



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

206 914

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 13 08 79

(21) PV 5504-79

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/42

(40) Zverejnené 15 09 80

(45) Vydané 01 11 83

(75)

Autor vynálezu BIBLY PETER RNDr. CSc., KRÁTKÝ ZDENĚK ing. CSc. a VRŠANSKÁ MÁRIA RNDr. CSc.,
BRATISLAVA

(54) Spôsob produkcie extracelulárnej endo-1,4- β -xylanázy u kvasiniek rodu *Cryptococcus*

1

Vynález sa týka spôsobu produkcie extracelulárnej endo-1,4- β -xylanázy u kvasiniek rodu *Cryptococcus* indukovanej nemetabolizovaným syntetickým induktorom metyl- β -D-xylozidom počas rastu na glukóze, xylóze alebo sacharóze alebo počas inkubácie narastenej biomasy buniek v prostredí bez ďalšieho sacharidového zdroja uhlíka.

β -1,4-xylanázy sa pomerne hojne vyskytujú u myceliárnych húb a niektorých druhov baktérií (R. F. H. Dekker a G. N. Richards Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32, 277 (1976).

Za hlavné producenty xylan degradujúcich enzýmov sa dodnes považujú plesne a baktérie. Takáto schopnosť sa objavila u kvasiniek rodu *Cryptococcus* (P. Biely, Z. Krátký, A. Kocková-Kratochvílová, Š. Bauer) Folia Microbiol. 23, 366 (1978), ktoré sa dajú považovať za vhodnejší typ mikroorganizmu na získanie xylan degradujúcich enzýmov. *Cryptococci* produkujú β -1,4-xylázu iba počas rastu na xylane, teda enzým je indukčný a jeho tvorbu indukujú oligosacharidy xylózy, ktoré sa v živnom prostredí z xylanu tvoria.

Pri štúdiu regulácie β -xylanázy kvasiniek rodu *Cryptococcus* sa zistilo, že produkcia extracelulárnej xylanázy sa dá indukovať i počas rastu na bežných zdrojoch uhlíka ako je glukóza alebo sacharóza, ak sa ku kultúre mikroorganizmu pridá syntetický glykozid, metyl- β -D-xylopyranozid. Analógiu tohto javu popísali u kmeňa *Streptomyces* 3137 japonskí autori (K. Nakanishi, T. Yausi a T. Kobayashi, J. Ferm. Technol. 54 801 (1976) Japan Kokai 77 61,285). U kvasiniek rodu *Cryptococcus* dochádza k uplatneniu indukčného účinku metylxy-

208 914

lozidu až v stacionárnej fáze rastu, kedy poklesne hladina sacharidov použitých ako zdroj uhlíka na úroveň, ktorá nespôsobuje katabolickú represiu syntézy enzýmu. Chromatografickou analýzou produktov hydrolýzy β -1,4-xylanov ako i viskozimetrickou metódou sa dokázalo, že enzým indukovaný metyl- β -D-xylozidom je totožný s enzýmom, ktorý produkujú kvasinky počas rastu na drevnom xylane.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že produkcia enzýmu sa indukuje syntetickým induktorom metyl- β -D-xylopyranozidlom počas rastu na bežných zdrojoch uhlíka, výhodne glukóze, xylóze a sacharóze alebo počas inkubácie buniek vyrastených na ľubovoľnom zdroji uhlíka.

Metylxylozid simuluje v bunkách indukčný účinok oligosacharidov xylózy, ktoré majú funkciu prírodných induktorov β -xylanázy počas rastu na xylane, z ktorého sa uvoľňujú, prenikajú do bunky a dávajú signál pre zahájenie produkcie xylnázy. Bez prídania metylxylozidu bunky kultivované na glukóze, xylóze alebo sacharóze produkujú zhruba o dva rady menej β -xylnázy ako na xyláne ak vztiahneme jej množstvo na výhovú jednotku narastenej biomasy.

Výhoda navrhovaného spôsobu produkcie β -xylnázy u kvasiniek rodu *Cryptococcus* je, že:

- umožňuje produkciu enzýmu na báze dostupných zdrojov uhlíka, nevyžaduje teda izoláciu xylanu, resp. hemicelulóz,
- príprava použitého induktora je nenáročná a rýchla (varenie xylózy v metanole za katalytického účinku kyselín a nasledovná kryštalizácia β -anoméru xylopyranozidu),
- biomasa kvasiniek sa dá na produkciu extracelulárnej xylnázy použiť opakovane, pokiaľ sa zabráni infekcii cudzími mikroorganizmami.

