



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

265 466

(11) (B1)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/16

(22) Přihlášeno 27 05 86

(21) PV 3803-86.D

(40) Zveřejněno 10 02 89

(45) Vydáno 15 12 89

(75)
Autor vynálezu

NOVÁK JAN ing. CSc., RAKOVNÍK, DEMNEROVÁ KATEŘINA doc. ing. CSc.,
KRÁLOVÁ BLANKA ing. CSc., PRAHA, PROCHÁZKA KAREL, RAKOVNÍK,
TOLMAN JIŘÍ, KŘIVOKLÁT, SOUČEK JIŘÍ ing. CSc.,
VODRÁŽKA ZDENĚK prof. ing. Dr. DrSc., PRAHA, RYŠAVÁ DANA ing.,
JINDŘICHŮV HRADEC

(54) Kmen mikroorganismu *Candida lipolytica* syn.
Yarwinia lipolytica DBM 358

(57) Kmen mikroorganismu *Candida lipolytica*
syn. *Yarwinia lipolytica* DBM 358 produkující
multienzymový systém s obsahem oxidoreduktas
a lipas.

Vynález se týká nového mutantního kmene kvasinek druhu *Candida lipolytica* syn. *Yarrowia lipolytica*, vhodného pro produkci multienzymového systému přednostně odbourávajícího uhlovodíky s delším uhlíkatým řetězcem C_5 až C_{35} a lipidy.

Rada mikroorganismů, bakterií, kvasinek a plísň syntetizují enzymy, odbourávající delší uhlíkaté řetězce, při kultivaci na médiu s vhodným induktorem této enzymové aktivity, tzn. vhodným uhlovodíkem. Nejsnáze asimilovatelnými uhlovodíky jsou alkány s lineárním řetězcem C_{10} až C_{18} . Odbourávání je uskutečňováno systémem oxidoreduktas, které převádějí uhlovodíky na alkoholy, aldehydy a karboxylové kyseliny.

Lipolytická aktivita byla popsána u některých bakterií (rod *Pseudomonas*), kvasinek (*Lipomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*) a plísň (*Oospora*). Při enzymovém rozkladu tuků vznikají mastné kyseliny a alkoholy.

Kvasinky *Candida lipolytica* syn. *Yarrowia lipolytica* produkují na živném médiu, v kterém jsou zdrojem uhlíku alkány a ztužený tuk, multienzymový komplex s oběma typy enzymů. Aktivita tohoto multienzymového komplexu je u rodičovského kmene nízká a optimální podmínky pro jejich působení jsou 30°C a pH 6. Růst kmene na médiu s alkány a ztuženým tukem jako jediným zdrojem uhlíku a energie je pomalý a maximální produkce enzymu je dosaženo po 4 až 5 dnech kultivace. Například pro potřebu pracích prostředků je nutný enzymový systém pracující při vyšších pH a teplotě.

Tyto nedostatky rodičovského kmene odstraňuje kmen *Candida lipolytica* podle vynálezu, který je uložen ve sbírce kvasinek na katedře biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha, pod číslem DBM 358. Kmen DBM 358 má zachované morfologické vlastnosti rodičovského kmene, avšak produkuje ve zvýšené míře multienzymový komplex vhodný pro odbourávání uhlovodíků s delším uhlíkatým řetězcem a lipidů. Optimální podmínky působení tohoto komplexu jsou při teplotě 50 až 60°C a pH 8 až 11. Vykazuje vyšší aktivitu oxidoreduktas i lipas o 80 až 90 % resp. 80 až 90 % oproti rodičovskému kmenu. Dále produkuje tento mutantní kmen oxidasový komplex, který obsahuje nejméně z 50 % alkan hydroxylasovou aktivitu nezávislou na NADH.

Pro produkci tohoto enzymového komplexu potřebuje kmen DBM 358 prostředí obsahující N-alkany, ztužený tuk $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4 , kvasničný extrakt.

Kmen *Candida Lipolytica* DBM 358 byl získán opakovaným působením UV záření a N'-methyl-N-nitrosomočoviny na kmen *Candida lipolytica* a opakovanou selekcí získaných mutantů.

