



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 03.05.77

(21) PV 2868-77

(40) Zverejnené 31.12.80

(45) Vydané 31.06.82

208 239

(1) (B1)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/42

(75)

Autor vynálezu AUGUSTÍN JOZEF, PhMr., ZEMEK JURAJ, ing. CSc., KUNIAK ĽUDOVÍT, ing. CSc.,
BRATISLAVA a MARVANOVÁ ĽUDMILA, RNDr. CSc., ERNO

(54) Spôsob produkcie enzýmov štiepiacich celulózu

Vynález sa týka spôsobu produkcie enzýmov štiepiacich celulózu pomocou niektorých húb rodu *Trichoderma*.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že kmene rodu *Trichoderma* sa jednotlivito alebo v zmesi predkultivujú na minerálnej živnej pôde obsahujúcej $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukán ako induktor enzýmu pri teplote 30 °C, po dobu 24 hodín pri pH = 5 a následovne preočkujú na produkčnú pôdu s celulózu, dusíkom vo forme amónnych solí a fosfátom pH 4,2 až 6,5, pričom celulóza sa produkuje po dobu 120 hodín pri teplote 20 až 40 °C a izoluje odparením rastovej pôdy, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo organickým rozpúšťadlom.

Enzýmy celulázového typu sú využiteľné v procese sacharifikácie celulózy k štúdiu protoplastov baktérií a rastlín a na hydrolytický rozklad drevného odpadu.

Vynález sa týka spôsobu produkcie enzýmov štiepiacich celulózu pomocou niektorých húb rodu *Trichoderma*.

Ako producenti celulózy sa využívajú v rámci rodu *Trichoderma* 3 druhy, a to okrem *Trichoderma viride* aj *Trichoderma koningii* a *Trichoderma lignorum* (US patent č. 3398055; Brigitta Norkvans *Physiol. Plantarum* 16 (1963) 1; T. Iwasaki, K. Hayashi, M. Funatsu (1964), *J. Biochem. (Tokio)* 55, 209-12; Lonanok A. G., Shklyar B. Kh. (1970) *Vestsi Akad. Nauk, Belarus SSR, Ser. Biyal. Navuk* 4, 58-61). Aj keď u niektorých izolátov predovšetkým *Trichoderma viride* je špecifická aktivita produkcie celulózy pomerne vysoká (až 0,4 U/mg) nevýhodou je pomerne dlhá lag fáza predchádzajúca vlastnú tvorbu celulózy, široká variabilita vlastností a strata produkčných schopností počas uchovávanía produkčných kmeňov.

Uvedené nedostatky odstraňuje postup podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že kmene rodu *Trichoderma*:

<i>Trichoderma harzianum</i>	CCM F - 340
" <i>longibrachiatum</i>	CCM F - 342
" <i>harzianum</i>	CCM F - 470
" sp.	CCM F - 521
" sp.	CCM F - 522
" <i>hamatum</i>	CCM F - 541
" sp.	CCM F - 556
" <i>aureoviride</i>	CCM F - 559
" <i>longibrachiatum</i>	CCM F - 560
" <i>saturnisporum</i>	CCM F - 561
" sp.	CCM F - 571
" <i>piluliferum</i>	CCM F - 573
" <i>polysporum</i>	CCM F - 542
" <i>polysporum</i>	CCM F - 572
" sp.	CCM F - 591
" sp.	CCM F - 592
" sp.	CCM F - 593
" <i>pseudokoningii</i>	CCM F - 563

sa jednotlivito alebo v zmesi predkultivujú na minerálnej živnej pôde obsahujúcej $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukán ako induktor enzýmu pri teplote 30 °C, po dobu 24 hodín pri pH = 5 a nasledovne preočkujú na produkčnú pôdu s celulózu, dusíkom vo forme amónnych solí a fosfátom pH 4,2 až 6,5, pričom celulóza sa produkuje po dobu 120 hodín pri teplote 20 až 40 °C a izoluje odparením rastovej pôdy, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo organickým rozpúšťadlom s výhodou etanolom.

Uvedené kmene rodu *Trichoderma* použité na produkciu celulózy sú uložené v čs. zbierke mikroorganizmov, Univerzita J. E. Purkyně, Brno, Obránců míru 10.

Výhodou uvedeného spôsobu produkcie celulózy je vysoká špecifická aktivita produkovaného celulózového enzýmového systému v súhrne až 0,74 U/mg a stabilita zmesnej kultúry po-

čas uchovávanie v lyofylizovanom stave.

