



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 200 771

(11) (B1)

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 03 07 78

(21) PV 4379-78

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/24

(40) Zverejnené 31 01 80

(45) Vydané 30 11 82

(75)

Autor vynálezu ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA, KUNIAK ĽUDOVÍT, ing. CSc. a AUGUSTÍN JOZEF PhDr.,
BRATISLAVA

(54) Spôsob šľachtenia mikroorganizmov za účelom zvýšenej produkcie polysacharid-hydroláz

1

Vynález sa týka spôsobu šľachtenia mikroorganizmov (baktérií, kvasiniek, nižších a vyšších húb) za účelom zvýšenia produkcie enzýmov hydrolyticky štiepiacich polysacharidy.

Glykán-glykánohydrolázy sú hydrolázy schopné štiepiť polysacharidy (prípadne oligosacharidy) endo-mechanizmom vo vnútornej časti reťazcov glykánu, zatiaľ čo glykozidázy sú hydrolázy, štiepiace polysacharidy (prípadne oligosacharidy) z ich neredukujúcich koncov. Viaceré polysacharidhydrolázy, predovšetkým glykán-glykánohydrolázy, pôsobiace na polysacharidový polymér endo-mechanizmom, ako α -amyláza (α -1,4-glukán glukánohydroláza EC 3.2.1.1), celulóza (β -1,4-glukán-glukánohydroláza EC 3.2.1.4), xylanáza (β -1,4-xylán xylánohydroláza EC 3.2.1.8), lichenáza (β -1,3(4) glukán glukánohydroláza EC 3.2.1.6), pullulanáza (bakteriálny R-enzým EC 3.2.1.9) a mananáza, sú dôležité enzýmy z hľadiska priemyselného použitia (pivovarníctvo a sladovníctvo, potravinársky, krmovinársky a textilný priemysel, spracovanie polysacharidových odpadov). Preto je dôležitým problémom technickej mikrobiológie nielen výber vhodných produkčných mikroorganizmov, ale aj možnosti udržania, prípadne ďalšieho zvýšenia produkčných vlastností vybraného kmeňa pre produkciu glykán-glykánohydrolázy.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že viacnásobným pasážovaním vybraného kmeňa, produkujúceho polysacharid hydrolázovú enzýmovú aktivitu na rastových pôdach s hydrofilným gélom príslušného polysacharidu ako jediného zdroja uhlíka upraveného sietovaním s epichlórhydrínom, získa sa vyšľachtený mikroorganizmus schopný za rovnakých podmienok kultivácie produ-

kovat 1,5 až 5-krát viac polysacharid-hydrolázového enzýmu v porovnaní s nevyšľachteným mikroorganizmom.

Gél pripravený sieťovaním daného typu polysacharidu bifunkčným činidlom o vhodnom stupni sieťovania má zachované substrátové vlastnosti predovšetkým pre hydrolázy pôsobiace endo-mechanizmom, štiepiace reťazce polysacharidu z ich vnútornej časti. Substrátové vlastnosti sieťovaných polysacharidov pre hydrolázy, ktoré pôsobia exo-mechanizmom sú podstatne zhoršené voči polysacharidom modifikovaným. Tak sieťovaním makromolekulárneho polysacharidu 160 priečnymi hydroxypropánovými mostíkmi zhoršia sa substrátové vlastnosti tak modifikovaného polysacharidu voči východnému pôvodnému polysacharidu až na 0,6 %, čo predstavuje v prípade polysacharidu o mol. hmotnosti 10^6 , 76 glykozylových jednotiek pripadajúcich na jednu priečnu väzbu a substrátové vlastnosti pre hydrolázy pôsobiace exo-mechanizmom sú obmedzené maximálne na 37 glykozylových jednotiek pri neproduktujúcich koncoch reťazcov polysacharidu. Pasážovaním mikroorganizmov na géloch sieťovaného polysacharidu dochádza k pomnoženiu a tým k relatívnemu obohateniu kultúry populáciou schopnou využívať takto modifikovaný polysacharid, a to predovšetkým primárnym účinkom glykán-glykánhydroláz. Oligosacharidové produkty účinku príslušných glykán-glykánhydroláz na ich modifikované polysacharidy môžu byť ďalej využívané exo-enzýmami daného typu až na úroveň monosacharidu.

Výhodou uvedeného postupu šľachtenia je skutočnosť, že množstvo produkovanej glykán-glykánhydrolázy v jednotlivých pasážach za použitia gélov tvarovaných v štandardnom tvare povrchu a o štandardnej sušine sa indikuje dĺžkou časového intervalu potrebného k steknutiu vzorky gélu pri zachovaní štandardného inokula. Mikroorganizmy vyšľachtené uvedeným postupom si ponechávajú zvýšené produkčné vlastnosti pre daný typ glykán glykánhydrolázy po dobu niekoľkých mesiacov až jedného roku.

