



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

204129
(11) (B1)

(22) Prihlášené 10 01 77
(21) (PV 130-77)

(40) Zverejnené 31 07 80

(45) Vydané 15 12 83

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/42

(75)

Autor vynálezu

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. DRSc., BRATISLAVA,
ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA a KUNIAK EUDOVÍT ing. CSc.,
BRATISLAVA

(54) Spôsob produkcie celulólytických enzýmov

1

Vynález sa týka spôsobu produkcie celulólytických enzýmov štepiacich celulóзовú zložku lignín—celulóзовých komplexov kvasinkovitými organizmami rodu *Basidiotrichosporon*.

Schopnosť štepenia celulózy v prečistenom stave alebo v natívnom stave, vo forme lignín—celulóзовého komplexu β (1 $\rightarrow$ 4) glukán glukánohydrolázy EC. 3. 2. 1. 4, resp. schopnosť produkovať tento enzým nie je vlastnosťou rodu *Basidiotrichosporon* ako celku. Pri použití gélovej metódy testovania mikroorganizmov na celulóзовú aktivitu (AO č. 183 169) sa zistila výrazná produkcia β -glukán glukánohydrolázy u kmeňov zastupujúcich dva druhy rodu *Basidiotrichosporon*, a to *B. pullulans* a *B. cellulolyticum*.

Žiadny z uvedených druhov nie je uvedený v literatúre ako producent enzýmov štepiacich celulóзовú zložku lignín—celulóзовého komplexu.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že nasledovných 10 kmeňov rodu *Basidiotrichosporon*:

Basidiotrichosporon pullulans:

CCY 30-1-1 a
CCY 30-1-1 b

2

CCY 30-1-2
CCY 30-1-3

Basidiotrichosporon cellulolyticum:

CCY 30-5-1
CCY 30-5-3
CCY 30-5-4
CCY 30-13-1
CCY 30-5-11
CCY 30-5-12

jednotlivo alebo ich zmesi kultiváciou na živnej pôde minerálneho zloženia obsahujúcej síran amónny, gel hydroxyetylcelulózy a β (1 $\rightarrow$ 4) glukán ako induktor enzýmu pri teplote 20 až 40 °C, po dobu 48 až 110 hodín pri pH 4,5 až 6,8 produkuje komplexný celulóзовý systém β -glukán glukánohydrolázy a β -glukozidázy, ktorý sa získa v surovej stave odparením rastovej pôdy, prípadne v čiastočne prečistenom stave zrážaním síranom amónnym, prípadne zrážaním organickým rozpúšťadlom s výhodou etanolom.

Všetky tieto kmene produkujú ureázu a ich biomasa dáva s pufrovým roztokom diazofarbiva Fast Blue B červené zafarbenie, čo svedčí, že tieto kmene patria do oddelenia *Basidiomycetes*. Okrem typových kultúr

[CCY 30-1-1, a, b, Btr. pullulans CCY 30-13-1 Btr. inkin] boli všetky kmene izolované z odpadových vôd drevospracujúceho a papierenského priemyslu. Kmene CCY 30-1-2 a CCY 30-1-3, CCY 30-5-11 a CCY 30-5-12 boli izolované najnovšie v ČSSR.

Obidva druhy sa vzájomne odlišujú tým, že Btr. pullulans nevyužíva laktózu, trehalózu, ribózu ani xylózu, zatiaľ čo kmene Btr. cellulolyticum áno. Obidva druhy sa líšia produkciou xylanáz: Btr. pullulans xylanázy neprodukuje, zatiaľ čo Btr. cellulolyticum áno. Kmene druhu Btr. pullulans tvoria bohaté artrospóry, kmene Btr. cellulolyticum len sporadicky.

Btr. cellulolyticum sa od Btr. cutaneum [CCY 30-5-10- typová kultúra a CCY 30-7-1 Btr. jirovecii — typová kultúra] líši asimiláciou galaktózy, sacharózy, xylózy, štruktúrou polysacharidu, a prítomnosťou xylanázy a celulázy. Btr. cellulolyticum sa líši aj od iného susedného druhu Btr. inositolophilum [CCY 30-5-5, -6 a -7], ktorého kmene sú schopné asimilovať inozitol.

Použitie kmene rodu Basidiotrichosporon sú uložené v Československej zbierke kvasiniek a kvasinkovitých organizmov, Bratislava.

