

(19)



(10) **LT 3970 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3970**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 1/22**
D21C 9/00

(21) Paraiškos numeris: **IP1245**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 09 28**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 04 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 05 27**

(60) SU duomenys: **PCT/SE 90/00885, 1990 12 28**

(31, 32, 33) Prioritetas: **9000070, 1990 01 10, SE**

(72) Išradėjas:

Eugene Rosenberg, IL
Yuval Shoham, IL

(73) Patent savininkas:

KORSNAES AB, S-801 81 Gaevle, SE
RAMOT-University Authority for Applied Research and Industrial
Development Ltd, 23 University Street, Tel-Aviv, IL
The Technion Research and Development Foundation Ltd, Technion City,
Haifa, IL

(74) Patentinis patikėtinis:

Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2-
12, 2001 Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

NCIMB 40221, NCIMB 40222, NCIMB Ltd., GB

(54) Pavadinimas:

Preparatas, pasižymintis fermentiniu delignifikaciniu aktyvumu, jo
gamybos būdas ir panaudojimas

(57) Referatas:

Yra aprašytas preparatas, pasižymintis fermentiniu aktyvumu ir sugebantis delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65° C temperatūroje ir esant pH mažiausiai 9. Šis preparatas yra gaunamas iš *Bacillus stearothermophilus* kamieno, parinkto iš deponuotų kamienų NCIMB 40221 ir NCIMB 40222 bei jų mutantų ir

LT 3970 B

variantų, aerobine fermentacija. Į išradimą taip pat įeina deponuoti kamieniai NCIMB 40221 ir NCIMB 40222. Dar yra atskleistas minėto preparato gamybos būdas ir procesas, apimantis medienos masės apdorojimą šiuo preparatu. Be to, šis išradimas apima minėto preparato panaudojimą, gaunant medienos masę, dulkių masę, popierių ir lentas, apdorotas šiuo preparatu.

Išradimas skirtas preparatui, pasižyminčiam fermentiniu aktyvumu, sugebančiam delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65°C temperatūroje, kai pH yra mažiausiai 9. Dar šis išradimas skirtas minėto preparato gamybos būdui, aerobiškai fermentuojant pasirinktą *Bacillus stearrowthermophilus* kamieną. Be to, šis išradimas skirtas dviem išskirtiems *Bacillus stearrowthermophilus* kamienams ir jų mutantams bei variantams. Išradimas taip pat skirtas išradimo preparato panaudojimams, būtent, procesui, apimančiam medienos masės apdorojimą preparatu pagal šį išradimą, medienos bei susmulkintos celiuliozės, apdorotai preparatu pagal šį išradimą, taip pat popieriui, lentoms ir dulkėms, pagamintoms iš medienos masės, apdorotos preparatu pagal šį išradimą.

Medienos ir popieriaus pramonėje yra dedamos didelės pastangos, kad būtų sumažintas chemikalų panaudojimas delignifikacijos ir balinimo procesuose, kadangi tokie chemikalai, ir ypač chloro junginiai, išteklėję iš balinimo įrenginių, padidina aplinkos užteršimą.

Vienas kelias sumažinti chemikalų panaudojimą masės sudaryme ir balinime yra susijęs su ligniną suskaldančių mikroorganizmų panaudojimu. Taip pat buvo pasiūlyti ligniną skaldantys ir ligniną modifikuojantys fermentai. Lignino suskaldymo išsami apžvalga buvo publikuota „Critical Reviews in Biotechnology, vol. 6, Issue 1, 1987, pp. 1-60, Ed. Stewart, G.G.“ ir „Russell, I., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida“.

Kitas kelias buvo susijęs su lignino išskyrimu, panaudojant hemiceliuliazes hemiceliuliozės jungčių nutraukimui. Apžvalginis straipsnis apie hemiceliuliazes - „Their Occurrence, Purification, Properties and Mode of Activity by Dekker, R.F.H. and Richards, G.N.“ buvo publikuotas žurnale *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, vol. 32, 1976, pp. 277-352.

Tarp hemiceliulazių panaudojimo biominkštinimui ir biobalinimui didžiausio dėmesio susilaukė ksilanazės. FR 2 557 894-A1 atskleidžia popieriaus masės apdorojimą fermentiniu tirpalu, kuris nepasižymi jokia

celiuliaziniu aktyvumu ir kuriame yra ksilanazės. Šis apdorojimas atliekamas 20-60°C, ypač 40°C temperatūroje, ir 6 pavyzdys parodo, kad pH turėtų būti 5. Tačiau popieriaus ir medienos pramonėje būtų geriau apdoroti medienos masę aukštesnėje temperatūroje ir esant didesniai pH dėl ekonominių priežasčių ir patogumo, kadangi kai kurie įprasti balinimo procesai atliekami temperatūroje, viršijančioje 65°C, esant pH didesniai už 9.

Kiek mums žinoma, niekas nepaskelbė apie medienos masės apdorojimą preparatu, pasižyminčiu fermentiniu aktyvumu ir sugebėjimu delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65°C temperatūroje, kai pH yra mažiausiai 9. Šis išradimas pateikia preparatą, pasižymintį fermentiniu aktyvumu ir sugebantį delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65°C temperatūroje, kai pH yra mažiausiai 9.

Šiame aprašyme ir pridėtoje apibrėžtyje posakis „medienos masė“ turi būti interpretuojamas plačiai, ir tuo būdu juo norima apimti visas lignoceliuliozinių medžiagų rūšis.

Vienas šio išradimo aspektų yra skirtas preparatui, pasižyminčiam fermentiniu aktyvumu, kuris gaunamas aerobinės fermentacijos būdu tinkamoje terpėje iš *Bacillus stearothermophilus* kamieno, parinkto iš deponuotų NCIMB 40221 ir NCIMB 40222 kamienų ir jų mutantų bei variantų, sugebančių praktiškai taip pat gaminti minėtą preparatą kaip ir minėti NCIMB 40221 ir NCIMB 40222 kamieniai, ir kuris sugeba delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65°C temperatūroje, kai pH yra mažiausiai 9.

Viename iš šio išradimo aspekto įgyvendinimų preparatas yra gaunamas aerobine fermentacija tinkamoje terpėje, kurioje yra gliukozės kaip anglies šaltinio, iš *Bacillus stearothermophilus* kamieno NCIMB 40222 mutantinio kamieno. Kitame šio išradimo įgyvendinime šio išradimo preparatas susideda iš fermento, sudaryto iš aminorūgščių sekos

