



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

230887
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/42

(22) Prihlášené 10 01 83
(21) {PV 137-83}

(40) Zverejnené 13 01 84

(45) Vydané 15 11 86

(75)

Autor vynálezu

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

(54) Spôsob produkcie β -1,4-glukánohydrolázy pomocou mikroskopickéj huby *Blastobotrys proliferans*

1

2

Spôsob produkcie β -1,4-glukán glukánhydrolázy pomocou mikroskopickéj huby *Blastobotrys proliferans*.

Vynález sa týka oboru mikrobiológie, chémie a biochémie sacharidov.

Účelom vynálezu je získanie β -1,4-glukán glukánhydrolázy (celulázy) schopnej hydrolyticky štepiť nielen celulózu a jej syntetické deriváty, ale aj natívny derivát tamarind.

Uvedeného účinku sa dosiahne pomocou mikroskopickéj huby *Blastobotrys proliferans* rodu *Blastobotrys* Klopotek čeľade *Moniliaceae*, rodu *Moniliales* triedy *Deuteromycetes* kultivovanej na vhodných živných pôdach.

β -1,4-glukán glukánohydrolázu možno získať o pomerne vysokej špecifickej aktivite 11 až 15 nkat/mg biomasy a vhodných vlastnostiach, predovšetkým s ohľadom na vysoké zastúpenie vzácneho oligosacharidu celotriózy v enzymatickom hydrolyzáte (až 15 %).

Vynález má využitie v mikrobiológii, biochémii a chémii sacharidov, všade tam kde ide o jednoduchú metódu spracovania poľnohospodarských odpadov.

Vynález sa týka spôsobu produkcie enzýmu β -glukán glukánohydrolázy (EC 3.2.1.4) pomocou mikroskopickkej huby *Blastobotrys proliferans* kultivovanej na vhodných živných pôdach.

Pre priemyslovú produkciu β -glukán glukánohydrolázy sa používajú najčastejšie nasledujúce mikroorganizmy: *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Neurospora crassa* a iné.

Sú však aj iné mikroorganizmy, o ktorých doposiaľ nebolo známe, že majú schopnosť produkcie β -glukán glukánohydrolázy. Pomocou gélovej metódy (A. O. č. 183 169) testovania mikroorganizmov na celulózu aktivitu v priebehu kultivácie mikroorganizmov sme zistili výraznú produkciu celulólytickej aktivity mikroskopickou hubou *Blastobotrys proliferans*.

Blastobotrys proliferans je novopopísaný druh rodu *Blastobotrys* Klopotek čeľade Moniliaceae, rodu Moniliales, triedy Deuteromycetes [Marvanová L.: Two new *Blastobotrys* species. Transactions of the British Mycological Society 66, 217 (1976)], izolovaný z para orechov (*Bertholletia excelsa*) z poškodeného jadra. O produkciu hydroláz polysacharidov uvedeným druhom *Blastobotrys proliferans* nie je zatiaľ nič známe.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že kultiváciou kmeňa *Blastobotrys proliferans* CCMF-493, deponovaný ako CBS 522.75 v Holandsku, resp. ATCC 34 216 — zbierka typových kultúr USA, na živnej pôde obsahujúcej celulózu alebo jej deriváty (hydroxyetyl, karboxymetyl, hydroxypropyl, tamarind), pri teplote 37 °C po dobu 48 až 120 hodín a hodnote pH 4,8 sa produkuje enzým β -1,4-glukán glukánohydroláza (EC 3.2.1.4), ktorý sa získava v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne v prečistenom stave zrážaním síranom amonným (67 %-né nasýtenie), etanolom alebo acetónom (1 : 1).

Výhodou postupu je predovšetkým to, že príprava β -1,4-glukán glukánohydrolázy je veľmi jednoduchá, možno použiť súčasť kultivačnej pôdy i neprečistené natívne substráty obsahujúce popri celulóze aj ďalšie polysacharidy (hemicelulózy, kyslé polysacharidy, lichenan a pod.) nakoľko uvedený organizmus popri enzýmoch celulólytického komplexu (β -1,4-glukán glukánohydroláza, β -glukozidáza, celobiohydroláza EC 3.2.1.-) produkuje aj enzýmové systémy schopné štepovať ho-reuvedené polysacharidy. Ďalšou výhodou je vysoký výťažok β -1,4-glukán glukánohydrolázy aktivity, ako aj vlastnosti izolovaného enzýmu, predovšetkým jeho schopnosť produkovať v priebehu hydrolýzy celulózo-veho materiálu celotriózu (až 15 % zo smesi produktov). Dôležitou vlastnosťou, ktorou sa odlišuje uvedená β -1,4-glukán glukánohydroláza od ostatných doposiaľ popísaných β -1,4-glukán glukánohydroláz je výhodná nešpecifita — schopnosť hydrolyticky štepiť natívny analóg celulózy, polysacharid tamarind, izolovaný z orechov tamarindov (*Tamarin-*

