

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **227785**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **404539**

(51) Int.Cl.

**C12P 1/02 (2006.01)**

**C12N 9/02 (2006.01)**

**C12R 1/785 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **02.07.2013**

(54)

**Sposób otrzymywania preparatu enzymów oksydoredukcyjnych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**05.01.2015 BUP 01/15**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**31.01.2018 WUP 01/18**

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**TADEUSZ ANTCZAK, Łódź, PL**

**ALICJA KACZMAREK, Zduńska Wola, PL**

**RITA PYĆ, Łódź, PL**

**MIROŚLAWA SZCZĘSNA-ANTCZAK, Łódź, PL**

**TOMASZ RAMIĘGA, Łódź, PL**

**RADOSŁAW WĄCHAŁA, Włocławek, PL**

**MILENA STĘPCZYŃSKA, Ozorków, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska**

**PL 227785 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania preparatu enzymów oksydoredukcyjnych, zawierającego lakazy, peroksydazy ligninowe i peroksydazy manganozależne.

W czasopiśmie *Enzyme and Microbial Technology* 46 (2010) 32–37 ujawniono otrzymywanie preparatu enzymatycznego lakaz, peroksydaz Mn-zależnych i peroksydaz ligninowych z szczepu *Mucor racemosus* CBMA1847 w hodowli w podłożu ciekłym zawierającym bulion z ekstraktem słodowym i chlorek sodu.

Z czasopisma *African Journal of Microbiology Research* 4 (2010) 1808–1813 znany jest sposób otrzymywania preparatu lakaz w drodze hodowli wgłębnej szczepu grzyba strzępkowego *Mucor muce* do w podłożu zawierającym bulion ziemniaczano-glukozowy.

W czasopiśmie *Journal of Applied Microbiology* 97 (2004) 640–646 opisany został sposób otrzymywania preparatu enzymatycznego lakaz w hodowli wgłębnej szczepu *Mucor circinelloides* v. *Tieghen* w podłożu ciekłym zawierającym ekstrakt drożdżowy i bulion ziemniaczano-glukozowy.

W kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej znajduje się, wyodrębniony ze środowiska naturalnego – ze ściółki lasu iglastego, szczep grzyba nitkowatego *Mucor hiemalis* oznaczony symbolem AK 1211, należący do klasy *Zygomycetes* (Sprzężniaków), rzędu *Mucorales*, rodziny *Mucoraceae* i rodzaju *Mucor*, wykazujący zdolność wzrostu w temperaturze 4–35°C, cechujący się szczególnie szybkim wzrostem w temperaturze 28°C obficie rosnąc na agarze brzęczkowym i już po 3 dniach pokrywając się gęstą masą puszystej grzybni o barwie jasnożółtej, ciemniejącej podczas jej starzenia się, zbudowanej z wielojądrowych strzępek wytwarzających liczne nieznacznie rozgałęzione wieloosiowo sporangiofory z osadzonymi na końcach sporangiami, których ściana podczas dojrzewania rozpuszcza się uwalniając elipsoidalne sporangiospory (zarodniki, o średnicy 12–14 µm) zdolne w sprzyjających dla wzrostu warunkach do natychmiastowego kiełkowania. Szczep ten nadto jest prototrofem, szybko i obficie rozwija się na pożywkach zawierających nieorganiczne źródła azotu, w tym jony amonowe zawarte w (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> i/lub azotanowe w NaNO<sub>3</sub> lub źródło azotu organicznego (mocznik, ekstrakt drożdżowy, peptobak), jako źródło węgla wykorzystuje monosacharydy (heksozy i pentozy, a najlepiej glukozę), disacharydy (sacharozę).