-Lys-Asn-Ala-Asp-Ser-Tyr-Ala-Lys-Lys-Pro-His-Ile-Ser-Ala-

-Leu-Asn-Ala-Pro-Gln-Leu-Asn-Gln-Arg-Tyr-Lys-Asn-Glu-Phe-

-Thr-Ile-Gly-Ala-Ala-Val-Glu-Pro-Tyr-Gln-Leu-Gln-Asn-

arba jos homologo, visam fermentui pasižymint fermentiniu aktyvumu medienos masės terpėje. Šia prasme minėtos aminorūgščių sekos homologas yra homologinė seka, turinti keletą aminorūgščių pakaitalų, pratęsimų ar išbraukimų, dėl kurių viso fermento aktyvumas medienos terpėje neišnyksta. Be to, minėtos aminorūgščių sekos homologas yra bet kuri seka, kuri yra pakankamai homologiška nukleotidų lygyje, kad būtų atpažinta bet kokia DNR ar RNR praba, gauta iš minėtos sekos. Dar viename šio išradimo aspekto įgyvendinime preparatas yra nuskaidrintas kultūros buljonas. Dar kitame šio išradimo aspekto įgyvendinime preparatas yra dalinai išgryninta kultūros buljono frakcija, pasižyminti fermentiniu aktyvumu medienos terpėje. Dalinai išgryninta frakcija gaunama amonio sulfato nusodinimu. Tolesniame šio išradimo aspekto įgyvendinime preparatas yra labai gryna nuskaidrinto kultūros buljono frakcija, kuri gaunama, panaudojant katijonitą, kur minėta frakcija yra ksilanazės pasižyminčios fermentiniu aktyvumu medienos masės terpėje, pavidalo. Viename konkrečiame įgyvendinime ksilanazė turi apytikslę molekulinę masę tarp 41000 ir 42000 Daltonų, nustatytą SDS PAGE ir gelio filtracijos būdu, ir tokią apytikslę sudėtį, nustatytą kaip aminorūgščių liekanos/ molekulei aminorūgščių analizės būdu: Asx 58; Thr 12; Ser 10; Glx 44; Pro 24; Gly 20; Ala 30; Cys 1; Val 28; Met 2; Ile 26; Leu 14; Tyr 22; Phe 16; Lys 38; His 6; Arg 12.

Kitas šio išradimo aspektas yra skirtas preparato, pasižyminčio fermentiniu aktyvumu, gamybos būdui, kur *Bacillus stearothermophilus* kamienas, parinktas iš kamienų NCIMB 40221 ir NCIMB 40222 ir jų mutantų bei variantų, iš esmės sugebančių gaminti minėtą preparatą, kaip ir minėti kamieniai NCIMB 40221 ir NCIMB 40222, yra nukreipiamas aerobinei fermentacijai tinkamoje terpėje, minėtam preparatui sugebant

delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65°C temperatūroje, kai pH yra mažiausiai 9. Atskirame šio išradimo įgyvendinime mutantinis *Bacillus stearothermophilus* NCIMB 40222 kamienas yra nukreipiamas aerobinei fermentacijai tinkamoje terpėje, kurioje yra gliukozės kaip anglies šaltinio. Kitame šio išradimo aspekto įgyvendinime fermentacijos buljonas yra nuskaidrinamas paprastai centrifugavimo būdu. Dar viename įgyvendinime nuskaidrintas fermentacijos buljonas yra nukreipiamas amonio sulfato nusodinimui ir paprastai resuspensijai skystoje terpėje, kad būtų gauta dalinai išgryninta minėto nuskaidrinto kultūros buljono frakcija, pasižyminti fermentiniu aktyvumu medienos masės terpėje mažiausiai 65°C temperatūroje, kai pH yra mažiausiai 9. Tolesniame būdo pagal šį išradimą įgyvendinime nuskaidrintas fermentacijos buljonas yra gryninamas ir koncentruojamas, panaudojant katjonitą, kad būtų gauta labai gryna ksilanazės pavidalo frakcija, pasižyminti fermentiniu aktyvumu medienos masės terpėje mažiausiai 65°C temperatūroje, kai pH yra mažiausiai 9.

Dar vienas šio išradimo aspektas yra skirtas išskirtiems *Bacillus stearothermophilus* kamienams NCIMB 40221 ir NCIMB 40222 ir jų mutantams bei variantams, minėtiems mutantams bei variantams sugebant praktiškai taip pat gaminti preparatą, pasižymintį fermentiniu aktyvumu, kaip ir minėti kamienai NCIMB 40221 ir NCIMB 40222, minėtam preparatui pasižymint sugebėjimu delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65°C temperatūroje, kai pH yra mažiausiai 9.

Dar vienas išradimo aspektas yra skirtas procesui, apimančiam medienos masės apdorojimą, kur medienos masė yra apdorojama preparatu pagal šį išradimą bent vienoje stadijoje. Viename iš šio išradimo aspekto įgyvendinimų medienos masė, kuri turi būti apdorojama, yra sulfato masė. Kitame įgyvendinime sulfato masė, kuri turi būti apdorojama, yra dalinai delignifikuota sulfato masė. Dar viename šio išradimo aspekto įgyvendinime dalinai delignifikuota sulfato masė, kuri turi būti apdorojama,

yra deguonių delignifikuota sulfato masė. Procesas, apimantis medienos masės apdorojimą, yra tinkamai atliekamas mažiausiai 65°C temperatūroje, kai pH yra mažiausiai 9.

Papildomas šio išradimo aspektas yra skirtas produktams, gautiems iš medienos masės, kuri bent vienoje stadijoje buvo apdorota preparatu pagal šį išradimą. Tuo būdu, šis išradimo aspektas apima medienos masę ir susmulkintą celiuliozę, kurios bent vienoje stadijoje buvo apdorotos preparatu pagal šį išradimą, ir popierių, lentas bei dulkes, kurie buvo pagaminti iš medienos masės, bent vienoje stadijoje apdorotos preparatu pagal šį išradimą.

Tolesnis šio išradimo aspektas yra skirtas DNR arba RNR prabai, kuri atpažįsta nukleotidų seką, koduojančią aminorūgščių seką

-Lys-Asn-Ala-Asp-Ser-Tyr-Ala-Lys-Lys-Pro-His-Ile-Ser-Ala-

-Leu-Asn-Ala-Pro-Gln-Leu-Asn-Gln-Arg-Tyr-Lys-Asn-Glu-Phe-

-Thr-Ile-Gly-Ala-Ala-Val-Glu-Pro-Tyr-Gln-Leu-Gln-Asn-

Be to, vienas išradimo aspektas yra skirtas antikūnui, kuris prisijungia prie aminorūgščių sekos

-Lys-Asn-Ala-Asp-Ser-Tyr-Ala-Lys-Lys-Pro-His-Ile-Ser-Ala-

-Leu-Asn-Ala-Pro-Gln-Leu-Asn-Gln-Arg-Tyr-Lys-Asn-Glu-Phe-

-Thr-Ile-Gly-Ala-Ala-Val-Glu-Pro-Tyr-Gln-Leu-Gln-Asn-.

Pastarieji du išradimo aspektai yra naudingi fermentų, sugebančių delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65°C temperatūroje ir esant pH mažiausiai 9, suradimui.

Termostabilių fermentų, gaminančių organizmus, išskyrimas

Organizmų šaltinis buvo vandens ir purvo pavyzdžiai, paimti iš vandens valymo baseinų Korsnas medienos ir popieriaus fabrike (Gavle, Švedija). Praturtinimo terpėje (XM) buvo 0.01% mielių ekstrakto, 0.04% triptono ir 0,2% ksilano, esant pH 7.0. Toje pačioje terpėje, esant pH 8.1 ir 9.6, buvo papildomai Na₂CO₃. Vandens ir purvo pavyzdžiai buvo įdėti į XM terpę ir aerobiškai kultivuoti 65°C temperatūroje. Kultūrų pavyzdžiai buvo perkeliami į šviežią terpę kas 2-3 dienos. Po 4 perkėlimų, kultūrų pavyzdžiai buvo praskiesti ir paskirstyti ant XM agaro lėkštelių (XM turi 2% agaro).

Po trijų nepriklausomų praturtinimo procedūrų, buvo išskirta 30 kamienų, kurie galėjo augti ant MX agaro lėkštelių 65°C temperatūroje. Nė vienas kamienas nebuvo išskirtas iš XM terpės, esant pH 9.6. 10 iš 30 išskirtų kamienų aplink koloniją gamino ryškias zonas, leidžiančias manyti, kad jie gamina neląstelinę ksilanazę. Du iš šios dešimties išskirtų kamienų (kamienai T2 ir T6) buvo atrinkti deponavimui.

