



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

205 311

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 03 06 77
(21) PV 3653-77

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/42

(40) Zverejnené 29 08 80
(45) Vydané 01 08 83

(75)

Autor vynálezu KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. DrSc., BRATISLAVA, ZEMEK JURAJ ing. CSc.,
LEHNICA, KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc. a AUGUSTÍN JOZEF PhMr., BRATISLAVA

(54) Spôsob produkcie enzýmov štiepiacich celulózu

1

Vynález sa týka spôsobu produkcie enzýmov štiepiacich celulózu pomocou kvasinkovitých organizmov.

Ako producenti celulázového enzýmového systému sa využívajú predovšetkým mikroskopické druhy húb, a to *Trichoderma viride* a *Trichoderma koningii* /US patent č. 3398055/. Aj keď u niektorých izolátov, predovšetkým *Trichoderma viride*, je špecifická aktivita produkcie celulázového enzýmového systému pomerne vysoká /až 0,4 U/mg/, nevýhodou je dlhá lag fáza predchádzajúca vlastnú tvorbu celulázového enzýmového systému, široká variabilita vlastností, tvorba mykotoxínov u niektorých izolátov a strata produkčných schopností počas uchovávanía produkčných kmeňov.

Uvedené nevýhody odstraňuje spôsob produkcie enzýmov štiepiacich celulózu, ktorého podstata spočíva v tom, že kmene

<i>Leucosporidium scotii</i>	CCY 64-1-1
<i>Leucosporidium capsuligenum</i>	CCY 64-2-1
	CCY 64-2-2
	CCY 64-5-1

sa jednotlivo alebo v zmesi predkultivujú na minerálnej živnej pôde obsahujúcej β /1 $\rightarrow$ 4/ glukán ako induktor enzýmu pri teplote 28 °C po dobu 72 hodín pri pH 5,9 a následne preočkujú na produkčnú pôdu s celulózu, dusíkom vo forme amónnej soli a fosfátom, pH 4,2 až 6,5, pričom

205 311

celuláza sa produkuje po dobu 120 hodín pri teplote 20 až 40 °C a izoluje odparením rastovej pôdy, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo organickým rozpúšťadlom s výhodou etylalkoholom.

Kmene rodu *Leucosporidium* použité na produkciu celulázy sú uložené v čs. zbierke kvasiniek, Chemický ústav SAV, Bratislava, Dúbravská cesta.

Výhodou uvedeného postupu je vysoká špecifická aktivita produkovaného celulázového enzýmového komplexu, v súhrne až 0,54 U/mg, stabilita zmesnej kultúry počas kultivácie a možnosť využitia nutrične hodnotnej kvasinkovitej biomasy ku skrmovaniu.

Príklad 1

Z vypratého gélu, pripraveného zo sieťovanej hydroxyetylcelulózy AO č. 183 169, sa vyrežú trojuholníkové profily o strane 4 cm, a vložia sa do Petriho misky a zalejú sa roztokom kultivačného média Yeast Nitrogen Base /Oxoid/ /0,6 g/l/ s gélom hydroxyetylcelulózy ako jediným zdrojom uhlíka. Po sterilizácii pri 100 °C /3 krát, po dobu 1 hodiny/ sa očkuje na povrchu gélu kultúra *Leucosporidium scottii* CCY 64-1-1 a kultivuje sa pri 28 °C. Celulózový gél skvapalnený v priebehu 72 hodín spolu s pomnoženou biomasou *L. scottii* /0,23 g/ sa použil ako čiastočne vyšľachtené inokulum na produkčnú pôdu /2 l/ z odpadu hydroxyetylcelulózovej vaty /150 g/ a 4 g síranu amónneho a 2 g dihydrofosforečnanu draselného /pH 5,9/. Kultivácia prebiehala po dobu 120 hodín pri 28 °C. Po ukončení kultivácie sa biomasa odcentrifugovala /2000 g, 5 minút/ a supernatant sa zahustil na odparke. Získal sa surový enzýmový preparát s celulázovou aktivitou 58 U a špecifickou aktivitou 0,43 U/mg.

Príklad 2

Rovnako ako v príklade 1, s tým rozdielom, že namiesto *Leucosporidium scottii* sa použil kmeň *Leucosporidium capsuligenum* CCY 64-2-2. Výsledný surový enzýmový preparát mal aktivitu 21 U a špecifickú aktivitu 0,53 U/mg.

Príklad 3

Rovnako ako v príklade 1 s tým rozdielom, že v produkčnej pôde sa použije namiesto hydroxyetylcelulózy 0,2 % karboxymetylcelulóza a 0,8 % kukuričný výluh. Výsledný surový enzýmový preparát mal aktivitu 62 U a špecifickú aktivitu 0,11 U/mg.

Príklad 4

Rovnako ako v príklade 1 s tým rozdielom, že enzýmový preparát s celulázovou aktivitou 55 U a špecifickou aktivitou 0,92 U/mg sa získal vyzrážaním enzýmu 655 g síranu amónneho na 1 l pôdy.

Príklad 5

Rovnako ako v príklade 1 s tým rozdielom, že k zaočkovaniu sa použili 4 kmene rodu *Leucosporidium* v zmesi, a to: *Leucosporidium scottii* CCY 64-1-1 a *Leucosporidium capsuligenum* CCY 64-2-1, CCY 64-2-2 a CCY 64-5-1. Získaný surový enzýmový preparát mal celulázovú aktivitu 89 U a špecifickú aktivitu produkcie 0,68 U/mg biomasy.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob produkcie enzýmov štiepiacich celulózu, vyznačujúci sa tým, že kmene

Leucosporidium scottii CCY 64-1-1

" *capsuligenum* CCY 64-2-1

CCY 64-2-2

CCY 64-5-1

sa jednotlivu alebo v zmesi predkultivujú na minerálnej živnej pôde obsahujúcej β /1 $\rightarrow$ 4/ glukán ako induktor enzýmu pri teplote 28 °C po dobu 72 hodín pri pH 5,9 a následne preočkujú na produkčnú pôdu s celulózu, dusíkom vo forme amónnej soli a fosfátom, pH 4,2 až 6,5, pričom celulóza sa produkuje po dobu 120 hodín pri teplote 20 až 40 °C a izoluje odparením rastovej pôdy, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo organickým rozpúšťadlom s výhodou etylalkoholom.