Sposób otrzymywania preparatu enzymów oksydoredukcyjnych, zawierającego lakazy, peroksydazy ligninowe i peroksydazy manganozależne, w drodze hodowli szczepu grzyba z rodzaju *Mucor*, polegający na hodowli materiału posiewowego na wysterylizowanym podłożu zawierającym brzeczkę słodową, zaszczepieniu tym materiałem wysterylizowanego ciekłego podłoża produkcyjnego i prowadzeniu hodowli produkcyjnej wgłębnej w warunkach sterylnych i po jej zakończeniu wyodrębnieniu i zagęszczeniu otrzymanej cieczy pohodowlanej, według wynalazku charakteryzuje się tym, że stosuje się szczep grzyba nitkowatego *Mucor hiemalis* AK 1211, z którego sporządza się materiał posiewowy na, wysterylizowanym w temperaturze 118–122°C w czasie 20 minut, podłożu stałym zawierającym na 1000 części wagowych brzeczeki słodowej o stężeniu 8,5°Bx 20 części wagowych agaru lub 20 części wagowych agaru i 0,6–0,8 części wagowych gwajakolu, bądź 20 części wagowych agaru, 2–3 części wagowych ligniny alkalicznej i 0,6–0,8 części wagowych gwajakolu, w temperaturze 28–32°C w czasie 3–5 dni. Następnie, zmywa się skos agarowy 0,89% roztworem chlorku sodowego i tak przygotowanym materiałem posiewowym szczepi się, wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, ciekłe podłoże produkcyjne zawierające w 1000 ml wody destylowanej 5–15 g glukozy, 0,5–1,0 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 0,122–0,366 g siarczanu (VI) magnezu, 0,05–0,15 g chlorku wapnia, 1,36–4,1 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 1,5–3 g azotanu (V) amonu, 2,81–4,212 mg siarczanu (VI) cynku, 0,25–0,5 g chlorku potasu, 1,6–4,79 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 20,1–40,21 mg siarczanu (VI) manganu (II), 1,37–4,14 mg siarczanu (VI) kobaltu, 4,71–7,1 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 4,5–5,0, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzi hodowlę wstrząsaną na wytrząsarce przy szybkości obrotowej 150–220 min<sup>-1</sup>, przy stopniu wypełnienia kolb 15–25%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 168–252 godzin. Otrzymaną ciecz pohodowlaną oddziela się poprzez sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymany przesącz zagęszcza się pod próżnią w temperaturze 25°C.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

### Przykład 1

Szczep *Mucor hiemalis* AK1211 uaktywniano w czasie 4 dni w temperaturze 30°C na wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzeczeki słodowej o stężeniu 8,5° Bx i 20 części wagowych agaru, po czym sporządzono zawie-

sinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 15 g glukozy, 0,500 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 122,2 g siarczanu (VI) magnezu, 150 mg chlorku wapnia, 4,1 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 1,5 g azotanu (V) amonu, 4,212 mg siarczanu (VI) cynku, 250 mg chlorku potasu, 1,6 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 20,1 mg siarczanu (VI) manganu (II), 1,38 mg siarczanu (VI) kobaltu, 7,06 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 5,0, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 180 minut<sup>-1</sup>, przy stopniu wypełnienia kolb 15%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 252 godzin. Ciecz pohodowlaną otrzymaną w wyniku hodowli przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem przez lejek Schotta ze spiekami szklanym G3. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 820,2, peroksydaz ligninowych – 15,7, peroksydaz manganozależnych – 4,7.

#### Przykład 2

Szczep *Mucor hiemalis* AK1211 uaktywniano w czasie 5 dni w temperaturze 28°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzożki słodowej o stężeniu 8,5 °Bx i 20 części wagowych agaru, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 11,77 g glukozy, 0,86 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 273,21 mg siarczanu (VI) magnezu, 91,69 mg chlorku wapnia, 2,96 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 2,69 g azotanu (V) amonu, 3,12 mg siarczanu (VI) cynku, 0,457 g chlorku potasu, 3,27 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 36,69 mg siarczanu (VI) manganu (II), 3,05 mg siarczanu (VI) kobaltu, 5,02 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 4,62, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 150 minut<sup>-1</sup>, przy stopniu napełnienia kolb 25%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 210 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 1379,4, peroksydaz ligninowych – 31,4, peroksydaz manganozależnych – 4,1.

#### Przykład 3

Szczep *Mucor hiemalis* AK1211 uaktywniano w czasie 4 dni w temperaturze 28°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzożki słodowej o stężeniu 8,5 °Bx, 20 części wagowych agaru i 0,8 części wagowych gwajakolu, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy za pomocą 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym, stosowanym w ilości 1 ml na 100 ml podłoża, zaszczepiono uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej: 13,54 g glukozy, 0,725 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 302,03 mg siarczanu (VI) magnezu, 83,38 mg chlorku wapnia, 3,19 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 2,38 g azotanu (V) amonu, 3,42 mg siarczanu (VI) cynku, 0,414 g chlorku potasu, 3,35 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 33,17 mg siarczanu (VI) manganu (II), 3,34 mg siarczanu (VI) kobaltu, 5,28 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 4,72, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 220 min<sup>-1</sup>, przy stopniu wypełnienia kolb 20%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 252 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 2931,6, peroksydaz ligninowych – 2,5, peroksydaz manganozależnych – 1,11.