Mikroorganizmų deponavimas

Du kamienai, pavadinti *Bacillus sp* T-2 ir *Bacillus sp* T-6 buvo deponuoti pagal Budapešto sutartį National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Ltd (NCIMB), Aberdeen, 1989 m. lapkričio 3 d. kamienams T-2 ir T-6 buvo priskirti registracijos numeriai, atitinkamai NCIMB 40221 ir NCIMB 40222.

Kamienų T-2 ir T-6 identifikacija

Kamieniai T2 ir T6 yra aerobinės, gramteigiamos, sporas sudarančios lazdelės, galinčios augti 65°C temperatūroje. Šie kamieniai NCIMB laikomi skirtingais *Bacillus stearothermophilus* kamienais, remiantis tokiais bandymo rezultatais:

Bacillus- antros stadijos tyrimai

Izoliato Nr.	T2 (NCIMB 40221)	T6 (NCIMB 40222)
Tyrimo temp. °C	60°C	60°C
Sporos forma ^a	E	E
Sporinė ryškiai išsiplėtusi	-	-
Sporos padėties dominantė ^b	T	T
Anaerobinis augimas ^c	-	-
Augimas 5% NaCl	-	-
Augimas 7% NaCl	-	-
Augimas 10% NaCl	-	-
Augimas pH 5.7 buljone	-	-
Rūgštis iš gliukozės ^d	+	-
Dujos iš gliukozės ^d	-	-
VP(acetoinas)	-	-
Kiaušinio trynio agaro nepermatomumas	Neauga	Neauga
Kazeino suskaldymas	+	+

Izoliato Nr.	T2 (NCIMB 40221)	T6 (NCIMB 40222)
Želatinos suskaldymas	+	(+)
Eskulinas	+	-
Kraskmolo hidroze	+ ^R	+ ^R
NO ₃ ⁻ iki NO ₂ ⁻	-	-
Liekamasis N	-	-
Citratas, Koser'io	-	-
Dekstrozės azidas	-	-
pH VP buljone	5.5	6.3
Lakmuso pienas		
koaguliacija	-	-
rūgštinimas	-	-
Katalazė	+	+
Oksidazė	+	+
Augimo temperatūros °C		
25°C	-	-
37°C	-	-
65°C	+	+
70°C	-	-

^a E, elipsinė arba cilindrinė; S, sferinė arba beveik sferinė;

^b C, centrinė; T-terminalinė arba subterminalinė; CT, nuo centrinės iki terminalinės;

^c Gliukozės agarė;

^d Peptono vandens cukrus, Andrade'so indikatorius,

^R- ribotas.

Kamienų T2 ir T6 riebiųjų rūgščių sudėtis

Termofiliniai ksilanazės teigiami izoliatai T2 ir T6 buvo nusiųsti į Microbial ID, INC. Newark, DE, JAV - riebiųjų rūgščių sudėties nustatymui. Buvo gauti tokie rezultatai:

Ksilanazės teigiamų termofilų riebiųjų rūgščių sudėtis (%)

Izoliatas:	T2	T6
Riebioji rūgštis		
9:0	0.73	0.64
12:0		0.46
14:0 izo		
14:0	0.85	1.92
15:0 izo	44.41	46.2
15: anteizo	2.59	2.35
15:0		0.53
16: izo	6.25	4.15
16:1	4.24	5.53
16:0	5.29	6.14
17:1 izo H	2.41	2.6
17:0 izo	26.07	22.58
17:0 anteizo	7.15	5.82
18:0		1.09

Kamienų T2 ir T6 augimo charakteristikos ir koncentruotų nevalytų supernatantų paruošimas iš sukultūrintų kamienų

Augimo terpė: XMP terpė, kurioje yra g/l:

bevitamininės kazamino rūgštys, 4; mielių ekstraktas, 0.2; MgSO_4 , 0.01; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2; K_2HPO_4 , 0.46; KH_2PO_4 , 0.1; ksilozė, 5; MOPS (3-[N-morfolino] propano sulforūgštis), 10.4; ir kitų elementų pėdsakai. Terpės pH buvo 7.0.

Ksilanazės aktyvumas:

Ksilanazės aktyvumas buvo nustatytas, inkubuojant šviežią ksilano tirpalą su neląsteliniu supernatantiniu skysčiu ir tiriant padidėjimą redukciniame cukruje ferocianido metodu (Spiro, R.G. 1966, *Methods of Enzymology* 8: 7-9). Bandymo buferis buvo 50 mM Tris. Cl, pH 7.0 ir 0.5% ksilano (avižos speltos, Sigma). Ksilanazės aktyvumo vienetai yra μmol redukcinio cukraus, generuojamo per minutę 65°C temperatūroje.

Terpės ląstelių drumstumas:

Terpės ląstelės drumstumas pateiktas Klett vienetais. $\text{IKV}=0.004$ g sausos ląstelės masės (SLM)/litre. Jei kultūra pasiekia savo maksimalų tankį, ji yra linkusi lizuotis, ką parodė ryškus kultūros drumstumo sumažėjimas.

Kamienai T2 ir T6 buvo auginami XMP terpėje 24 valandas New Brunswick Microferm 7.5 litrų fermentatoriuje. Auginimas buvo atliekamas 4 litrų darbo tūryje 60°C temperatūroje, esant maišymo greičiui 600 aps/min. ir vėdinimo greičiui 7 l/min. Putojimas buvo reguliuojamas automatiškai, pridedant silicio priemonės prieš putojimą (5%, Fluka), o darbinis tūris buvo išlaikomas, pridedant sterilaus vandens. Pradinis

pasėlių drumstumas buvo 10 KV (0.04g SLM/l). Per pirmąsias 8 fermentacijos valandas ląstelių drumstumas kamienams T2 ir T6 išaugo atitinkamai iki 540 ir 700 KV. Po 24 valandų drumstumas išnyko.

Kultūros skystis buvo atšaldytas iki kambario temperatūros ir centrifuguotas (8000 g, 10 min., 20°C), kad būtų pašalintos ląstelės. Beląsteliniam supernatantui buvo 1.0-1.4 ir 2.0-2.4 ksilanazės vienetų ml atitinkamai kamienams T2 ir T6 bei apie 0.02 mg baltymo abiem kamienams. Baltymas buvo sukonzentruotas, pridedant prie supernatanto kieto amonio sulfato iki 80% prisotinimo 4°C temperatūroje ir centrifuguojant (9000 g, 15 min.) mišinį 12 valandų 4°C temperatūroje. Nuosėdos buvo ištirpintos bendrame 100 ml 10mM fosfato buferio su pH 7.0 tūryje ir triskart dializuotos prieš 5 litrus to paties buferio 4°C temperatūroje. Dializuotame tirpale (120 ml) buvo maždaug 7 mg/ml baltymo ir 15-20 bei 35-40 ksilanazės vienetų atitinkamai kamienams T2 ir T6.

Kamieno T6 augimas

Laikas (val.)	KV	Ksilanazė (V/ml)
0	10	nd
2	25	nd
4	140	nd
6	400	1.48
8	540	1.88
11	540	1.78
14	528	2.26
24.5	280	2.42

Kamieno T2 augimas

Laikas (val.)	KV	Ksilanazė (V/ml)
0	10	nd
2	30	nd
4	160	0.75
6	430	0.58
8	700	0.98
11	600	1.05
24	250	1.23

Reikėtų pastebėti, kad kamienų T2 ir T6 ksilanazės aktyvumas fermentacijos pabaigoje nesumažėjo.