Nakultivované buňky rodičovského kmene asepticky odstředěné, dvakrát promyté sterilním fosfátovým tlumivým roztokem pH 7, byly resuspendované a naředěné stejným tlumivým roztokem tak, aby výsledná koncentrace buněk byla 10^6 b/ml. 5 ml této suspenze bylo ozářeno UV světlem po dobu 20, 30, 60, 120 a 180 s, což odpovídá dávkám záření 36, 54, 108, 216 a 324 J/m^2 . Ozářené suspenze byly naředěny a rozetřeny na agarové plotny s kompletním médiem v množství 0,1 ml. Po třídní inkubaci při 30°C byla provedena izolace kmenů a jejich selekce na agarových plotnách s n-alkany a lipidy. Vybraný nejaktivnější kmen (dávka 108 J/m^2) byl opakovaně podroben účinkům UV záření. Kmen UV 60/2 izolovaný z dávky 216 J/m^2 byl vystaven mutagennímu zásahu N'-methyl-N-nitrosomočoviny. K suspenzi buněk, získaných obdobným způsobem jako při aplikaci UV záření o koncentraci 1×10^8 b/ml, bylo přidáno 8 mg N'-methyl-N-nitrosomočoviny na 10 ml suspenze buněk. Po 60minutové inkubaci při 28°C na reciproké třepačce byly buňky odstředěny, promyty a přidány k 8 ml minerálního média s n-alkany. Po třídní kultivaci byla horní alkanová vrstva s buňkami využita jako inokulum pro další inkubaci. Tento postup byl zopakován 3krát. Po skončení kultivace byly buňky asepticky odstředěny, promyty a převedeny na bramborový agar. Kolonie, které narostly po dvou až třídní kultivaci byly izolovány. Z takto ošetřených buněk byl izolován kmen DBM 358.

Kmen DBM 358 má zachované morfologické vlastnosti rodičovského kmene. Tvoří oválné buňky o rozměrech (3 až 5) x (5 až 11) μ . Je charakteristický tvorbou pseudomycelia. Rozmnožuje

se multilaterálním pučením. Nárůst na agarové půdě je krémově zbarvený s viditelně zvrásněným povrchem. Kmen nemá kvasné schopnosti, asimiluje glukosu, ethanol, glycerol, erythritol, kyselinu citronovou a DL-mléčnou. Slabě asimiluje L-sorbosu a D-manitol. Neasimiluje K_2NO_3 . Na rozdíl od rodičovského kmene produkuje ve zvýšené míře multienzymový komplex vhodný pro odbourávání uhlovodíků s delším uhlíkatým řetězcem a lipidů.

P ř í k l a d

Kmen *Candida lipolytica* DBM 358 se kultivuje 24 hodin na tekutém médiu s obsahem glukosy 1 % hmot., kvasničného outolysatu 0,5 % hmot., peptonu 0,3 % hmot., hydrolyzátu kaseinu 0,5 % hmot. při teplotě 28 °C za třepání a poté se 5 až 10 % hmot. takto připraveného inokula převede do média obsahujícího 0,5 až 2,5 % hmot. alkánů 0,5 až 3 % hmot. ztuženého tuku, 0,1 až 0,2 % hmot. $(NH_4)_2HPO_4$, 0,25 až 0,35 % hmot. $(NH_4)_2SO_4$, 0,01 až 0,03 % hmot. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 až 0,1 % hmot. K_2SO_4 , 0,01 až 0,02 % hmot. kvasničného extraktu. Kultivace probíhá 48 až 96 hodin při teplotě 25 až 37 °C. Po ukončení kultivace se biomasa kvasinek separuje odstředěním a promyje se několikrát destilovanou vodou. Takto připravené buňky vykazovaly následující aktivity: lipolytická aktivita dosahovala hodnot od 10 do 50 U/mg bílkovin, oxidoreduktasová aktivita od 1 do 3,5 nkat/mg bílkoviny v závislosti na zdroji uhlíku v kultivačním médiu.

Ve srovnání s tím, rodičovský kmen za stejných podmínek kultivace vykazoval lipolytickou aktivitu od 2 do 30 U/mg bílkovin, oxidoreduktasová aktivita od 0,1 do 2 nkat/mg bílkovin.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Kmen mikroorganismu *Candida lipolytica* syn. *Yarwinia lipolytica* DBM 358, produkující multienzymový systém s obsahem oxidoreduktas a lipas.