



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

195 049

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 16 02 77
(21) PV 1452-78

(40) Zverejnené 28 04 79
(45) Vydané 01 1 82

(51) Int. CL. ³C 12 N 9/42

(75)

Autor vynálezu

ZEMEK JURAJ, ing., CSc., LEHNICA, KUNIAK ĽUDOVÍT, ing., CSc.,
AUGUSTÍN JOZEF, PhMr., BRATISLAVA a PÁČOVÁ ZDENA, Dr., BRNO

(54) Spôsob produkcie enzýmu β -glukozidázy

1

Vynález sa týka produkcie enzýmu β -glukozidázy EC 3,2.1.21) pomocou bakteriálnych kmeňov *Streptomyces* spp., kultivovaných na vhodných živných podoch.

Pre priemyslovú produkciu β -glukozidázy (β -D-glukozid glukohydroláza) sa najčastejšie používajú nasledovné mikroorganizmy : *Aspegillus oryzae*, *Merulius lachrymans* (G. de Stevens v Method in Enzymology, 1. diel, S.P. Colowick a N.O. Kaplan, Acad Press. New York 1955, str. 173-178). Sú však aj iné mikroorganizmy, o ktorých doposiaľ nebolo známe, že majú schopnosť produkovať enzým β -glukozidázu. Pomocou gélovej metódy (autorské osvedčenie č. 183 169) testovania mikroorganizmov na celulázovú aktivitu v priebehu kultivácie mikroorganizmov sa zistilo, že s 21 kmeňov rodu *Streptomyces* 7 kmeňov produkuje β -glukozidázu.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že kultiváciou nasledovných siedmich kmeňov rodu *Streptomyces* :

<i>Streptomyces aureofaciens</i>	
" "	<i>anulatus</i>
" "	<i>levandulae</i>
" "	<i>antibioticus</i>
" "	<i>rutgensensis</i>
" "	<i>griseocarneum</i>

CCM 3229
CCM 3158
CCM 3010
CCM 3159
CCM 3196
CCM 3228

Streptomyces diastatensis

CCM 3167

Jednotlivo alebo ich zmesí na živnej pôde obsahujúcej celulózu alebo jej hydroxyetyl-, karboxyetyl-, hydroxypropyl deriváty pri teplote 25 °C až 40 °C s výhodou pH 7,5 po dobu 10 až 20 hodín produkuje enzým β -glukozidázu, ktorý sa získava v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne v čiastočne zušľachtenom stave zrážaním síranom amonným alebo organickým rozpúšťadlom s výhodou etanolu a acetónu.

K ďalšej purifikácii surového enzýmu β -glukozidázy po dialýze možno použiť napr. adsorbciou β -glukozidázy zo zmesi bielkovín na alumínium metahydroxyde a následovné uvoľnenie adsorbovaného enzýmu pomocou Na_2CO_3 do roztoku, ako uvádza G. de Stevens v hore uvedenej citácii.

Príklady prevedenia

Príklad 1

Streptomyces aureofaciens CCM 3239 sa pomnoží na rastovej pôde obsahujúcej 2 g gélu (pripraveného sieťovaním hydroxyetylcelulózy podľa A.O.Š. 183 169) ponoreného do polovice výšky v 20 ml Yeast Nitrogen Base rastovej pôde (0,6 g/100 ml) a kultivuje sa povrchovo po dobu 3 dní pri teplote 25 až 40 °C, kedy dochádza k stekutiu gélu. Nahromadená biomasa *Streptomyces aureofaciens* sa použije ako inokulum pôdy obsahujúcej 20 g CORN-STEPU, 5 g hydroxyetylcelulózy (pH 6,0) na jeden liter vody po dobu 25 hodín. Po 25. hodine sa biomasa *Streptomyces faciens* odcentrifuguje pri 5.000 g po dobu 10 minút a surový enzým β -glukozidáza sa získa odparením kultivačnej pôdy na vákuovej odparke (celková aktivita 55 IU, špecifická aktivita 0,3 IU/mg proteínu).

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že k pomnoženiu sa použije *Streptomyces levandulae* a *Streptomyces rutgersensis*.

Surový enzým β -glukozidáza má celkovú aktivitu 45 IU a špecifickú aktivitu 0,35 IU/mg proteínu.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že pomnožená kultúra *Streptomyces antibioticus* sa použije ako inokulum na rastovú pôdu obsahujúcu 20 % gluténových výpalkov a 7 g vodorozpustnej karboxymetylcelulózy na 1 liter pôdy (pH 6,0) po dobu 24 hodín.

Príklad 4

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že nahromadená biomasa *Streptomyces aureofaciens* sa použije ako inokulum pôdy obsahujúcej 20 g CORN-STEPU a 1 g celulózy (pH 6,0) na 1 liter vody po dobu 15 hodín. Získa sa surový enzým β -glukozidáza o celkovej aktivite 78 IU a špecifickej aktivite 0,94 IU/mg proteínu.

Vynález má použitie pri produkcii β -glukozidázy ako jedného z dôležitých enzýmov pri zúžitkovaní rôznych drevných a poľnohospodárskych odpadov obsahujúcich polysacharidy.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob produkcie enzýmu β -glukozidázy pomocou baktérií rodu *Streptomyces* vyznačený tým, že kultiváciou kmeňov rodu *Streptomyces* :

<i>Streptomyces aureofaciens</i>	CCM 3239
" " <i>anulatus</i>	CCM 3158
" " <i>levandulae</i>	CCM 3010
" " <i>antibioticus</i>	CCM 3159
" " <i>griseocarneum</i>	CCM 3228
" " <i>rutgersensis</i>	CCM 3169
" " <i>diastatiens</i>	CCM 3167

jednotlivo alebo ich zmesí na živnej pôde obsahujúcej celulózu alebo jej hydroxyetyl-, karboxyetyl-, hydroxypropyl deriváty pri teplote 25 až 40 °C s výhodou pH 7,5 po dobu 10 až 20 hodín produkuje enzým β -glukozidázu, ktorý sa získava v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne v čiastočne zušľachtenom stave zrážaním síranom amonným alebo organickým rozpúšťadlom s výhodou acetónom a etanolom.