Fermentas, pasižymintis fermentiniu aktyvumu pagal šį išradimą

Beląsteliniai supernatantai nuo T2 ir T6 kamienų augimo XMP terpėje turi mažiausiai vieną ksilanazę, kadangi buvo parodyta, kad jie pasižymi ksilanazės aktyvumu. Minėti supernatantai (taip pat vadinami nevalytais fermentiniais preparatais) ir dalinai išgrynintos frakcijos buvo panaudotos, apdorojant nebalintą ir deguonių pusiau išbalintą minkštos medienos sulfato masę.

Nebalintos ir deguonių pusiau išbalintos masės pavyzdžiai

Masės pavyzdžiai buvo minkštos medienos sulfato masės pavyzdžiai, paimti iš Korsnas fabriko.

Nebalintos medienos pavyzdys buvo pavyzdys, paimtas po šarminio apdorojimo Kamyr autoklave, laboriškai persijotas ir perpalutas, ir šis pavyzdys buvo per naktį džiovinamas 50°C temperatūroje. Pusiau sausas pavyzdys buvo panaudotas eksperimentuose ir buvo pažymėtas K8. Ši medžiaga buvo džiovinama 105°C temperatūroje iki pastovaus svorio, atiduodanti 6.35% vandens turinio.

Deguonių pusiau išbalintos masės pavyzdys buvo pavyzdys, apdorotas Korsnas pluošto 3 linijoje, ir buvo paimtas po antro apdorojimo deguonimi, laboriškai persijotas ir perplautas. Bendras medienos apdorojimas Korsnas fabrike aprašymas buvo atspausdintas 1989 m. spalio mėn., Paper 26, p. 20 ir Nordisk Cellulose 1989 No. 6, P.8-11. Deguonių pusiau išbalinta masė buvo pažymėta K11.

Masių K8 ir K11 lignino kiekis

Masių K8 ir K11 lignino kiekis buvo nustatytas pagal „The Swedish Association of the Pulp and Paper Engineers“, Series CCA5. K8 (nebalintos) lignino kiekis buvo 2.8% ir K11 (deguonių pusiau išbalintos) lignino kiekis buvo 2.0%. Tokiu būdu deguonių pusiau išbalintos masės K11 pavyzdys turėjo maždaug 25% mažesnį lignino kiekį negu K8.

Masių K8 ir K11 delignifikavimo eksperimentai, atlikti su nevalytais fermentų preparatais iš *Bacillus stearothermophilus* kamienų T2 ir T6

Norint nustatyti, kiek lignino padaryta ekstrahuojamu šio išradimo preparatu, buvo panaudotas jautrus spektrofotometrinis bandymas. Buvo matuoti pavyzdžių supernatantinių skysčių absorbcijos dydžiai, prie 350 nm (A_{350}), ir išmatuoti dydžiai pateikti kaip išskirto lignino %. Eksperimentai ir rezultatai susumuoti 1-5 lentelėse.

Pagal duomenis, pateiktus 1-5 lentelėse, gali būti padaryta išvada, kad nevalyti fermentų preparatai iš *Bacillus stearothermophilus* kamienų T2 ir T6 sugeba delignifikuoti ir išbalintą, ir pusiau išbalintą medienos masę, esant pH dydžiams mažiausiai 9, ir mažiausiai 65°C temperatūroje. Dar daugiau, gali būti padaryta išvada, kad išskirto lignino % priklauso tiek nuo laiko, tiek nuo koncentracijos.

1 lentelė

Lignino išskyrimo iš medienos masės K11 kaip nevalytų fermentinių preparatų iš *B.stearothermophilus* kamienų T2 ir T6^a funkcija

Fermentas, (mg/ml)	Išskirto lignino kiekis, % ^b	
	Bendras	Grynas
0	8	-
T2 (0.6)	14	6
T2 (0.8)	17	9
T2 (1.2)	20	12

Fermentas, (mg/ml)	Išskirto lignino kiekis, % ^b	
	Bendras	Grynas
T2 (1.9)	22	14
T6 (0.25)	16	8
T6 (0.5)	18	10
T6 (1.1)	19	11

^a Fermentiniai preparatai buvo amonio sulfato nuosėdos, ištirpintos 10 mM Fosfato buferyje, pH 9.0 iki galutinės baltymo koncentracijos kaip nustatyta. Kontrolė buvo 10mM fosfato buferis, pH 9.0. Masė K11 buvo 150 mg 3-juose ml.

^b Inkubacija vyko 18 val. 65°C temperatūroje, esant pH 9.0. Išskirto lignino kiekis % paremtas A_{350} ir patikslintas absorbcijai nevalyto fermento preparato atitinkamoje koncentracijoje.

2 lentelė

Lignino išskyrimo iš masės K11 nevalytu fermentiniu preparatu iš *B. stearothermophilus* kamienų T2 ir T6^a kinetika

Laikas, (val.)	Fermentas ^b	Išskirto lignino kiekis, %	
		Bendras	Grynas
2	T2	17	12
4	T2	23	18

Laikas, (val.)	Fermentas ^b	Išskirto lignino kiekis, %	
		Bendras	Grynas
18	T2	29	21
2	T6	12	5
4	T6	15	8
6	T6	17	9
18	T6	18	10

^a Eksperimentas buvo atliekamas, kaip aprašyta 1 lentelėje, 65°C temperatūroje ir esant pH 9.0.

^b Nevalyto fermento T2 ir T6 koncentracijos buvo atitinkamai 2.8 ir 1.5 mg baltymo/ml.

3 lentelė

Lignino išskyrimas nevalytu fermentiniu preparatu iš *B.stearothermophilus* kamienų T2 ir T6^a kaip temperatūros funkcija

Temperatūra	Fermentas ^b	Išskirto lignino kiekis %	
		Bendras	Grynas
53	T2	16	6
65	T2	19	9
75	T2	20	5

Temperatūra	Fermentas ^b	Išskirto lignino kiekis %	
		Bendras	Grynas
53	T6	15	5
65	T6	18	8
75	T6	20	5

^a Eksperimentas buvo atliekamas, kaip aprašyta 1 lentelėje, 65°C temperatūroje, esant pH 9.0.

^b Nevalytų fermentų T2 ir T6 koncentracija buvo atitinkamai 1.7 ir 0.7 mg baltymo/ml.

4 lentelė

Lignino išskyrimas iš masės K11 kaip pH^a funkcija

pH	Fermentas ^b	Išskirto lignino kiekis %	
		Bendras	Grynas
7	T2	14	6.4
8	T2	14	6.1
9	T2	17	7.7
10	T2	18	8.3
7	T6	13	4
8	T6	15	6
9	T6	19	9
10	T6	18	7
10.5	T6	18	6

^a Eksperimentas buvo atliekamas, kaip aprašyta 1 lentelėje, 65°C temperatūroje 18 valandų.

^b Nevalytų fermentinių preparatų T2 ir T6 koncentracijos buvo atitinkamai 1.7 ir 15 mg baltymo/ml.

5 lentelė

Lignino išskyrimas iš masės K8^a

Fermentinis preparatas	Koncentracija, (mg/ml)	Išskirto lignino kiekis, %	
		Bendras	Grynas
T2	0.8	16	5
T2	1.2	17	6
T2	1.6	20	9
T6	0.3	14	3
T6	0.6	15	4
T6	1.1	17	6

^a Eksperimentas buvo atliekamas, kaip aprašyta 1 lentelėje, 65°C temperatūroje, esant pH 9.0 18 valandų, naudojant K8 vietoj K11.