Praktické využitie uvedených kmeňov spočíva v tom, že produkujú do kultivačného média enzýmy β -glukán glukánohydrolázu a β -glukozidázu, ktoré sú jednoduchou metódou izolovateľné, pričom vznikajú z makromolekulárneho substrátu typu $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukánu oligosacharidy typu celobiózy, celotriózy, celotetraózy a D-glukóza. Enzýmy uvedeného typu sú využiteľné v procese sacharifikácie celulózy a v základnom výskume. Ďalšia možnosť využitia tejto vlastnosti uvedených kmeňov rodu Basidiotrichosporon je v hydrolytickom rozklade dreveného odpadu za vzniku enzýmatického hydrolyzátu priamo utillizovaného nahromadením nutrične hodnotnej bielkoviny kvasinkovitých Basidiotrichosporon využiteľných v krmovinárstve. Kvasinková forma Basidiotrichosporon umožňuje použitie ako centrifugačných tak aj filtračných separačných metód k oddeleniu nakultivovanej biomasy.

Príklad 1

Z gélu zo sieťovanej hydroxyetylcelulózy [A. O. č. 183 169] sa vyrežú trojúhelníkové profily o strane 4 cm, vložia sa do Petriho misky a zalejú sa roztokom kultivačného média Yeast Nitrogen Base (Oxoid) s gélom hydroxyetylcelulózy ako jediným zdrojom uhlíka, s prísadou induktora $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukánu (1 mg/100 ml), tak aby pol hrúbky gélu vyčnievalo nad hladinu kultivačného média. Po trojnásobnej sterilizácii pri 100 °C po dobu 1 hodiny sa očkuje na povrch gélu kultúra Basidiotrichosporon pullulans CCY 30-1-2 a kultivuje sa pri 28 °C po dobu 48 hodín. Stekutený gél spolu s pomnoženou biomasou B. pullulans (0,42 g) sa použil ako inokulum na produkčnú pôdu (2 l) s 1 % kukuričného výluhu, 0,18 % hydroxyetylcelulózy, 0,2 % síranu amónneho a 0,2 % dihydrofosforečnan draselný (pH produkčnej pôdy bolo upravené na 5,9). Kultivácia prebiehala po dobu 96 hodín pri 28 °C. Po ukončení kultivácie sa biomasa odcentrifugovala (1500 g, 10 min.) a supernatant sa zahustil na odparke. Získal sa surový enzýmový preparát s celulózovou aktivitou 66 U a špecifickou aktivitou 0,78 U/mg.

Príklad 2

Rovnako, ako v príklade 1, s tým rozdielom, že namiesto Basidiotrichosporon pullulans sa použil kmeň Basidiotrichosporon cellulolyticum CCY 40-5-4. Výsledný surový enzýmový preparát mal aktivitu 94 U a špecifickú aktivitu 0,71 U/mg.

Príklad 3

Rovnako, ako uvedené v príklade 2, s tým rozdielom, že namiesto kukuričného výluhu a hydroxyetylcelulózy sa ako zdroj uhlíka v kultivačnej pôde použije odpadná vata z hydroxyetylcelulózy (50 g/l).

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob produkcie celulolytických enzýmov vyznačujúci sa tým, že 10 nasledovných kmeňov rodu *Basidiotrichosporon*:

CCY 30-5-11

CCY 30-5-12

Basidiotrichosporon pullulans:

CCY 30-1-1 a

CCY 30-1-1 b

CCY 30-1-2

CCY 30-1-3

Basidiotrichosporon cellulolyticum:

CCY 30-5-1

CCY 30-5-3

CCY 30-5-4

CCY 30-13-1

jednotlivo alebo v zmesi sa kultivuje na živnej pôde minerálneho zloženia obsahujúcej síran amónny, gél hydroxyetylcelulózy a $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukán ako induktor enzýmu pri teplote 20 až 40 °C, po dobu 48 až 110 hodín pri pH 4,5 až 6,8 a vyprodukovaný komplexný celulóзовý systém β -glukán glukánohydrolázy a β -glukozidázy sa získa v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne v čiastočne prečistenom stave zrážaním síranom amónnym prípadne zrážaním organickým rozpúšťadlom s výhodou etanolom.