Príklad 1

Kmeň *Cryptococcus Paurentii* CCY 17-3-2 (čs. zbierka mikroorganizmov, Chemický ústav SAV) sa zaočkuje do tekutej pôdy obsahujúcej 1 % glukózy, 0,2 % kvasničného autolýzátu, 0,1 % dihydrofosforečnanu draselného, 0,2 % síranu amónneho a 0,1 až 0,5 % metyl- β -D-xylozidu a kultivuje sa pri 27 °C za aerácie po dobu 4 až 5 dní. Po odstránení narastenej biomasy sa získa tekutina, ktorá obsahuje v 1 ml 0,2 až 0,4 jednotiek β -xylnázy. Za jednotku aktivity je považované také množstvo enzýmu, ktoré v 0,05 acetátovom pufrí, pH 5,4, pri 30 °C uvoľní v 0,5 ml inkuvačnej zmesi obsahujúcej 1 mg xylanu redukujúce sacharidy rovné 1 umólu ekvivalentov xylózy.

Príklad 2

Kmeň *Cryptococcus albidus* CCY 17-4-1 (čs. zbierka mikroorganizmov, Chemický ústav SAV) sa pestuje v živnej pôde obsahujúcej 0,67 % kvasničnej dusíkatej bázy (Difco), 0,2 % asparagánu, 0,5 % dihydrofosforečnanu draselného, 1 % xylózy a 0,1 až 0,5 % metyl- β -D-xylozidu. Po 4-5 dňovej kultivácii sa biomasa kvasiniek odstredí a získa sa tekutina obsahujúca v 1 ml 0,8 až 1,7 jednotiek β -xylnázy, čo je v optimálnom prípade až o 50 % vyššia hladina enzýmu vyprodukovaná počas rastu buniek v pôde s 1 % xylanom.

Biomasa kvasiniek získaná centrifugáciou 4 až 5 dňovej kultúry kmeňa *Cryptococcus albidus* CCY 17-4-1 (čs. zbierka mikroorganizmov, Chemický ústav SAV) v 1 litri média s ľubovoľným zdrojom uhlíka (napr. glukóza, xylóza, sacharóza) v neprítomnosti metylxylozidu sa suspenduje v 200 ml média bez sacharidového zdroja uhlíka obsahujúce 0,5 % kvasničného autolyzátu, 0,1 % dihydrofosforečnanu draselného, 0,2 % síranu amónneho a 0,1 až 0,5 % metyl- β -D-xylozidu. Suspenzia sa inkubuje za trepania pri 27 °C 10 až 24 hodín, kým bunky nasekretujú do prostredia 0,3 až 0,6 jednotky β -xylanázy na 1 ml. Biomasa získaná centrifugáciou naprodukuje počas opakovanej inkubácie v médiu s metylxylozidom zhruba rovnaké množstvo extracelulárnej β -xylanázy.

Význam extracelulárnych endo-1,4- β -xylanáz v poslednom období rastie spolu s celulázami so záujmom o využitie drevených odpadov ako zdrojov sacharidov na prípravu mikrobiálnych bielkovín. Xylanázy spolu s xylozidázami predstavujú prostriedok na získanie xylózy z rastlinných hemicelulóz za miernych podmienok enzýmovej hydrolýzy. V tejto súvislosti sa uvažuje o použití imobilizovaných enzýmov v systéme, v ktorom by sa kontinuálne vyrábala xylóza. Táto pentóza predstavuje nielen výhodný zdroj uhlíka pre rast celého radu priemyselne zaujímavých kvasiniek ako producentov bielkovín, ale i východiskovú surovinu pre prípravu xylitolu, ktorý sa dá využiť ako vhodné diabetické sladidlo.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob produkcie extracelulárnej endo-1,4- β -xylanázy u kvasiniek rodu *Cryptococcus*, vyznačujúci sa tým, že produkcia enzýmu sa indukuje syntetickým induktorom metyl- β -D-xylopyranozidom počas rastu na bežných zdrojoch uhlíka, výhodne glukóze, xylóze a sacharóze, alebo počas inkubácie buniek vyrastených na ľubovoľnom zdroji uhlíka.