Praktické využitie uvedeného postupu spočíva v tom, že celulázový systém produkovaný do kultivačného média je jednoduchou metódou izolovateľný. Z makromolekulárneho substrátu vznikajú oligosacharidy celobiózového typu. Enzymy celulázového typu sú v izolovanom stave využiteľné v procese sacharifikácie celulózy a k štúdiu protoplastov baktérií a rastlín. Ďalšia možnosť využitia tejto vlastnosti uvedených kmeňov rodu *Trichoderma* je v hydrolytickom rozklade dreveného odpadu za vzniku enzymatického hydrolyzátu využiteľného v ďalšom stupni pri nahromadení nutrične hodnotnej bielkoviny kultiváciou kvasiniek, resp. kvasinkovitých mikroorganizmov.

Príklad 1

Z vypratého gélu zo sieťovanej hydroxyetylcelulózy podľa autorského osvedčenia č. 183 169 sa vyrežú trojuholníkové profily o strane 4 cm, vložia sa do Petriho misky a zalejú sa roztokom kultivačného média Czapek - Dox; pH = 5 (s gélom hydroxyetylcelulózy ako jediným zdrojom uhlíka) bez agaru a sacharózy tak, aby pol hrúbky gélu vyčnievalo nad hladinu kultivačného média. Po sterilizácii pri 100 °C sa očkuje na povrchu gélu kultúry *Trichoderma harzianum* CCM F - 340 a kultivuje sa pri 30 °C. Celulózový gél stekutený v priebehu 24 hodín, spolu s pomnoženým vyšľachteným kmeňom *Trichoderma harzianum* CCM F - 340 (0,24 g) sa použil ako inokulum na produkčnú pôdu (2 l) z odpadu hydroxyetylcelulózovej vaty (150 g) so 4 g síranu amónneho a 2 g dihydrofosforečnanu draselného (pH = 4,5). Kultivácia prebiehala po dobu 120 hodín pri 20 °C. Po ukončení kultivácie sa biomasa odfiltravala a filtrát sa zahustil na odparke. Získal sa surový enzymový preparát s celulázovou aktivitou 37 U a špecifickou aktivitou 0,62 U/mg.

Príklad 2

Postupovalo sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použil kmeň *Trichoderma polysporum* CCM F - 542, použitá pôda podľa príkladu 1 bola nastavená na pH 6,0 a kultivácia prebiehala pri 30 °C po dobu 120 hodín. Enzymový preparát mal aktivitu 42 U a špecifickú aktivitu 0,29 U/mg.

Príklad 3

Postupovalo sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto uvedených kmeňov sa použila zmesná kultúra kmeňov *Trichoderma karzanium* CCM F - 470, *Trichoderma hamatum* CCM F - 541 a *Trichoderma piluliferum* CCM F - 573. Použitá pôda podľa príkladu 1 bola nastavená na pH 6,5 a kultivácia prebiehala pri 40 °C po dobu 120 hodín. Enzymový preparát mal aktivitu 42 U a špecifickú aktivitu 0,74 U/mg.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob produkcie enzýmov štiepiacich celulózu, vyznačujúci sa tým, že kmene rodu *Trichoderma*:

<i>Trichoderma harzianum</i>	CCM F - 340
" <i>longibrachiatum</i>	CCM F - 342
" <i>harzianum</i>	CCM F - 470
" <i>sp.</i>	CCM F - 521
" <i>sp.</i>	CCM F - 522
" <i>hamatum</i>	CCM F - 541
" <i>sp.</i>	CCM F - 556
" <i>aureoviride</i>	CCM F - 559
" <i>longibrachiatum</i>	CCM F - 560
" <i>saturnisporum</i>	CCM F - 561
" <i>sp.</i>	CCM F - 571
" <i>pipuliferum</i>	CCM F - 573
" <i>polysporum</i>	CCM F - 542
" <i>polysporum</i>	CCM F - 572
" <i>sp.</i>	CCM F - 591
" <i>sp.</i>	CCM F - 592
" <i>sp.</i>	CCM F - 593
" <i>pseudokoningii</i>	CCM F - 563

sa jednotlivé alebo v zmesi predkultivujú na minerálnej živnej pôde obsahujúcej $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukán ako induktor enzýmu pri teplote 30 °C po dobu 24 hodín, pri pH 5,0 a následovne preočkujú na produkčnú pôdu s celulórou, dusíkom vo forme amónnych solí a fosfátom, pH 4,2 až 6,5, pričom celulóza sa produkuje po dobu 120 hodín pri teplote 20 až 40 °C a izoluje odparením rastovej pôdy, prípadne zrážaním síranom amónnym alebo organickým rozpúšťadlom s výhodou etanolom.