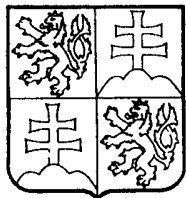


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 01332-91.F

(13) A3

5(51) C 12 N 9/24

(22) 07.05.91

(32) 08.05.90

(31) 90/1030

(33) AT

(40) 17.12.91

(71) VOEST-ALPINE Industrieanlagenbau GmbH, Linz, AT

(72) Wizani Wolfgang dipl. ing., Steyr, AT
Esterbauer Hermann dr., Graz, AT
Steiner Walter dr., Graz, AT
Gomes Joseph dr., Dhaka, BD

(54) Způsob výroby xylanázy

(57) Způsob výroby xylanázy, se provádí kultivací houby v živném prostředí, které obsahuje kukuřičné palice, s výhodou hrubě mleté. Řešení rovněž spočívá v houbě *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826, který xylanázu produkuje, dále v použití xylanázy a také v xylanáze, prosté exoceluláz a endoceluláz a získané svrchu uvedeným způsobem.

Č.	034666
Dosud	22. VII. 91
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	PŘÍL.

Způsob výroby xylanázy

Oblast vynálezu

Vynález se týká způsobu výroby xylanázy. mikroorganismu *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826, který tento enzym produkuje a také získané exo- a endoceluláz prosté xylanázy.

Dosavadní stav techniky

Odbourání hemicelulózy, která je tvořena u jednoletých rostlin a u listnatých dřevin převážně xylanem je nutným stupněm při výrobě buničiny. Toto odbourání je možno provést buď chemicky například extrakcí za horka v alkalickém prostředí nebo také enzymaticky působením enzymů, specifických pro uvedený substrát, zřejmě působením xylanáz. Enzymatickým zpracováním nebílené nebo šástečně bílené buničiny působením xylanáz se rozštěpí vazby hemicelulózy a odbourá se xylan. K tomuto účelu je možno použít pouze čistou xylanázu, která není zněčištěna celulázami, protože jinak by došlo také k rozštěpení celulózy, což je naprosto nežádoucí.

Xylanázy, které odbourávají látky s obsahem xyланu v živném prostředí a využívají je jako zdroje uhlíku jsou produkovány mimo jiné celou řadou mesofilních a termofilních mikroorganismů. V závislosti na dalších látkách, přítomných v živném prostředí, převážně v závislosti na celulóze se však tvoří také celulázy, specifické pro tento substrát. Aby bylo možno získat xylanázy, prosté exoceluláz a endoceluláz, je nutno tuto xylanázu oddělit od vytvořených celuláz velmi pracovním postupem a čistit. Aby bylo možno snížit produkci celuláz při fermentaci, je možno mikroorganismy pěstovat také na čištěném xylanu. V publikaci D.J.Senior a další, *Biotechnology Letters*, sv. 10, č. 12, str. 907-912 (1988) se popisuje použití xylanáz, získaných z *Trichoderma harzianum*, pěstovaného na čištěném xylanu, k selektivnímu odbourávání xyланu.

Výroba xylanázy pěstováním na vysoce čistém xylanu však nepadá v úvahu vzhledem k vysoké ceně suroviny pro většinu technických účelů.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že je možno získat xylanázu s překvapivě vysokou účinností v případě, že se pěstuje určitá houba v živném prostředí s obsahem kukuřičných palic. V tomto případě obsahuje produkovaná xylanáza velmi malé množství exoceluláz a endoceluláz nebo tyto enzymy neobsahuje vůbec.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je způsob výroby xylanázy, který spočívá v tom, že se pěstuje houba v živném prostředí s obsahem kukuřičných palic.

Získá se xylanáza, která neobsahuje exocelulázy nebo endocelulázy nebo jich obsahuje jen nepatrné množství.

Houby, které je možno použít při provádění způsobu podle vynálezu jsou takové houby, které při podmínkách způsobu podle vynálezu mohou produkovat vysoké množství xylanázy. Příkladem může být *Thermomyces lanuginosus* (dříve *Humicola lanuginosa*). Kmen čeledi *Moniliales* byl izolován v Bangladéši z hald jutového odpadu závodu, v němž byla jutová vlákna zpracovávána olejovou emulsí. Teplota na haldách odpadu juty byla 65 až 70 °C. Kmen byl uložen ve veřejné sbírce kultur *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturem* pod číslem DMS 5826. Tento kmen je zvláště vhodný k dosažení velmi rychlé produkce xylanázy v živném prostředí, které obsahuje kukuřičné palice.

