



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

205 318

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 19 07 77
(21) PV 4771-77

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/42

(40) Zverejnené 29 08 80
(45) Vydané 01 08 83

(75)
Autor vynálezu ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA, AUGUSTÍN JOZEF PhMr., KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc.,
BRATISLAVA a MARVANOVÁ ĽUDMILA RNDr. CSc., BRNO

(54) Spôsob produkcie enzýmov degradujúcich celulózu

1

Vynález rieši spôsob produkcie enzýmov degradujúcich celulózu.

Ako producenti celulázového enzýmového systému sa využívajú niektoré kmene rodu *Trichoderma* (US patent č. 3398055), u ktorých je nevýhodou pomerne dlhá lag fáza predchádzajúca vlastnú tvorbu celulózy, široká variabilita vlastností, možnosť výskytu mykotoxínov, a tým nie vždy vhodnosť použitia v potravinárstve a krmovinárstve.

Uvedené nedostatky odstraňuje spôsob produkcie enzýmov degradujúcich celulózu, ktorého podstata spočíva v tom, že kmene

<i>Penicillium aurantio-violaceum</i>	CCM F - 424
" <i>brefeldianum</i>	CCM F - 523
" <i>brunneum</i>	CCM F - 222
" <i>camemberti</i>	CCM F - 378
" <i>canescens</i>	CCM F - 425
" <i>chrysogenum</i>	CCM F - 362
" "	CCM F - 193
" "	CCM F - 390
" "	CCM F - 487
" <i>cyaneum</i>	CCM F - 376
" "	CCM F - 430

205 318

Penicillium frequentans	CCM F - 309
" gladioli	CCM F - 326
" griseofulvum	CCM F - 448
" piceum	CCM F - 329
" folfsii	CCM F - 337
" roquefortii	CCM F - 431
" robrum	CCM F - 199
" rugulosum	CCM F - 258
" simplicissium	CCM F - 339
" "	CCM F - 475
" spiculisporum	CCM F - 518
" stipizatum	CCM F - 174
" terlikowskii	CCM F - 321
" vermiculatum	CCM F - 276
" "	CCM F - 173
" verrucosum var.	CCM F - 240
corymbiferum	
" herquei	CCM F - 289
" islandicum	CCM F - 473
" javanicum	CCM F - 374
" ochrochlorum	CCM F - 158
" oxalicum	CCM F - 338
" verrucosum var.	CCM F - 389
cyclopiu	
" verrucosum var.	CCM F - 229
verrucosum	
" verrucosum var	CCM F - 583
verrucosum	
" wortmanni	CCM F - 407

sa jednotlivito alebo v zmesi predkultivujú na minerálnej živnej pôde obsahujúcej $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukán ako induktor enzýmu pri teplote 20 °C po dobu 24 hodín pri pH = 5 a potom preočkujú na produkčnú pôdu s celulózu, dusíkom vo forme amónnej soli a fosfátom, pH 4,2 až 6,5, pričom celulóza sa produkuje po dobu 96 hodín pri teplote 25 až 35 °C a izoluje odparením rastovej pôdy, prípadne zrážaním síranom amónnym.

Kmene rodu *Penicillium* 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 enzýmového systému v súhrne až 0,6 U/l a stabilita zmesnej kultúry počas uchovávaní v lyofilizovanom stave.

Praktické využitie spôsobu produkcie enzýmov degradujúcich celulózu spočíva v tom, že produkovaný enzým celulóza je jednoduchou metódou izolovateľný, pričom vznikajú z makromo-

lekulárneho substrátu typu celulózy oligosacharidy celobiózového rodu a glukóza. Enzymy celulázového typu sú v izolovanom stave využiteľné v procese sacharifikácie celulózy. 205 318

