



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

226613

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/14

(22) Prihlášené 14 01 81
(21) (PV 266-81)

(40) Zverejnené 26 08 83.

(45) Vydané 15 02 86

(75)
Autor vynálezu

FARKAŠ VLADIMÍR ing. CSc., BAUER ŠTEFAN dr. ing. DrSc., BRATISLAVA,
LABUDOVÁ IVICA ing., KOŠICE, FERENCZY LAJOŠ dr., SZEGED

(54) Kmeň mikroorganizmu *Trichoderma reesei* M 6 CCF 1856

Vynález sa týka nového mikroorganizmu *Trichoderma reesei* M 6 CCF 1856, ktorý produkuje vo zvýšenom výťažku extracelulárny celulólytický enzýmový komplex.

Imperfektná mikroskopická huba *Trichoderma reesei* produkuje pri povrchovej a submerznej kultivácii na vhodnom lignocelulóзовom substráte celulóзовý enzýmový komplex schopný hydrolyzovať natívnú celulózu, to znamená zmes polysacharidov typu celulózu a hemicelulózu na mono- a oligosacharidy. Nakoľko kmene nachádzajúce sa v prírode produkujú len veľmi nízke hladiny celulózu, prišlo sa v niektorých laboratóriách vo svete k mutagenéze prírodných kmeňov za účelom zvýšenia ich schopnosti produkovať celulózu /Mandels M., Weber J., Parizek R.: Appl. Microbiol. 21, 1 952 (1971); Montenecourt B. S., Eveleigh D. E.: Appl. Environ. Microbiol. 34, 777 (1977); Morozova E. S.: proc. Symp. Enzym. Hydrol. Cellulose (Bailey M., Enari T. M., Linke M., eds.) Aulanko, Finland, (1975)/ Takto sa z prírodného kmeňa *Trichoderma viride* QM 6a podarilo pripraviť kmeň QM 9414, pomenovaný *Trichoderma reesei*, ktorý vykazoval v priemere štvornásobne vyššiu produkciu celulólytických enzýmov ako materský kmeň. Pri submerznej kultivácii kmeňa QM 9414 na mikrokryštalickej celulóze sa dosahuje výťažok okolo 1-2 FP-jednotiek aktivity na 1 ml média (Mandels M., Andreotti R., Roche C.: Biotechnol. Bioeng. Symp. 6, 21 /1976/).

Približne dvojnásobnú produkciu pri rovnakých podmienkach vykazuje kmeň *Trichoderma reesei* M 6 CCF 1856, ktorý je predmetom tohto vynálezu. Mikroorganizmus je uložený v zbierke Katedry botaniky Univerzity Karlovy, Praha 2, Benátská 2.

Kmeň sa získal ožarovaním konídí kmeňa *Trichoderma viride* QM 9414 získaného z American Culture Collection of fungi (QM) University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts USA, UV-svetlom počas 5 minút. Hlavnou výhodou nového kmeňa je zvýšená produkcia celulózu,

ktorá dosahuje pri submernej kultivácii na 1 % mikrokryštalickej celulóze hodnoty okolo 4 FP-jednotiek aktivity na 1 ml.

Morfológia: vláknité, často vetvené, nepravidelne septované mycélium. Priemer hýf 1,8 až 3,0 μm . Konídionosiče dlhé, niektoré nepravidelné, kratšie a rozvetvené, fialidy zvyčajne jednotlivé, striedavé, alebo protistojace. Konídiá hojné, zeleno až zelenohnedo pigmentované, elipticko-ovoidné, priemer 2,3 x 3,0 μm , alebo niekedy elipsoidné, priemer 2,5 až 3,0 x 3,8 až 4,5 μm . Pri submerznej kultivácii občasné chlamydospóry, sférické, priemer do 8,0 μm . Konídiácia indukovateľná svetlom. V bohatej pôde produkuje žltý, vo vode rozpustný pigment. Mikroorganizmus rastie na: D-glukóze, D-galaktóze, D-manóze, laktóze, melibióze, D-fruktóze, D-xylóze, L-arabinóze, D-arabinóze, D-ribóze, celobióze, eskulíne, trehalóze, škrobe, laminaríne, etanole, glycerole, D-erytritole, D-ribitole, D-manitole, D-sorbitole, dulcitol, m-inozitole, acetáte, sukcináte, fumaráte, maláte, citráte, glukuronáte, celulóze, slabo rastie na: maltóze, rafinóze, L-sorbóze, arbutine, salicíne, inulíne, laktáte, tartráte a malonáte, nerastie na: sacharóze, alfa-metyl-D-glukozide, melezitóze, L-ramnóze.

P r í k l a d

Kmeň *Trichoderma reesei* M 6 sa kultivuje vo fermentore v médiu nasledovného zloženia (v gramoch na liter): močovina 0,3; síran amónny 1,4; dihydrogénfosforečnan draselný 2,0; heptahydrát síranu horečnatého 0,3; chlorid vápenatý 0,3; kvasničný extrakt 0,1; mikrokryštalická celulóza 10,0; Tween 80 2,0; peptón 1,0; síran železnatý $5 \cdot 10^{-6}$; hydrát síranu manganatého $1,4 \cdot 10^{-6}$; chlorid zinečnatý $1,7 \cdot 10^{-6}$; chlorid kobaltnatý $2 \cdot 10^{-6}$.

Teplota kultivácie je 28 °C, prevzdušňovanie 0,15 až 0,30 v/v/min, rýchlosť otáčok miešadla 300 až 500 ot./min v závislosti na konštrukciu fermentora. Ako inokulum sa použije baničková kultúra v logaritmickej fáze rastu vypestovaná submerzne z konídií v rovnakom médiu, aké je použité vo fermentorovej kultivácii. Objem inokula je 10 % z objemu fermentačnej zmesi. Kultivácia prebieha počas 5 až 7 dní, pričom pH kultúry sa udržiava v hraniciach 4 až 4,5. V priebehu kultivácie sa sleduje aktivita celuláz v živnom médiu metódou podľa (Mandels M., Andreotti R., Roche C.: Biotechnol. Bioeng. Symp. 6, 21 /1976/). Keď celulóza aktivita dosiahne maximálnej hodnoty, okolo 4 FP j/ml, médium sa scentrifuguje a číry supernatant sa použije ako zdroj celulolytických enzýmov.

Celulolytické enzýmy sa dajú využiť pri sacharifikácii celulózy a lignocelulózových substrátov, pri zvyšovaní kvality siláže, pri zlepšení extrakcie látok z rastlinných surovín napr. v potravinárstve, farmácii, pivovarníctve a vinárstve, a všade tam, kde je potrebné rozložiť celulóзовý podiel obsiahnutý v rastlinnom materiáli. Celulázy sa ďalej dajú využiť napr. v priemysle papiera a celulózy na výroby materiálov s modifikovanými vlastnosťami a mechanickými vlastnosťami.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Kmeň mikroorganizmu *Trichoderma reesei* M 6 CCF 1856 produkujúci celulóзовý enzýmový komplex.