Thermomyces lanuginosus DSM je nový a tvoří rovněž podstatu vynálezu.

Živné prostředí obsahuje kromě živin a stopových prvků, nutných pro výživu houby ještě kukuřičné palice. Tyto kukuřičné palice mohou být obsaženy jako takové nebo v mletém stavu a popřípadě sterilizované zahřátím na 110 až 160 °C nebo je možno je předem zpracovat působením přehřáté páry. Neočekávaně je možno získat vysoké množství xylanázy tak, že se kukuřičné palice před použitím nahrubo melou. V případě, že jsou palice pouze šrotovány nebo jemně mlety, jsou přesto výsledky překvapivě dobré, avšak užití hrubě mletých kukuřičných palic poskytuje nejlepší výsledky.

Vhodnými zdroji dusíku jsou například pepton z masa, pepton z ryb, močovina, síran amonný, sladový extrakt, extrakt z ryb, sojová mouka, extrakt z kvasnic a podobně, anorganické soli jsou například hydrogensíran draselný, dihydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan sodný, síran železnatý, chlorid vápenatý, síran hořečnatý apod. Abybylo možno příznivě ovlivnit tvorbu xylanázy a její předávání do živného prostředí může být výhodné přidat smáčedla. Jde obvykle o neiontová smáčedla, například Tween 40, Tween 60 nebo Tween 80 v množství 0,05 až 0,5 % hmotnostních, vztaženo na celkové množství prostředí. Prostředí může obsahovat také stopové prvky, například kovy jako Mn^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} nebo vitaminy.

Prostředí se s výhodou upraví přidáním amoniaku nebo kyseliny fosforečné na pH 5,0 až 8,0, s výhodou 6,0 až 7,0.

Kultivace se provádí při teplotě 30 až 70, s výhodou 40 až 60 a zvláště 45 až 55 °C. Udržování pH, upraveného na počátku fermentace, není nutné. Je však možno jej udržovat dalším přidáním amoniaku nebo kyseliny fosforečné.

Po skončení fermentace je možno xylanázu izolovat z fermentačního prostředí obvyklým způsobem. K tomuto účelu se mycelium, spory a nerozpuštěné látky oddělí odstředěním

nebo odfiltrováním. Další čištění enzymu je možno provádět obvyklým způsobem, například přidáním síranu amonného nebo vysrážením rozpouštědlem jako acetone, alkoholem apod. Tato získaný surový enzym je pak možno dále čistit například filtrací na gelu, chromatografií na iontoměničích, elektroforézou na gelu apod,

Xylanáza, získaná způsobem podle vynálezu má vysokou účinnost. Bylo prokázáno, že při použití kukuřičných palic je možno dosáhnout daleko vyššího výtěžku než při použití jiných nezpracovaných surovin, jako jsou ječmenné plevy, pšeničná sláma, pšeničné klíčky, mletá buková kůra, vojtěšková moučka, moučka z červeného jetele a sojového oleje jako zdroje uhlíku. Při použití hrubě mletých kukuřičných palic se zvyšuje účinnost získané xylanázy několikrát.

Získaná xylanáza neobsahuje buď žádné exo- a endocelulázy nebo jich obsahuje jen nepatrné množství. Xylanáza, produkovaná *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 byla ve větším počtu zkoušek prostá uvedených enzymů. Taková xylanáza tvoří rovněž podstatu vynálezu.

Kmen *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 může tuto xylanázu produkovat nejen v prostředí, které obsahuje kukuřičné palice, nýbrž i v prostředí, které místo kukuřičných palic obsahuje jiné pevné nebo rozpuštěné zdroje uhlíku jako ječmenné plevy, mletou pšeničnou slámu, nebílenou buničinu nebo samotný xylan. Překvapujícího množství je však možno dosáhnout při použití kukuřičných palic.