Labai išgrynintos frakcijos iš kamieno T6 kultūros preparatas

Nuskaidrinto buljono iš kamieno T6 kultūros labai išgryninta frakcija (ksilanazės pavidalo) yra gaunama, panaudojant katijonitą vienoje koncentracijos ir gryninimo stadijoje. Tokiu būdu, ksilanazė T6 buvo gryninama ir koncentruojama tiesiog iš beląstelinio supernatanto adsorbcija į katijonitą CM-52 (Whatman). Tačiau su XMP terpe regeneravimo išeiga buvo tik 21%, matyt, dėl didelės terpės joninio pajėgumo. Kada terpė buvo dializuota prieš mažo joninio pajėgumo buferį arba MOPS buvo išleista iš terpės, regeneravimo išeiga buvo maždaug 50%. Minimalaus CM-52 kiekio, reikalingo efektyviai adsorbcijai iš nuskaidrintos kultūros nustatymui buvo tiriami įvairūs CM-52 kiekiai ksilanazės T-6 gryninimui. Rezultatai pateikti 6 lentelėje.

6 lentelė

Ksilanazės T-6 adsorbcija su įvairiais CM-52 kiekiais

CM-52/bul- jonas, (g/g)	Frakcija	Tūris, (ml)	Ksilanazė, (V/ml)	Bendri vienetai	Išeiga, (%)
	Supernatantas	100	0.78	78.0	100.0
0.1	Ekstraktas	40	1.04	41.6	55.3
	Neadsorbuotas	100	0.055	5.5	7.0
0.05	Ekstraktas	30	1.3	39.9	50.0
	Neadsorbuotas	100	0.077	7.7	9.8
0.02	Ekstraktas	15	1.94	29.1	37.3

CM-52/bul-jonas, (g/g)	Frakcija	Tūris, (ml)	Ksilanazė, (V/ml)	Bendri vienetai	Išėiga, (%)
	Neadsorbuotas	100	0.16	16.0	20.5
0.01	Ekstraktas	14	2.05	28.7	36.8
	Neadsorbuotas	100	0.24	24.0	30.8

Kaip parodyta 6 lentelėje, esant 5% adsorbento, išėiga yra 50%. Kitas komerciškai prieinamas katijonitas yra SE-52 (Whatman) (neigiamos grupės yra sulfoksietilo, prijungto prie celiuliozės). Žinoma, kad SE-52 yra didesnės adsorbcinės talpos negu CM-52. Kadangi gryninimo stadija yra kartu ir koncentravimo stadija, yra naudinga panaudoti kiek įmanoma mažiau adsorbento. Todėl mes ksilanazės adsorbcijai išbandėme SE-52. Rezultatai pateikti 7 lentelėje.

7 lentelė

Ksilanazės T-6 adsorbcija su įvairiais kiekiais SE-52

CE-52/bul-jonas, (g/g)	Frakcija	Tūris, (ml)	Ksilanazė, (V/ml)	Bendri vienetai	Išėiga, (%)
	Supernatantas	100	1.41	141.0	100
0.05	Ekstraktas	30	2.4	72.0	51.1
0.02	Ekstraktas	21	3.2	67.8	48.0
0.01	Ekstraktas	20	2.9	58.0	41.1

Kaip parodyta 7 lentelėje, tik 2% SE-52 buvo sunaudoti ksilanazės T-6 48% regeneravimui.

Ksilanazės T-6 charakterizavimas

Ksilanazės T-6 molekulinė masė nustatyta SDS PAGE ir gelio filtracijos būdas, gauti dydžiai svyruoja tarp 41000 ir 42000 Daltonų. Faktas, kad abu metodai davė panašią MM (molekulinę masę), parodo, kad fermentas sudarytas iš vienos polipeptidinės grandinės (elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu (SDS PAGE) atskiria baltymo subvienetus). Fermento pI (pH, kur bendras baltymo krūvis yra lygus nuliui) buvo 9.0, nustatytas aukšto voltažo izoelektrinio fokusavimo būdu. Palyginti aukštas fermento pI paaiškina teigiamą fermento krūvį, esant neutraliam pH. Fermento optimalus pH buvo apie 7.0; esant pH 9.0, fermentas turėjo maždaug 50% jo pH 7.0 aktyvumo. Ksilanazės T-6 aktyvumo temperatūros profilis pateiktas 8 lentelėje.

8 lentelė

Ksilanazės T-6 aktyvumas, esant skirtingoms temperatūroms*

Temperatūra, °C	Santykinis aktyvumas, (%)
45	20
55	51
60	70
65	81
70	92
75	100
80	73
85	40

* Reakcijos laikas: 5 minutės

Ksilanazės T6 termostabilumas, esant 65°C temperatūrai ir pH 9, parodytas 9 lentelėje

9 lentelė

Ksilanazės T-6 termostabilumas, esant 65°C ir pH 9

Laikas, val.	Santykinis aktyvumas, (%)
0	100
0.25	82
0.5	78
1	75
2	72
4	63

Be to, galima paminėti, kad esant 65°C ir pH 7, per 10 val. nebuvo aptikta aktyvumo sumažėjimo.

Ksilanazės struktūrinių mutantų iš kamieno T-6 gavimas

Norėdami gauti mutantus, mes pasinaudojome tuo faktu, kad daugeliu atvejų ksilanazė ir ksilozidazė yra pavaldžios tai pačiai reguliacinei kontrolei (tas pats represorius). Kamienai, kurie gamina ksilozidazę, gali būti lengvai aptikti ant agarų lėkštelių su chromogeniniu p-nitrofenilo β-D-ksilopiranozido (ONPX) substratu. Tik struktūriniai mutantai ksilozidazei gamins ant agarų lėkštelių geltoną spalvą, kai nėra ksilozės. Norint gauti

ksilozidazės struktūrinius mutantus, ląstelės buvo mutagenizuotos MNNC (1-metil-3-nitro-1-nitrozoguanidinu) ir tuomet patalpintos ant agaro lėkštelių su ONPX be ksilozės. Maždaug viena iš penkių šimtų ląstelių gamino kolonijas, kurios ant agaro lėkštelių davė geltoną spalvą. Tokiu būdu buvo išskirti trisdešimt ksilozidazės struktūrinių mutantų ir visi jie buvo ir ksilanazės struktūriniai mutantai. Dviejų iš jų (M-7 ir M-28), augančių esant ksilozei ar gliukozei, augimas ir ksilanazės gaminimas yra pateikti 10 ir 11 lentelėse. Abiejose terpėse (XMP ir GMP) mutantų ir T-6 augimo greičiai buvo panašūs. Tačiau mutantai, palyginus su T-6, gamina žymiai daugiau ksilanazės XMP terpėje. GMP terpėje (gliukozė yra anglies šaltinis) kamienas T-6 negamina nustatomo ksilanazės kiekio tuo tarpu kai mutantai davė ksilanazės aktyvumo lygį. Kamieno M-7 ksilanazė buvo išgryninta ir pasižymėjo ksilanazei T-6 identiškomis savybėmis.