Príklad 1

Bacillus subtilis CCM 1718 sa pasážoval 8-krát na pôde Yeast Nitrogen Base YNB (0,6 g/100 ml) s gélom sieťovanej amylozy trojuholníkového tvaru (dĺžka strany 1,5 cm, výška gélu 0,4 cm), pri inokulom 10^5 buniek sa stekovala štandardná vzorka gélu (o suchej hmotnosti 150 mg amylozy) v priebehu prvej pasáže za 3 dni, v priebehu 4. pasáže za 15 hodín, v priebehu 8. pasáže za 10 hodín. Produkcia enzýmu α -amylázy s *Bacillus subtilis* (0,3 g biomasy) sa prevádzala na pôde obsahujúcej 30 g kukuričného výluhu a 7,5 g škrobu na 1,5 litra vody (pH 7,8). Po 20 hodinách fermentačného procesu sa biomasa *Bacillus subtilis* oddelí centrifugáciou a extracelulárna α -amyláza sa získa v surovom stave z produkčného média jeho zahustením, alebo v purifikovanom stave uplatnením afinitného postupu zachytenia α -amylázy na sieťovaný škrob (J. Zemek, Ľ. Kuniak, J. Burianek a P. Zajac: Spôsob izolácie α -amylázy, čs. patent 157 955 (1975)). Získaná aktivita α -amylázy 184 m.j./l pôdy u nepasážovaného kmeňa 813 m.j./l u kmeňa 8-krát pasážovaného cez gél pripravený zo sieťovanej amylozy.

Príklad 2

Aureobasidium pullulans CCY 27-1-36 sa pasážoval na pôde YNB (0,6 g/100 ml) s gélom

sieťovaného β -xylánu (xylán z bukového dreva). Tvar gélu a inokulum tak ako je uvedené v príklade 1. Suchá hmotnosť gélu 150 mg xylánu. Stekutenie gélu v 1. pasáži prebehlo za 3 dni, v 2. pasáži za 2 dni, v 3. pasáži za 30 hodín a v 4. pasáži do 24 hodín. Produkcia enzýmu xylanázy sa prevádzala na médiu, obsahujúcom 30 g kukuričného výluhu, 5 g neprečisteného xylánu, 2 g síranu amónneho a 2 g kyslého fosforečnanu draselného, 4 g biomasy *Aureobasidium pullulans* na 1,5 litra fermentačnej pôdy (pH 7,0). Po 4 dňovej submerznej fermentácii na reciprokej trepačke sa biomasa *Aureobasidium pullulans* oddelí centrifugáciou a filtráciou a extracelulárna xylanáza sa získa v surovom stave z produkčného média vyzrážaním síranom amónnym (700 g/liter) s následnou dialýzou a lyofilizáciou. Získaná aktivita xylanázy 27,1 m.j./l u nepasážovaného kmeňa; u kmeňa 4-krát pasážovaného 112,8 m.j./l.

Príklad 3

Tak ako je uvedené v príklade 2, s tým rozdielom, že sa *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-36 pasážuje cez gél, pripravený zo sieťovanej hydroxyetylcelulózy (ponorený v YNB pôde (0,6 g/100 ml)). 6-násobným pasážovaním sa zvýšila produkcia celulózy (C_X) o 240 %. Produkčná pôda obsahovala 5 g kvasničného autolýzátu, 20 g hydroxyetylcelulózy, 2 g síranu amónneho a 2 g kyslého fosforečnanu draselného a 4 g biomasy *Aureobasidium pullulans* na 1,5 litra vody (pH 6,5). Výťažok celulózy u nepasážovaného kmeňa 45,2 m.j./l, po 6-násobnom pasážovaní 108,5 m.j./l.

Príklad 4

Bacillus licheniformis CCM 2145 sa pasážoval 5-krát na pôde YNB (0,6 g/100 ml) s gélom sieťovaného lichenínu za podmienok opísaných v príklade 1. Štandardná vzorka gélu pripraveného zo sieťovaného lichenínu (o suchej hmotnosti lichenínu 180 mg) sa stekutí v priebehu 1. pasáže za 3 dni, v priebehu 2. pasáže za 1,5 dňa, v priebehu 3. pasáže za 1 deň, v priebehu 4. a 5. pasáže do 24 hodín. Produkcia enzýmu lichenázy sa prevádzala na pôde obsahujúcej 10 g kukuričného výluhu, 10 g žitného šrotu, 2 g síranu amónneho a 2 g kyslého fosforečnanu draselného a 0,5 g biomasy *Bacillus licheniformis* na 1 liter vody (pH 6,2). Po oddelení biomasy centrifugáciou sa extracelulárna lichenáza získa z produkčného média v surovom stave jeho zahustením. Získaná aktivita lichenázy 58,4 m.j./l u nepasážovaného kmeňa, 187,6 m.j./l u kmeňa 5-krát pasážovaného.

Vynález má použitie pri šľachtení priemyselných kmeňov mikroorganizmov produkujúcich polysacharid-hydrolázové enzýmy, nakoľko mikroorganizmy vyšľachtené podľa vynálezu sa vyznačujú niekoľkonásobne vyššou produkciou polysacharid-hydroláz za rovnakých kultivačných podmienok.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob šľachtenia mikroorganizmov na zvýšenú produkciu polysacharid hydroláz, vyznačujúci sa tým, že vybraný kmeň, produkujúci polysacharid hydrolázový enzýmovú aktivitu sa viackrát pasážuje na rastových pôdach s hydrofilným gélom odpovedajúceho sieťovaného polysacharidu ako jediného zdroja uhlíka s epichlórhydrínom.