Xylanáza podle vynálezu, prostá exo- a endoceluláz má po vysrážení ethynolem a po lyofilizaci následující vlastnosti:

a) Stálost při různém pH (obr.1)

Enzym byl inkubován v roztoku pufru při různém pH 66 hodin při teplotě 20 °C. Účinnost všech vzorků byla stanovena při použití 1% hemicelulózy při pH 4,8 následujícím způsobem: 1 ml 1% roztoku substrátu v pufru s citrátem sodným o pH 4,8, (Xylan z ovesných plev, Sigma X-0627) byl inkubován při teplotě 50 °C 2 minuty a pak po přidání 0,5 ml roztoku enzymu ještě 15 minut při teplotě 50 °C. Pak byly přidány 3 ml kyseliny dinitrosalicylové jako reakčního činidla (FPU-test podle IUPAC) a 0,5 ml 2,5 N NaOH a směs byla zahřívána 5 minut na vroucí vodní lázni. Pak byla rychle zchlazena ve chladné vodní lázni a byla měřena extinkce při 540 nm proti slepé zkoušce (citrátový pufr). Od této hodnoty je nutno odečíst extinkci enzymu (0,5 ml enzymu + 1,0 ml citrátového pufru) a extinkci substrátu (1 ml 1% roztoku substrátu v citrátovém pufru). Cejchovací křivka byla provedena s použitím 1,0 ml citrátového pufru a 0,5 ml standardního roztoku (s obsahem 0,5 až 1,5 mg xylósy/ml).

Výpočet účinnosti xylanázy:

$XU/ml = \text{mg redukujícího cukru (jako xalozový test)} \times 0,888$
Při pH 5,0 až 7,0 se udrží 97 až 100 % původní účinnosti

b) Optimální hodnota pH (Obr. 2)

Enzymatická účinnost byla zjišťována inkubací 15 minut při teplotě 50 °C při použití 1% suspenze hemicelulózy v citrátovém pufru o pH 3,0 až 6,5, tris-pufru s HCl o pH 7,0 až 9,0 a fosfátovém pufru o 6,5 až 8,0.

Optimální pH je 6,0 až 7,5

c) Stálost při vyšší teplotě

Roztok enzymu byl inkubován při teplotě 45 až 60 °C v 0,05 M citrátovém pufru o pH 4,8 po dobu 0 až 72 hodin. Účinnost enzymu byla měřena při použití 1% hemicelulózy při teplotě 50 °C.

Po 20 hodinách bylo při teplotě 45 °C naměřeno 93 % a při teplotě 50 °C bylo naměřeno 65 % původní účinnosti.

d) Optimální teplota (obr. 4)

Enzymatická účinnost byla měřena inkubací s 1% suspenzí hemicelulózy v 0,05 M citrátovém pufru při pH 4,8 po dobu 15 minut.

Optimální teplota je 65 °C.

e) Obsah exo- a endoceluláz a beta-glukosidázy v roztoku enzymu o 385 XU/ml

i) exo- a endocelulázy:

Při provádění FPU-testu podle IUPAC nebylo možno prokázat žádnou účinnost celulázy.

Mimoto byla podrobena působení enzymu dialyzační trubice z regenerované celulózy na 72 hodin ve vodném prostředí a prostředí bylo zkoumáno na přítomnost glukózy. Nebyla prokázána žádná glukóza. Enzymy s obsahem celuláz rozpustí dialyzační trubici v několika málo hodinách.

Dále byla stanovena povaha redukujícího cukru v průběhu dlouhodobé inkubace enzymu s buničinou při pH 6,5. Měření bylo prováděno po 3, 7, 19 a 163 hodinách. Ukázalo se, že ve všech případech byla uvolněna pouze xylóza, xylobióza a xylotriózy, avšak žádná glukóza. Endocelulázy byly prokázovány také pomocí agarového gelu, zbarveného OBR-hydroxyethylcelulózou, nebylo možno prokázat žádnou účinnost. Enzym byl podle všech zkoušek zcela prostý celuláz.

Xylanáza podle vynálezu neobsahovala při hranici stanovení 0,1 jednotky/ml také žádnou karboxymethylcelulázu (endo- β -1,4-celulázu) a je proto možno ji užít také při výrobě viskózy.

ii) β -glukosidázy

0,6 ml 0,05 M pufru s citrátem sodným o pH 4,8 a 0,3 ml roztoku enzymu se předem inkubuje 2 minuty při teplotě

50 °C. Pak se přidá 0,3 ml p-nitrofenol-β-D-glukosidu (4 mg/ml pufru s citrátem sodným) a směs se inkubuje 10 minut při 50 °C. Reakce se zastaví přidáním 2,4 ml 1 M roztoku Na₂CO₃ a pak se měří extinkce při 405 nm proti slepé zkoušce. Účinnost β-glukosidázy se vypočítá následujícím způsobem:

$$\text{IU/ml} = \frac{E \cdot 12}{18,5 \times t}$$

kde

E je extinkce a

t je doba reakce v minutách.

Xylanáza podle vynálezu měla účinnost β-glukosidázy 0,2 až 0,9 IU/ml.