10 lentelė

Ksilanazės T-6 struktūrinių mutantų augimas ir ksilanazės gamyba XMP terpėje

Kamienas	Laikas, (val.)	Drumstumas, (KV)	Ksilanazė, (V/ml)
T6	0	10	-
T6	2	40	-
T6	4	150	0.5
T6	6	200	0.8
T6	12	310	2.1
T6	24	290	2.3
T6	30	270	-
M7	0	10	-

Kamienas	Laikas, (val.)	Drumstumas, (KV)	Ksilanazė, (V/ml)
M7	2	30	-
M7	4	190	0.9
M7	6	270	1.6
M7	12	350	2.1
M7	24	310	2.3
M7	30	310	-
M28	0	20	-
M28	1	20	-
M28	4	40	0.6
M28	6	120	2.0
M28	10	370	5.5
M28	24	320	7.2

11 lentelė

Ksilanazės T-6 struktūrinių mutantų augimas ir ksilanazės gamyba GMP terpėje

Kamienas	Laikas, (val.)	Drumstumas, (KV)	Ksilanazė, (V/ml)
T6	0	20	-
T6	2	30	0
T6	4	80	0.1
T6	6	230	0.1

Kamienas	Laikas, (val.)	Drumstumas, (KV)	Ksilanazė, (V/ml)
T6	8	340	0.1
T6	23	390	0.1
T6	32	370	-
M7	0	20	-
M7	2	70	0.3
M7	4	100	0.6
M7	6	310	1.1
M7	8	340	1.4
M7	23	330	2.2
M7	32	300	-
M28	0	20	-
M28	1	20	-
M28	4	30	0.1
M28	6	100	0.9
M28	8	190	1.7
M28	10	320	3.1
M28	23	330	4.8

Ksilanazės T-6 fragmento seka ir aminorūgščių sudėtis

Iš gana ilgos baltymo N-terminalinės aminorūgščių sekos dalies galima visiškai identifikuoti baltymą. Vieno ksilanazės T-6 fragmento seka buvo dukart nustatyta Weizman institute Izraelyje Taikomuoju biosistemų dujinės fazės mikrosekvenseriu ABI 475 A. Pirmas baltymo pavyzdys buvo

pirmiausiai elektra padengtas ant PVDF membranos (Millipore) ir davė 20 aminorūgščių. Antras baltymo pavyzdys buvo pirmiausiai išgrynintas Superose 12 FPLC kolonėlėje (Pharmacia) ir buvo pakankamas 41 aminorūgšties sekos gavimui.

Gauta tokia seka:

-Lys-Asn-Ala-Asp-Ser-Tyr-Ala-Lys-Lys-Pro-His-Ile-Ser-Ala-

-Leu-Asn-Ala-Pro-Gln-Leu-Asn-Gln-Arg-Tyr-Lys-Asn-Glu-Phe-

-Thr-Ile-Gly-Ala-Ala-Val-Glu-Pro-Tyr-Gln-Leu-Gln-Asn-

Tolesnei fermento charakteristikai aminorūgščių tyrimas buvo atliktas su išgryninta ksilanaze T-6. Šio tyrimo rezultatai pateikti 12 lentelėje.

12 lentelė

Ksilanazės T-6 aminorūgščių sudėtis

Pk Nr.	Skilimo laikas	Komponentės pavadinimas	Koncentracija (nmoliai)	Liekana/molekulei ^a
1	8.08	Asparagino rūgštis	4.705	58 ^b
2	9.76	Treoninas	0.831	12
3	10.45	Serinas	0.672	10
4	14.05	Glutamino rūgštis	3.639	44 ^c
5	15.52	Prolinas	1.950	24
6	18.80	Glicinas	1.64	20
7	19.84	Alaninas	2.439	30

Pk Nr.	Skilimo laikas	Komponentės pavadinimas	Koncentra- cija (nmoliai)	Liekana/mo- lekulei ^a
8	20.80	Cistinas	0.061	1
9	21.81	Valinas	2.23	28
10	23.60	Metioninas	0.15	2
11	24.64	Izoleucinas	2.064	26
12	25.39	Leucinas	1.027	14
13	28.75	Tirozinas	1.613	22
14	29.87	Fenilalaninas	1.269	16
15	38.37	Lizinas	3.124	38
16	39.95	Amoniakas	3.691	
17	42.63	Histidinas	0.560	6
18	48.05	Argininas	0.904	12

^a 42000 Daltonų molekulinės masės pagrindu; patikslinimai buvo atliekami nestabilioms aminorūgštims.

^b Asparagino rūgštis yra asparagino rūgšties ir asparagino (Asx) suma.

^c Glutamino rūgštis yra glutamino rūgšties ir glutamino (Glx) suma.

Eksperimentai, atlikti su fermentu medienos masėje K14

Masės pavyzdys K14 buvo deguonių pusiau išbalintos minkštos medienos masė iš Korsnas fabriko. Fermentas buvo išgryninta termofilinė ksilanazė T-6.

Buvo tirti įvairūs parametrai, veikiantys masės K14 delignifikacijos laipsnį.

Pluošto koncentracijos poveikis yra susumuotas 13 lentelėje.

13 lentelė

Pluošto koncentracijos poveikis apdorojimui ksilanaze*

Ksilanazė, (V/ml)	Pluoštas, (%)	Išskirto gryno lignino, (%)
5.1	4.7	4.9
5.1	2.5	6.6
20.4	4.7	9.3
20.4	2.5	11.8
15.0	1.0	15.0
40.8	2.5	13.9
45.0	1.0	16.7

* Sąlygos: pH 9.0, 65°C, 2 val., K14 masė: kontrolinis pavyzdys be fermento buvo atimamas kiekvienu atveju.

Kaip matyti iš 13 lentelės, mažinant pluošto koncentraciją nuo 4.7 iki 2.5 ir iki 1.0% sauso pluošto svorio, procesas stiprėja. Kadangi fermentinis apdorojimas atliekamas be maišymo, panašu, kad buvo per silpnas kontaktas tarp fermento ir netirpaus substrato. Dėl praktinių priežasčių mes pasirenkame dirbti su 2.5% koncentracijos pluoštu.

pH poveikis pateiktas 14 lentelėje.

14 lentelė

pH poveikis ksilanazės apdorojimui*

pH	Buferis	Išskirto gryno lignino, (%)
8.5	0.01 M Fosfatas	8.3
9.0		8.4
9.5		6.3
8.5	0.1 M Na ₂ SO ₄	10.9
9.0		10.2
9.5		8.2

* Sąlygos: 2.5% K14 masė, 15 V/ml ksilanazės, 2 val., 65°C.

Kaip matyti iš 14 lentelės, fermentas yra efektyviausias, esant pH 8.5-9.0, tiek kalio fosfate, tiek natrio sulfate. Ankstesni eksperimentai parodė mažą aktyvumą žemiau pH 8.0 ir aukščiau pH 9.5.

Na₂SO₄ koncentracijos poveikis yra pateiktas 15 lentelėje.

15 lentelė

Na₂SO₄ koncentracijos poveikis*

Na ₂ SO ₄ (M)	Išskirto gryno lignino, (%)
0	7.2
0.01	8.6
0.05	9.9
0.10	10.8
0.15	11.5
0.20	10.7

*Sąlygos: 2.5% masės K14, 10 V/ml ksilanazė, pH 9.0, 65°C, 2 val.

Apdorojimas buvo efektyvus nuo to, kai nebuvo pridėta Na₂SO₄, iki 0.2 M; optimalus aktyvumas prie 0.15 M Na₂SO₄.

Ksilanazės koncentracijos poveikis susumuotas 16 lentelėje.

