



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

205 314

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 24 06 77
(21) PV 4191-77

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/42

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

(75)

Autor vynálezu ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA, KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., AUGUSTÍN JOZEF
PhMr., BRATISLAVA a MARVANOVÁ ĽUDMILA RNDr. CSc., BRNO

(54) Spôsob produkcie enzýmov štiepiacich celulózu

1

Vynález rieši spôsob produkcie enzýmov štiepiacich celulózu pomocou niektorých kmeňov mikroskopických húb.

Ako producenti celulázového enzýmového systému sa využívajú niektoré kmene rodu *Trichoderma* (US patent č. 3398055), u ktorých je nevýhodou pomerne dlhá lag fáza predchádzajúca vlastnú tvorbu celulózy, široká variabilita vlastností, možnosť výskytu mykotoxínov, a tým nie vždy vhodnosť použitia v potravinárstve a krmovinárstve. Schopnosť produkovať celulózu bola v rámci rodu *Botrytis* popísaná u *Botrytis cinerea*, *Botrytis allii* a *Botrytis squamosa* (J. G. Hancock, R. L. Miller and J. W. Lorbeer, *Phytopathology* **54**, 928 (1961); a Verhoeff, K. Werre, Jodtr M., *Neth. J. Plant. Pathol.* (1972) **78**, 179), ale nebola využitá k príprave izolovaných enzýmových systémov.

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

<i>Botrytis cinerea</i>	CCM F - 14
" <i>byssoides</i>	CCM F - 16
" <i>convallariae</i>	CCM F - 345
" <i>globosa</i>	CCM F - 346
" <i>fabae</i>	CCM F - 59
" <i>paeoniae</i>	CCM F - 02168

205 314	<i>Botrytis cf. narcissicola</i>	CCM F - 597
	" <i>cf. narcissicola</i>	CCM F - 598

sa jednotlivito alebo v zmesi predkultivujú na minerálnej živnej pôde obsahujúcej $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukán ako induktor enzýmu pri teplote 30 °C po dobu 24 hodín a potom preoškujú na produkčnú pôdu s celulórou, dusíkom vo forme amónnej soli s 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.

Uvedené kmene rodu *Botrytis* použité na produkciu celulózy sú uložené v čs. zbierke mikroorganizmov, Univerzita J. E. Purkyne, Brno, Obrancov míru 10.

Výhodou spôsobu produkcie celulózy podľa vynálezu je pomerne vysoká špecifická aktivita produkovaného celulózového enzýmového systému (až 0,53 U/mg) čo dosahuje špecifickú produkciu popisovanú u *Trichoderma viride* (0,4 U/mg) a možnosť využitia surových enzýmových preparátov vo vinárstve a nápojovom priemysle. Výhodou je aj príjemná vôňa získaných preparátov a ich stabilita.

Praktické využitie uvedeného postupu spočíva v tom, že celulózový systém produkovaný do kultivačného média je jednoduchou metódou izolovateľný. Z makromolekulového substrátu typu celulózy vznikajú oligosacharidy celobiózového typu. Komplexný celulózový systém je využiteľný predovšetkým v nápojovom priemysle pri lisovaní dužiny, ako aj pri ďalších procesoch sacharifikácie makromolekulárneho $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukánu.

Príklad 1

Z vypratého gélu zo sieťovanej hydroxyetylcelulózy pripravenej podľa AO č. 183 169 sa vyrežú trojuholníkové profily o strane 4 cm, vložia sa do Petriho misky a zalejú roztokom kultivačného média Yeast Nitrogen Base (0,6 g/100 ml vody) (fa Oxoid) s gélom hydroxyetylcelulózy ako jediným zdrojom uhlíka, tak, aby polovina hrúbky gélu vyčnievala nad hladinu kultivačného média. Po sterilizácii pri 100 °C sa očkuje na povrchu gélu *Botrytis fabae* CCM F-59 a kultivuje sa pri 30 °C počas 24 hodín, čím sa prevedie čiastočne vyšľachtenie. Získaná biomasa čiastočne vyšľachtenej *Botrytis fabae* CCM F-59 sa použije ako inokulum na pôdu obsahujúcu 60 g odpadu vylisovaných hroznových šupiek s 0,2 g chloridu amónneho a 0,3 g dihydrofosforečnanu draselného v 200 ml 0,5 % roztoku CM celulózy (Lovosa) vo vode (pH je upravené na hodnotu 4,5). Kultivácia sa prevádza povrchovo v 1 litrových Erlenmayerových bankách po dobu 5 dní pri 20 °C. Po ukončení kultivácie sa biomasa odstráni filtráciou spolu so zvyškom hroznových šupiek a celulóza sa získa z filtrátu (po ďalšej centrifugácii pri 5000 g po dobu 10 minút) zrážaním síranom amónnym (620 g/l, pri 20 °C). Dialyzovaný enzým (2-krát 24 hod. oproti destilovanej vode) sa lyofilizoval. Výsledná aktivita 45 U, špecifická aktivita 0,53 U/mg proteínu.

Príklad 2

Rovnako, ako v príklade 1, s tým rozdielom, že namiesto uvedeného kmeňa sa použila zmesná kultúra 8 kmeňov rodu *Botrytis* (pozri vyznaková časť PV). Použitá pôda podľa príkladu 1 bola nastavená na pH 6,5. Kultivácia prebiehala pri 40 °C po dobu 120 hodín. Výsledný surový enzýmový preparát mal aktivitu 67 U a špecifickú aktivitu 0,71 U/mg.

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

Botrytis cinerea	CCM F - 14
" byssoidea	CCM F - 16
" convallaeiae	CCM F - 345
" globosa	CCM F - 346
" fabae	CCM F - 59
" paeoniae	CCM F - 02168
" cf. narcissicola	CCM F - 597
" cf. narcissicola	CCM F - 598

sa jednotlivu alebo v zmesi predkultivujú na minerálnej živnej pôde obsahujúcej $\beta(1\rightarrow4)$ glukán ako induktor enzýmu pri teplote 30 °C po dobu 24 hodín a potom 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.