Obsah β-glukosidázy, která štěpí cellobiózu na glukózu nemá žádný vliv na chování xylanázy podle vynálezu při výrobě buničiny vzhledem k tomu, že v nepřítomnosti exo- a endoceluláz nevznikají žádné produkty odbourávání celulózy, které by mohly být štěpeny β-glukosidázou.

f) Účinnost β-xylosidázy, arabinosidázy, acetylésterázy, acetylxylanesterázy a mannázy je ≤ 100 jednotek /l.

g) Podíl rozpustné bílkoviny v enzymatické směsi byl 800 mg/l, molekulová hmotnost hlavního podílu bílkoviny byla 24 000 až 25 000 a isoelektrický bod hlavní bílkoviny byl 4,1.

h) Čištěný enzym byl enzymaticky hydrolyzován na 11 peptidů. byl stanoven řetězec 4 peptidů, obsahujících 8, 16, 5 a 12 zbytků aminokyselin. Xylanáza byla na svém N-terminálním zakončení blokována a nebylo tedy možno stanovit řetězec z N-terminálního zakončení. Na rozdíl od tohoto zjištění obsahovala xylanáza z *Humicola lanuginosa* sp. (= *Thermomyces lanuginosus*) podle Anand a další, Arch. Biochem. Biophys. 276, 546-554 (1990) jako N-terminální aminokyselinu arginin.

Xylanáza, získaná způsobem podle vynálezu slouží k enzymatickému zpracování rostlinných surovin a vláknitých materiálů s obsahem xylanu a lignocelulózy a je možno ji užít s výhodou například k bělení, odstranění barviv, zušlechtnění buničiny při výrobě viskózy nebo pro jiné předběžné zpracování, například k odstranění xylanu před štěpením.

Rostlinnými materiály s obsahem xylanu a lignocelulózy se rozumí suroviny z listnatých a jehličkatých dřevin, jednoletých rostlin jako jsou len, sláma, bagasa, kenaf, rákos, traviny apod, avšak také vláknité materiály z rostlinných surovin, jako bělená, částečně bělená nebo nebělená buničina nebo starý papír.

před použitím není nutno xylanázu podle vynálezu čistit, stačí oddělit pevné živné prostředí. Po oddělení pevných materiálů je možno fermentační prostředí přímo užít ke zpracování vláknitých materiálů z rostlinných surovin.

Při použití v průmyslu buničiny je možno xylanázou podle vynálezu zpracovávat nebělenou, částečně bělenou nebo bělenou buničinu. Tím se dosáhne rozštěpení vazeb mezi hemicelulózou a ligninem. V následném bělicím stupni je proto nutno užít menšího množství bělicího prostředku. Při zpracovávání částečně bělené buničiny se odbourá xylan, zbylý po předběžném bělení, čímž se získá čistší a světlejší produkt. Účinnost enzymatického zpracování se hodnotí číslem Kappa (K), které určuje obsah oxidovatelných látek, například ligninu. V bělené buničině se působením xylanázy dosáhne vyššího obsahu alfa-celulózy.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

300 ml prostředí, sestávajícího z 9 g mletých a usušených kukuřičných palic, 3,3 g peptonu z masa, 0,6 g síranu amonného, 0,45 g močoviny, 0,09 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,09 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 4,5 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,3 ml Tween 80, 0,3 ml S_1 (1,6 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,45 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) a 0,3 ml S_2 (5 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) se upraví na pH 6,0 a sterilizuje se v autoklávu na třepačce 60 minut při teplotě 128 °C.

Pak se prostředí naokčuje předběžnou kulturou *Thermomyces lanuginosus* DMS 5826 a kultivuje se 4,5 dní při teplotě 50 °C při 140 ot./min.

Pak se prostředí zfiltruje a stanoví se účinnost xylanázy (XU/ml), β -glukosidázy (IU/ml), karboxymethylcelulázy (CMC-áza/ml) a exoglukanázy (FPU/ml).

XU/ml	389,7
po 3 dnech při teplotě 4 °C	395,0
iU/ml	0,29
FPU/ml	nelze prokázat
CMC-áza/ml	nelze prokázat

Příklad 2

Kukuřičné palice se

- a) sešrotují (velikost částic větší než 10 mm)
- b) nahrubo umelou (velikost částic 3 až 10 mm)
- c) jemně umelou (velikost částic menší než 3 mm).