16 lentelė

Lignino išskyrimas kaip ksilanazės koncentracijos funkcija*

Ksilanazė, (V/ml)	Buferis	Išskirtas ligninas (Klason'o %)
0	0.01 M K Fosfatas	0
5		8

Ksilanazė, (V/ml)	Buferis	Išskirtas ligninas (Klason'o %)
10		10
15		12
45		14
0	0.1 M Na ₂ SO ₄	0
5		12
10		13
15		14
45		16

* Sąlygos: 2,5% sauso pluošto K-14, 2 val., pH 9, 65°C.

Kaip matyti iš 16 lentelės, lignino išskyrimas priklausė nuo koncentracijos iki maždaug 15 V/ml tiek 0.1 M Na₂SO₄, tiek kalio fosfato buferyje. Didesnė fermento koncentracija arba ilgesnis inkubacijos periodas (4 val.) tik nežymiai padidino išskirtą gryną ligniną.

10 g ir 50 g apdorotos K14 masės pavyzdžių paruošimas tolesniems bandymams

10 g masės K14 pavyzdžių buvo apdoroti 15 V/ml ir 45 V/ml ksilanaze 2 val. ir 4 val. kartu su atitinkamais kontroliniais pavyzdžiais. Visi pavyzdžiai turėjo dublikatus. Visos inkubacijos buvo atliekamos, esant pH 9.0 ir 65°C. Lignino išskyrimo spektrometrinė analizė parodyta 17 lentelėje (fosfato buferis) ir 18 lentelėje (0.1 M Na₂SO₄). Išskirto lignino kiekis svyravo nuo 10.3 iki 14.9 % su 45 V/ml fermentu ir 4 val. inkubacijos periodais, gaunant

nežymiai didesnius dydžius negu prie 15 V/ml ir 2 val. Neseniai 50 g masės pavyzdžių buvo apdorota, naudojant dublikatus, papildomai analizei. Išskirto gryno lignino buvo 10.8% 13 V/ml fermento 2 val. ir atitinkamai 12.6% prie 15 V/ml 4 val.

17 lentelė

10 g masės K14 apdorojimas ksilanaze fosfato buferyje*

Ksilanazė, (V/ml)	Laikas, (val.)	Išskirtas ligninas (%)	
		Bendras	Grynas
0	2	5.3	0
15	2	15.6	10.3
45	2	17.9	12.6
0	4	6.3	0
15	4	17.4	11.1
45	4	20.1	13.8

*Sąlygos: 2.5% masė K14, pH 9.5, 65°C; vidurkis pagal 2 eksperimentus.

18 lentelė

10 g masės K14 apdorojimas ksilanaze 0.1 M Na₂SO₄

Ksilanazė, (V/ml)	Laikas, (val.)	Išskirtas ligninas, (%)	
		Bendras	Grynas
0	2	5.9	0
15	2	17.6	11.7
45	2	19.8	13.9
0	4	7.0	0
15	4	19.4	12.4
45	4	21.9	14.9

*Sąlygos kaip 17 lentelėje.

Ksilanaze apdorotų 10 g pavyzdžių analizė

Analizės rezultatai yra susumuoti 19-23 lentelėse. Parametrai, pateikti lentelėse, buvo matuoti pagal SCAN bandymų serijas, išskyrus nulinio žingsnio dydžius, kurie buvo matuojami pagal gamintojų (Pulmac Instruments Ltd., Kanada) instrukcijas. 19 lentelėje pateikti duomenys, gauti panaudojant masę, kuri buvo apdorota 2 valandas 65°C temperatūroje, pH 9.0, 0.1 M Na₂SO₄, be fermento (kontrolinis pvz.) ir su 15 V/ml fermento. Kaip galima matyti, buvo puikus atgaminimas su dublikatų pavyzdžiais, paruoštais kas 2 savaitių intervalai. Didžiausias poveikis buvo pentozano kiekiui, kuris sumažėjo 17.4% Buvo nedideli, bet

patikimi Kapa skaičių bei tamprumo indeksų sumažėjimai, ir ryškumo, klampumo bei nulinio žingsnio dydžių padidėjimai.

Aukščiau minėtų savybių dydžiai medienos masei arba lakštams, padarytiems iš masės, nebuvo labai skirtingi, naudojant fermentus 15 V/ml bei 45 V/ml, apdorojant 2 val. ir 4 val., ir naudojant 0.01 M kalio fosfatą bei 0.1 M Na₂SO₄ (20 ir 21 lentelės).

Šių duomenų reikšmingumo analizė, medienos masės ir popieriaus savybės yra pateiktos 22 ir 23 lentelėse kaip procentiniai pasikeitimai, palyginus su atitinkamais kontroliniais pavyzdžiais.

Daromos tokios išvados:

1. Pentozanai yra dalinai išskirti (10.4-22.2%); didesni fermento kiekiai išskiria daugiau pentozanų.
2. Yra mažas, bet reikšmingas klampumo padidėjimas; tai gali būti paaiškinta pentozanų išskyrimu (apie 1% K14 sausos masės). Nepastebima celiuliozės skilimo netgi esant didžiausioms fermento koncentracijoms, 4 val. 65°C temperatūroje, pH 9.
3. Kapa skaičius mažėjo visose aštuoniose tirtose sąlygose (ribos: 5.5-9.1%). Kai šie dydžiai toliau nemažėja prie didesnių fermento koncentracijų (tada, kai pentozanai buvo), didesni fermento kiekiai pasirodė išskiriantys pentozanus, kurie nebuvo prijungti prie lignino.
4. Visose aštuoniose tikrintose sąlygose masės lakštai parodė nedidelį ryškumo ir nulinio žingsnio dydžių padidėjimą ir tamprumo indeksų sumažėjimą.

19 lentelė

Masės K14 apdorojimas ksilanaze*

Parametras	Kontr. pvz.	Naudotas fermentas	Vidutinis pasikeitimas, (%)
Kapa skaič.	17.3, 16.8	16.0, 15.5	-7.6, (± 0.1)
Klumpumas (dm ³ /kg)	1066, 1045	1072, 1039	+0.8, (± 0.1)
Pentozanas (%)	9.1, 9.3	7.7, 7.5	-17.4 (± 1.8)
<u>Lakštai (75g/m²)</u>			
Ryškumas (% ISO)	32.3, 32.8	33.4, 33.8	+2.9, (± 0.1)
Tamprumo indeksas (Nm/g)	20.9, 20.4	19.0, 19.3	-7.2, (± 1.8)
Nulinio žingsnis (drėgnas) (Nm/g)	95.2, 97.8	101.5, 104.3	+6.3, (± 0.3)

*Sąlygos: 15 V/ml fermentas, pH 9.0, 2 val., 0.1 M Na₂SO₄.

20 lentelė

Masės K14 apdorojimas ksilanaze 0.1 M Na₂SO₄*

Para-	0/ml	15 V/ml	45 V/ml	0/ml	15 V/ml	45 V/ml
metras	2v.	2v.	2v.	4v.	4v.	4v.
Kapa	17.1	15.8	16.0	17.0	15.4	15.8
Klam-	1055	1066	1072	1061	1075	1075
pumas						
Pento-	9.20	7.6	7.3	9.0	7.5	7.0
zanas						
Ryšku-	32.6	33.6	34.1	32.6	34.1	34.4
mas						
Tampru-	20.7	19.2	20.7	21.2	19.6	19.8
mas						
Nulinis	97	103	104	100	104	103
žingsnis						

*Vidurkis iš dviejų eksperimentų: sąlygos kaip 19 lentelėje.

