



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

230890
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/42

(22) Prihlášené 10 01 83
(21) (PV 151-83)

(40) Zverejnené 13 01 84

(45) Vydané 15 11 83

(75)

Autor vynálezu

ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE, MARVANOVÁ LUDMILA RNDr. CSc.,
BRNO, KUNIAK LUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA

**(54) Spôsob produkcie enzýmu β -glukozidázy pomocou mikroskopických
húb rodu Blastobotrys**

1

2

Spôsob produkcie β -glukozidázy pomocou mikroskopických húb rodu Blastobotrys.

Vynález sa týka oboru mikrobiológie, chémie a biochémie sacharidov.

Účelom vynálezu je popis produkcie enzýmu β -glukozidázy, a to ako jedného zástupcu celulolytického komplexu, resp. v zmesi s β -1,4-glukán glukánhydrolázou (celulóza C_x) a celobiohydrolázou (celulóza C₁).

Uvedeného účelu sa dosiahne pomocou mikroskopických húb rodu Blastobotrys, a to Blastobotrys proliferans, Blastobotrys aristata a Blastobotris nivea jednotlivo alebo v ich zmesi na vhodných živných pôdach.

β -glukohydrolázu možno získať o pomerne vysokej špecifickej aktivite až 8 nkat/mg, a to aj za pomoci natívneho analóga celulózy polysacharidu tamarind ako poľnohospodárskeho odpadu (Kuba, Karibská oblasť).

Vynález má široké využitie v mikrobiológii, chémii a biochémii sacharidov, ale aj v analytickej chémii a všade tam, kde ide o jednoduchú metódu spracovania dreveného a poľnohospodárskeho odpadu.

Vynález sa týka spôsobu produkcie enzýmu β -glukozid glukohydrolázy (β -glukozidáza, EC 3.2.1.21) pomocou mikroskopických húb rodu *Blastobotrys* kultivovaných na vhodných živných pôdach.

Pre priemyselnú produkciu β -glukozidázy sa najčastejšie používajú nasledovné mikroorganizmy: *Aspergillus oryzae*, *Merulius lachrymans* (G. de Stevens v *Methods in Enzymology*, 1. diel, S. P. Colowick a N. O. Kaplan, Acad. Press. New York 1955, str. 173 až 178). Sú však aj iné mikroorganizmy, o ktorých nebolo doposiaľ známe, že majú schopnosť produkovať enzým β -glukozidázu. Pomocou gélovej metódy (A. O. č. 183 169) sme zistili výraznú produkciu β -glukozidázy u 3 popísaných druhov rodu *Blastobotrys*, a to *Blastobotrys aristata*, *Blastobotrys proliferans* a *Blastobotrys nivea*.

Druh *Blastobotrys proliferans* je novopopísaný druh rodu *Blastobotrys* izolovaný z para orechov (*Bertholletia excelsa*) z poškodeného jadra, druh *Blastobotrys aristata* bol izolovaný zo vzorky plesnivej omietky, dodanej pracovníkmi pamiatkovej starostlivosti z hradu Bítov [oba nové druhy popisuje Marvanová L.: Two new *Blastobotrys* species. *Transactions of the British Mycological Society* **66**, 217 (1976)]. Druh *Blastobotrys nivea* izolovaný z kompostu popísal von Klopotek A.: *Blastobotrys nivea* gen. nov., sp. nov., *Archiv für Mikrobiologie* **58**, 92 (1967). Rod *Blastobotrys* klopotek patrí do čeľade Moniliaceae, rodu Moniliales, triedy Denteromycetes. O produkcii hydroláz polysacharidov uvedenými druhmi rodu *Blastobotrys* nie je v literatúre nič známe.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že kultiváciou nasledovných troch kmeňov rodu *Blastobotrys*:

<i>Blastobotrys proliferans</i>	CCMF — 493
<i>Blastobotrys aristata</i>	CCMF — 410
<i>Blastobotrys nivea</i>	CCMF — 433

jednotlivo alebo ich zmesí na živnej pôde obsahujúcej celobiózu, celulózu alebo jej hydroxyetyl, hydroxypropyl, karboxymetyl deriváty alebo natívny derivát celulózy polysacharid tamarind pri teplote 25 až 37 °C a hodnote pH 4,8 po dobu 72 až 120 hodín produkuje enzým β -glukozidázu, ktorý sa získava v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne v čiastočne zušľachtenom stave zrážaním síranom amónnym alebo organickými rozpúšťadlami, s výhodou etanolu a acetónu.

K ďalšej purifikácii surového enzýmu β -glukozidázy po dialýze možno použiť napríklad adsorpciu β -glukozidázy zo zmesi bielkovín na metahydroxyd hlinitý a nasledovné uvoľnenie enzýmu pomocou Na_2CO_3 tak, ako uvádza G. de Stevens v hore uvedenej citácii. Výhodou uvedeného postupu je predovšetkým to, že príprava β -glukozidázy je veľmi jednoduchá a ako súčasť kultivačnej pôdy možno použiť aj neprečistené natívne

substráty ľahko dostupné ako rôzne druhy poľnohospodarskeho odpadu. V prípade, že surový enzýmový preparát má obsahovať celý komplex celulolytických enzýmov, výhodné sú kombinácie za účasti *Blastobotrys proliferans*, nakoľko uvedený kmeň produkuje popri β -glukozidázovej aktivite aj celulózy C^* a C_1 (β -1,4-glukán glukánohydroláza EC 3.2.1.4 a celobiohydroláza EC 3.2.1.-).