Připraví se vždy 1000 ml živného prostředí, které obsahuje 28,6 g extraktu z kvasnic, 4,23 g síranu amonného, 10 g

dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,3 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a 0,3 $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a mimoto 25 g a) šrotovaných, b) hrubě mletých nebo c) jemně mletých sušených kukuřičných palic, prostředí se upraví na pH 6,5 a sterilizuje ve třepací baňce 25 minut při teplotě 121 °C.

Pak se prostředí naočkuje předběžnou kulturou *Thermomyces lanuginosus* DMS 5826 a kultura se pěstuje za protřepávání při teplotě 50 °C. Po 5 dnech se kultura zfiltruje a stanoví se účinnost xylanázy (XU/ml) v různých prostředích:

Kukuřičné palice	XU/ml	XU/ml po 1 dnu skladování při teplotě 4 °C
šrotované	764	881
hrubě mleté	1601	1526
jemně mleté	388	423

Příklad 3

V případě, že bylo použito prostředí z příkladu 2 a postup byl prováděn popsáním způsobem, avšak při použití jiných zdrojů uhlíku, bylo dosaženo následující účinnosti xylanázy:

Zdroj uhlíku	účinnost xylanázy (XU/ml)
kukuřičné palice (50 % hrubě, 50 % jemně mletých	477
pšeničná sláma	232
pšeničné klíčky	186
ječmenné pluchy	61
Ulva rufida (řasa)	28
vojtěšková moučka	20

moučka z červeného jetele	14
mletá buková kůra	8
rozpustné škroby	4
sojový olej	4

Příklad 4

Thermomyces lanuginosus byl pěstován způsobem podle příkladu 1, avšak místo mletých kukuřičných palic bylo užito 9 g mleté pšeničné slámy.

XU/ml	104,3
po 3 dnech při teplotě 4 °C	123,9
IU/ml	0,51
FPU/ml	nelze prokázat
CMC-áza/ml	nelze prokázat

Příklad 5

Thermomyces lanuginosus DMS 5826 byl pěstován obdobně jako v příkladu 1, avšak místo kukuřičných palic bylo užito ječmenných pluch.

XU/ml	222,9
po 3 dnech při teplotě 4 °C	196,2
IU/ml	0,60
FPU/ml	nelze prokázat
CMC-áza/ml	nelze prokázat

Příklad 6

Thermomyces lanuginosus byl pěstován obdobným způsobem jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že místo kukuřičných palic bylo užito 9 g hemicelulózy (xylan).

XU/ml	151,55
IU/ml	nelze prokázat
FPU/ml	nelze prokázat
CMC-áza/ml	nelze prokázat

Příklad 7

Zpracování sulfátové buničiny

Sušená sulfátová buničina z tvrdého dřeva (Ruzomberok) byla zahřívána 1,5 hodin s vodou na teplotu 45 °C a protřepávána. Pak byla přidána xylanáza, vyrobená způsobem podle příkladu 1 a směs byla třepána při 230 ot./min.

a) 30 g fermentačního prostředí	b) 90 g fermentačního prostředí
220 g buničiny (K=19,97)	220 g buničiny (K= 19,97)
350 g vody	290 g vody
na 1 g vláken bylo přidáno	na 1 g vláken bylo přidáno
100 XU enzymu	300 XU enzymu

Po odfiltrování buničiny byla stanovena hodnota čísla Kappa:

a) 17,45

b) 13,39

PŘÍL. A OBJEVY	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	22. VII. 91	034666	81

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby xylanázy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pěstuje houba v živném prostředí, které obsahuje kukuřičné palice.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pěstuje houba *Thermomyces lanuginosus*

3. Způsob podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pěstuje houba *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826.

Způsob podle nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se houba pěstuje při teplotě 30 až 70 °C a při pH 5,0 až 8,0.

5. Způsob podle nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se houba pěstuje při teplotě 45 až 55 °C a při pH 5,0 až 8,0.

6. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pěstuje houba *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 při teplotě 45 až 50 °C a při pH 6,0 až 7,0.

7. *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826.

8. Xylanáza, prostá exo- a endocelulázy, získaná kultivací *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 v živném prostředí.

9. Použití xylanázy, prosté exoceluláz a endoceluláz, vyrobené způsobem podle nároků 1 až 6, k enzymatickému zpracování rostlinných surovin, obsahujících xylan a lignocelulózu a vláken z těchto materiálů.

10. Použití podle nároku 9, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že se xylanáza, prostá exoceluláz a endoceluláz
získá kultivací houby *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826.

Zastupuje:

Okřezlána
JUDr. Zdeňka KOREJZOVÁ
advokátka