21 lentelė

Masės K14 apdorojimas ksilanaze 0.01 fosfato buferyje*

Para-	0/ml	15 V/ml	45 V/ml	0/ml	15 V/ml	45 V/ml
metras	2v.	2v.	2v.	4v.	4v.	4v.
Kapa	17.0	15.9	16.0	17.2	16.0	16.2
Klam-	1065	1073	1076	1060	1070	1073
pumas						
Pento-	9.10	8.2	7.4	9.0	7.9	7.4
zanas						
Ryšku-	31.8	33.2	33.6	32.6	33.2	33.7
mas						
Tampru-	21.0	19.2	20.4	20.9	19.4	20.3
mas						
Nulinis	101	101	107	99	102	104
žingsnis						

*Vidurkis iš dviejų eksperimentų.

22 lentelė

Masės K14 apdorojimas ksilanaze*

Parametras	Pasikeitimas, (%)			
	15 V/ml	15/ml	45 V/ml	45 V/ml
Kapa	-7.6	-9.1	-5.9	-7.1
Klampumas	+0.8	+1.4	+1.5	+1.4
Pentozanas	-17.4	-16.5	-20.6	-22.2
Ryškumas	+2.9	+4.4	+4.7	+5.3
Tamprumas	-7.2	-7.5	-6.8	-6.4
Nulinis žingsnis	+6.3	+3.7	+7.1	+3.0

* 0.1 M Na₂SO₄ ; duomenys iš 20 lentelės.

23 lentelė

Masės K14 apdorojimas ksilanaze*

Parametras	Pasikeitimas, (%)			
	15 V/ml	15/ml	45 V/ml	45 V/ml
Kapa	-7.3	-7.0	-6.7	-5.5
Klampumas	+0.8	+0.9	+1.0	+1.2
Pentozanas	-10.4	-12.7	-20.7	-18.4

Parametras	Pasikeitimas, (%)			
	15 V/ml	15/ml	45 V/ml	45 V/ml
Ryškumas	+4.3	+2.8	+5.3	+3.2
Tamprumas	-8.8	-7.4	-3.3	-2.9
Nulinis žingsnis	-0.7	+8.3	+5.8	+5.2

* 0.1 M fosfatas; duomenys iš 21 lentelės.

Balinimo bandymas

Masė K14 su Kapa skaičiumi 18.5 buvo panaudota tirti apdorojimo fermentu poveikį balinimui. Masė K14 buvo apdorota fermentu, kurio koncentracija 15 V/ml ksilanazės, pagamintos iš kamieno T-6. Po fermentinio apdorojimo masė buvo balinama su balinimo seka, naudojama Korsnas fabrike: Chloro dioksidas (D0)- šarminė ekstrakcija, sustiprinta deguoniu (E0)- Chloro dioksidas (D1)- chloro dioksidas (D2).

Fermentinis apdorojimas sumažino lignino masės kiekį iki Kapa skaičiaus 15.9. Masė, apdorota tuo pačiu būdu, kaip fermentu apdorota masė, t.y. 65°C temperatūroje, pH 9, 100 mM Na₂SO₄ buferyje, bet ne pridėjus fermentų, buvo delignifikuojama iki Kapa skaičiaus 17.2. Tikrasis fermentinio apdorojimo poveikis buvo delignifikacija nuo Kapa sk. 17.2 iki 15.9, t.y. 8% delignifikacija.

Masė, apdorota fermentais sulfato buferio sistemoje, sunaudojo 47 kg chloro dioksido (aktyvaus chloro)/masės tonai, kai buvo balinama iki 83% ryškumo su balinimo seka D0 (E0) D1D2. Atitinkamas suvartojimas tiksliai buferiu apdorotai masei buvo 59 kg chloro dioksido (Cl)/masės tonai, t.y. fermentu apdorota masė sunaudojo 20% mažiau chloro dioksido.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Preparatas, pasižymintis fermentiniu aktyvumu, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis gaunamas iš *Bacillus stearothermophilus* kamieno, parinkto iš kamienų NCIMB 40221 ir NCIMB 40222 bei jų mutantų ir variantų, sugebančių iš esmės taip pat gaminti minėtą preparatą, kaip minėti kamienai NCIMB 40221 ir NCIMB 40222, aerobine fermentacija tinkamoje terpėje ir sugeba delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65°C temperatūroje ir esant pH mažiausiai 9.

2. Preparatas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas preparatas gaunamas iš mutantinio *Bacillus stearothermophilus* kamieno NCIMB 40222 aerobine fermentacija tinkamoje terpėje, turinčioje gliukozės kaip anglies šaltinio.

3. Preparatas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas preparatas susideda iš fermento, apimančio aminorūgščių seką

-Lys-Asn-Ala-Asp-Ser-Tyr-Ala-Lys-Lys-Pro-His-Ile-Ser-Ala-

-Leu-Asn-Ala-Pro-Gln-Leu-Asn-Gln-Arg-Tyr-Lys-Asn-Glu-Phe-

-Thr-Ile-Gly-Ala-Ala-Val-Glu-Pro-Tyr-Gln-Leu-Gln-Asn-

arba jos homologą, visam fermentui parodant aktyvumą medienos masės terpėje.

4. Preparatas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas preparatas yra labai išgryninta kultūros buljono frakcija, gaunama

panaudojant katijonitą, minėtai frakcijai esant ksilanazės formoje, parodančiai fermentinį aktyvumą medienos masės terpėje.

5. Preparatas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta ksilanazė turi apytikslę molekulinę masę tarp 41000 ir 42000 Daltonų, nustatytą elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu (SDS PAGE) bei gelių filtracija, ir tokią apytikslę aminorūgščių sudėtį, nustatytą aminorūgščių analize kaip aminorūgšties liekanos/ molekulei:

Asx 58; Thr 12; Ser 10; Glx 44; Pro 24; Gly 20; Ala 30; Cys 1; Val 28; Met 2; Ile 26; Leu 14; Tyr 22; Phe 16; Lys 38; His 6; Arg 12.

6. Preparato, pasižyminčio fermentiniu aktyvumu, gavimo būdas, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad *Bacillus stearothermophilus* kamieną, parinktą iš kamienų NCIMB 40221 ir NCIMB 40222 bei jų mutantų ir variantų, sugebantį iš esmės taip pat gaminti minėtą peparatą, kaip minėti kamienai NCIMB 40221 ir NCIMB 40222, nukreipia aerobinei fermentacijai tinkamoje terpėje, minėtam preparatui sugebant delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65°C temperatūroje, esant pH mažiausiai 9.

7. Būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad *Bacillus stearothermophilus* kamieno NCIMB 40222 mutantinį kamieną nukreipia aerobinei fermentacijai tinkamoje terpėje, turinčioje gliukozės kaip anglies šaltinio.

8. Išskirti *Bacillus stearothermophilus* kamienai NCIMB 40221 ir NCIMB 40222 bei jų mutantai ir variantai, minėtiems mutantams ir variantams iš esmės taip pat sugebant gaminti preparatą, pasižymintį fermentiniu aktyvumu, kaip ir minėti kamienai NCIMB 40221 ir NCIMB 40222, o

minėtas preparatas sugeba delignifikuoti medienos masę mažiausiai 65°C temperatūroje, esant pH mažiausiai 9.

9. Būdas, susidedantis iš medienos masės apdorojimo, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad medienos masę bent vienoje stadijoje apdoroja preparatu pagal bet kurį iš 1-5 punktų.

10. Medienos masė, susmulkinta celiuliozė, popierius, lentos bei dulkės, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie padaryti iš medienos masės, kuri bent vienoje stadijoje apdorota preparatu pagal bet kurį iš 1-5 punktų.