Ďalšou výhodou je vysoký výťažok β -glukozidázovej aktivity. Na druhej strane, pokiaľ je požiadavka na čistú β -glukozidázovú enzýmovú aktivitu bez sprievodných celulolytických enzýmov, možno uvedený preparát získať jednoducho a bez sprievodných celulolytických enzýmov, navrhovaným novým postupom pomocou kmeňov *Blastobotrys aristata* a *Blastobotrys nivea* jednotlivo alebo v ich zmesi. Nakoľko uvedené kmene rodu *Blastobotrys* produkujú popri β -glukozidázovej aktivite aj enzýmy schopné odštiepovať xylózu, nový enzýmový preparát získaný zahustením kultivačnej pôdy po kultivácii uvedených zástupcov rodu *Blastobotrys* možno použiť aj k sacharifikácii polysacharidu tamarind (*Tamarindus indica*).

Príklad 1

Blastobotrys proliferans CCMF-493, *Blastobotrys nivea* CCMF-433 a *Blastobotrys aristata* CCMF-410 sa pomnožia na rastovej pôde obsahujúcej 2 g gélu (prípraveného sieťovaním hydroxyetylcelulózy podľa A. O. číslo 183 169) ponoreného do polovice výšky v 20 mililitroch Yaest Nitrogen Base rastovej pôdy (0,6 g/100 ml) o pH 4,8 a kultivuje sa na povrchu po dobu 3 dní pri teplote 30 °C, kedy dochádza k steknutiu gélu. Nahromadená biomasa druhov *Blastobotrys* sa použije ako zmesné inokulum pôdy obsahujúcej 20 g kukuričného výluhu, 5 g karboxymetylcelulózy (pH 4,8) na 1 l vody a kultivácia prebieha po dobu ďalších 2 dní. Potom sa biomasa *Blastobotrys* odfiltruje a surový enzým β -glukozidáza sa získa odparením kultivačnej pôdy na vakuovej odparke (celková aktivita 33 U, t. j. 0,55 μkat ., špecifická aktivita 12 nkat/mg proteínu).

Príklad 2

Ako inokulum sa použije kmeň *Blastobotrys aristata* CCMF-410 a *Blastobotrys nivea* CCMF-433, ktoré sa pomnožia na pôde obsahujúcej 2 g síranu amónneho, 1 g KH_2PO_4 a 5 g celobiózy na 1 l (pH 4,8). Po 120 hodinách kultivácie (25 °C) sa biomasa odfiltruje a zvyšná kultivačná pôda sa prezráža etanolom (2 objem. diely etanolu na 1 objem. diel kultivačnej pôdy).

V sedimente vypadne β -glukozidáza 0,6 μkat o špecifickej aktivite 2,0 nkat/mg, pričom tento preparát neobsahuje celulolytickú aktivitu (β -1,4-glukán glukánohydroláza a celobiohydroláza).

Príklad 3

Tak ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto hydroxyetyl- a karboxymetylcelulózy sa použije polysacharid tamarind a ako inokulum čistá kultúra *Blastobotrys proliferans* CCMF-493. Kultivácia prebieha pri teplote 37 °C po dobu 3 dní. Surový zahustený enzýmový preparát β -glu-

Vynález má použitie v základnom mikro-

kozidázy obsahuje 0,48 μ kat a špecifická aktivita 8 μ kat/mg obsahuje 0,25 μ kat β -1,4-glukán glukánhydrolázovej aktivity a 3 nkat celobiohydrolázovej aktivity.

Vynález má použitie v základnom mikrobiologickom biochemickom výskume a pri produkcii β -glukozidázy ako jedného z dôležitých enzýmov pri sacharifikácii polysacharidov rôznych drevných a poľnohospodarských odpadov.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob produkcie enzýmu β -glukozidázy pomocou mikroskopických húb rodu *Blastobotrys*, vyznačený tým, že sa kultivujú nasledovné kmeňe rodu *Blastobotrys*:

<i>Blastobotrys proliferans</i>	CCMF — 493
<i>Blastobotrys aristata</i>	CCMF — 410
<i>Blastobotrys nivea</i>	CCMF — 433

jednotlivo, alebo ich zmesi na živnej pôde

obsahujúcej celobiózu, celulózu alebo jej hydroxyetyl, hydroxypropyl, karboxymetyl deriváty, alebo natívny derivát celulózy polysacharid tamarind pri teplote 25 až 37 °C, a hodnote pH 4,8 po dobu 72 až 120 hodín a enzým β -glukozidázu sa získa v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne v čiastočne zušľachtilem stave zrážaním síranom amónnym alebo organickým rozpúšťadlom, s výhodou etanolom alebo acetónom.