Príklad 1

Z vypratého gélu zo sieťovanej hydroxyetylcelulózy podľa AC č. 183 169 sa vyrežú trojuholníkové profily o strane 4 cm, vložia sa do Petriho misky a zalejú roztokom kultivačného média Yeast Nitrogen Base (0,6 g/100 ml vody, firma Oxoid) s gélom z hydroxyetylcelulózy ako jediným zdrojom uhlíka tak, aby polovica hrúbky gélu vyčnievala nad hladinou kultivačného média. Po sterilizácii pri 100 °C sa očkuje povrch gélu kmeňom *Penicillium griseofulvum* CCM F - 448 a kultivuje sa pri 20 °C. Celulózový gél stekutený v priebehu 24 hodín spolu s pomnoženou biomasou *Penicillium griseofulvum* (0,42 g) sa použil ako inokulum na produkčnú pôdu (2 l) z odpadu z hydroxyetylcelulózovej vaty (150 g) a 4 g síranu amónneho a 2 g dihydrogénfosforečnanu draselného. Kultivácia prebiehala po dobu 96 hodín pri 25 °C. Po ukončení kultivácie sa biomasu *Penicillium griseofulvum* odfiltrovala a získaný filtrát sa zahustil na vákuovej odparke na objem 25 ml. Získaný surový enzým celulóza mal aktivitu 19,2 U a špecifickú aktivitu 0,21 U/mg.

Príklad 2

Rovnako ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto *Penicillium griseofulvum* sa použije kmeň *Penicillium herquei* CCM F - 289. Výsledný surový enzýmový preparát mal aktivitu 16,6 U a špecifickú aktivitu 0,12 U/mg.

Príklad 3

Rovnako ako uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že namiesto vaty hydroxyetylcelulózy sa použije drť z novinového papiera. Získaný surový enzým mal aktivitu 9,2 U a špecifickú aktivitu 0,082 U/mg.

P R E D M E T V Y N Á Ľ E Z U

Spôsob produkcie enzýmov degradujúcich celulózu vyznačujúci sa tým, že kmene

<i>Penicillium aurantio-violaceum</i>	CCM F - 424
" <i>brefeldianum</i>	CCM F - 523
" <i>brunneum</i>	CCM F - 222
" <i>camemberti</i>	CCM F - 378
" <i>canescens</i>	CCM F - 425
" <i>chryseogenum</i>	CCM F - 362
" "	CCM F - 193
" "	CCM F - 390
" "	CCM F - 487
" <i>cyaneum</i>	CCM F - 376
" "	CCM F - 430
" <i>frequetans</i>	CCM F - 309
" <i>gladioli</i>	CCM F - 326

205 318	<i>Penicillium griseofulvum</i>	CCM F - 448
"	<i>piceum</i>	CCM F - 329
"	<i>rolfsii</i>	CCM F - 337
"	<i>roquefortii</i>	CCM F - 431
"	<i>robrum</i>	CCM F - 199
"	<i>rugulosum</i>	CCM F - 258
"	<i>simplicissimum</i>	CCM F - 339
"	"	CCM F - 475
"	<i>spiculisporum</i>	CCM F - 518
"	<i>stipitatum</i>	CCM F - 174
"	<i>terlikowskii</i>	CCM F - 321
"	<i>vermicelatum</i>	CCM F - 276
"	"	CCM F - 173
"	<i>verrucosum</i> var	CCM F - 240
	<i>corymbiferum</i>	
"	<i>herquei</i>	CCM F - 289
"	<i>islandicum</i>	CCM F - 473
"	<i>javanicum</i>	CCM F - 374
"	<i>ochrochlorum</i>	CCM F - 158
"	<i>oxalicum</i>	CCM F - 338
"	<i>verrucosum</i> var.	CCM F - 389
	<i>cyclopium</i>	
"	<i>verrucosum</i> var.	CCM F - 229
	<i>verrucosum</i>	
"	"	CCM F - 583
"	<i>wortmanni</i>	CCM F - 407

sa predkultivujú jednotlivo alebo v zmesi na minerálnej pôde obsahujúcej $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukán ako induktor enzýmu pri teplote 20 °C po dobu 24 hodín pri pH = 5 a potom sa preočkujú na produkčnú pôdu s celulórou, dusíkom vo forme amónnej soli a fosfátom, pH 4,2 až 6,5, pričom celulóza sa produkuje po dobu 96 hodín pri teplote 25 až 35 °C a izoluje odparením rastovej pôdy prípadne zrážaním síranom amónnym.