulózová aktivita v médiu dosiahne maximálnej hodnoty (okolo 3 až 3,5 jednotiek FP) ml médium sa scentrifuguje a číry supernatant sa použije ako zdroj celulólytických enzýmov.

Celulólytický enzýmový komplex z *Trichoderma reesei* MHC 22 sa dá použiť pri sacharifikácii celulózy a lignocelulóзовých substrátov a je potrebné pri enzýmovej hydrolýze celulózy dosiahnuť maximálnej konverzie na glukózu. Vynález má použitie v potravinárstve, farmácii, pivovarníctve a vinárstve.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Kmeň mikroorganizmu *Trichoderma reesei* MHC 22 CCF 1855, produkujúci celulólytický enzýmový komplex, obsahujúci zvýšenú hladinu beta-glukozidázového komponentu.