dus indica) v dôsledku čoho je uvedený polysacharid možné využiť pre nutričné účely.

Príklad 1

Blastobotrys proliferans CCMF-493 sa pomnoží na rastovej pôde obsahujúcej 2 g gélu hydroxyetylcelulózy pripraveného sietovaním (A. O. č. 183 169) ponoreného do polovice výšky v 20 ml Yeast Nitrogen Base (pH 4,8) rastovej pôde (0,6 g/100 ml) a kultivuje sa povrchovo po dobu 3 dní pri teplote 37 °C, kedy dochádza k stekutiu gélu. Nahromadená biomasa *Blastobotrys proliferans* (0,18 g) sa použije ako inokulum pôdy obsahujúcej 20 g kukuričného výluhu, 10 g hydroxyetylcelulózy na 1 liter pôdy (pH 4,8) a kultivácia prebieha po dobu 120 hod. Po 120 hod. kultivácie sa biomasa *Blastobotrys proliferans* odfiltruje a filtrát sa zahusť na odparke. Získaný enzýmový preparát má aktivitu β -1,4-glukán glukánohydrolázy 0,33 μ kat pri produkčnej špecifickej aktivite *Blastobotrys proliferans* 11 nkat/mg biomasy.

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že namiesto gélu pripraveného z hydroxyetylcelulózy sa použije gél pripravený zo sietovaného polysacharidu tamarind (A. O. č. 186 059) a kultivačná pôda (1 l) obsahuje namiesto kukuričného výluhu a karboxymetyl celulózy 25 g suspenzie polysacharidu tamarind, 2 g síranu amonného a 1 g dihydrofosforečnanu draselného. Kultivácia prebieha po dobu 48 hodín pri teplote 37 °C. Po ukončení kultivácie sa biomasa odfiltrovala a čiastočne prečistená β -1,4-glukán glukánohydroláza sa získala prezrážaním síranom amonným na stupeň nasýtenia 67 %. Získaný enzýmový preparát mal aktivitu 0,29 μ kat a špecifickú aktivitu 13 nkat/mg proteínu.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že β -1,4-glukán glukánohydroláza sa získala z kultivačnej pôdy po odstránení biomasy prezrážaním etanolom v objemovom pomere 1.1 ku zvyšku kultivačnej pôdy. Získala sa aktivita β -1,4-glukán glukánohydrolázy 0,42 μ kat o špecifickej aktivite 15 nkat/mg proteínu.

Príklad 4

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že namiesto gélu zo sietovanej hydroxyetyl celulózy k príprave inokula sa pripravil gél zo sietovanej hydroxypropyl celulózy. Aktivita získaného enzýmového preparátu bola taká ako je uvedená v príklade 1.

Vynález má využitie jednak pri príprave β -1,4-glukán glukánohydrolázy o výhodných vlastnostiach (vysoké zastúpenie celotriózy v celulóзовom hydrolyzáte), pri spracovaní

polysacharidu tamarind, resp. pri zúžitkovaní rôznych drevných a poľnohospodárskych produktov obsahujúcich polysacharidy.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob produkcie enzýmu β -1,4-glukán glukánohydrolázy pomocou mikroskopickej huby *Blastobotrys proliferans*, vyznačený tým, že sa kultivuje kmeň *Blastobotrys proliferans* CCMF-493 na živnej pôde obsahujúcej celulózu alebo jej hydroxyetyl, karboxymetyl, hydroxypropyl deriváty alebo natívny derivát celulózy polysacharid tamarind,

pri teplote 37 °C a hodnote pH 4,8 po dobu 48 až 120 hodín a enzým β -1,4-glukán glukánohydroláza sa získava v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne v prečistenom stave zrážaním síranom amonným alebo organickými rozpúšťadlami s výhodou etanolom alebo acetónom.