#### Przykład 4

Szczep *Mucor hiemalis* AK1211 uaktywniano w czasie 5 dni w temperaturze 28°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzożki słodowej o stężeniu 8,5° Bx, 0,6 części wagowych gwajakolu i 20 części wagowych agaru, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 12,83 g glukozy, 0,78 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 290,5 mg siarczanu (VI) magnezu, 88,36 mg chlorku wapnia, 3,1 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 2,51 g azotanu (V) amonu, 3,3 mg siarczanu (VI) cynku, 0,431 g chlorku potasu, 3,32 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 34,48 mg siarczanu (VI) manganu (II), 3,23 mg siarczanu (VI) kobaltu, 5,21 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 4,69, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę

wstrząsaną przy szybkości obrotowej 150 minut<sup>-1</sup>, przy stopniu wypełnienia kolb 15%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 235 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 2130, peroksydaz ligninowych – 4,2, peroksydaz manganozależnych – 4,8.

#### Przykład 5

Szczep *Mucor hiemalis* AK1211 uaktywniano w czasie 3 dni w temperaturze 32°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzezki słodowej o stężeniu 8,5° Bx, 0,6 części wagowych gwajakolu i 20 części wagowych agaru, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 15 g glukozy, 0,5 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 122,2 mg siarczanu (VI) magnezu, 150 mg chlorku wapnia, 4,1 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 1,5 g azotanu (V) amonu, 3,95 mg siarczanu (VI) cynku, 0,25 g chlorku potasu, 4,79 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 20,10 mg siarczanu (VI) manganu (II), 4,14 mg siarczanu (VI) kobaltu, 7,06 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 5,0, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża, i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 180 minut<sup>-1</sup>, przy stopniu wypełnienia kolb 20%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 252 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 820,2, peroksydaz ligninowych – 10,72, peroksydaz manganozależnych – 0,95.

#### Przykład 6

Szczep *Mucor hiemalis* AK1211 uaktywniano w czasie 5 dni w temperaturze 30°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzezki słodowej o stężeniu 8,5° Bx, 2 części wagowe ligniny alkalicznej, 0,6 części wagowych gwajakolu i 20 części wagowych agaru, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 5 g glukozy, 0,5 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 366,6 mg siarczanu (VI) magnezu, 50 mg chlorku wapnia, 1,36 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 1,5 g azotanu (V) amonu, 3,95 mg siarczanu (VI) cynku, 0,25 g chlorku potasu, 1,6 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 20,1 mg siarczanu (VI) manganu (II), 1,37 mg siarczanu (VI) kobaltu, 7,1 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 5,0, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 180 minut<sup>-1</sup>, przy stopniu wypełnienia kolb 10%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 252 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 660, peroksydaz ligninowych – 2,39, peroksydaz manganozależnych – 44,69.

#### Przykład 7

Szczep *Mucor hiemalis* AK1211 uaktywniano w czasie 3 dni w temperaturze 32°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzezki słodowej o stężeniu 8,5° Bx, 20 części wagowych agaru, 3 części wagowe ligniny alkalicznej i 0,8 części wagowych gwajakolu, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 10 g glukozy, 1 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 244,4 mg siarczanu (VI) magnezu, 0,1 g chlorku wapnia, 2,73 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 3 g azotanu (V) amonu, 2,81 mg siarczanu (VI) cynku, 0,5 g chlorku potasu, 3,2 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 40,21 mg siarczanu (VI) manganu (II), 2,69 mg siarczanu (VI) kobaltu, 4,71 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 4,5, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 180 min<sup>-1</sup>, przy stopniu wypełnienia kolb 20%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 168 godzin. Ciecz pohodowlaną otrzymaną w wyniku hodowli przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem przez lejek Schotta ze spiekem szklanym G3 i zagęszczono 20-krotnie w obrotowej wyparce próżniowej w temperaturze 25°C przy szybkości obrotowej wyparki 90 min<sup>-1</sup>.

Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 12361,2, peroksydaz ligninowych – 92,7, peroksydaz manganozależnych – 33,6.

## Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób otrzymywania preparatu enzymów oksydoredukcyjnych, zawierającego lakazy, peroksydazy ligninowe i peroksydazy manganozależne, w drodze hodowli szczepu grzyba z rodzaju *Mucor*, polegający na hodowli materiału posiewowego na wysterylizowanym podłożu zawierającym brzeczkę słodową, zaszczepieniu tym materiałem wysterylizowanego ciekłego podłoża produkcyjnego i prowadzeniu hodowli produkcyjnej wgłębniej w warunkach sterylnych i po jej zakończeniu wyodrębnieniu i zagęszczeniu otrzymanej cieczy pohodowlanej, **znamienny tym**, że stosuje się szczep grzyba nitkowatego *Mucor hiemalis* AK1211, z którego sporządza się materiał posiewowy na, wysterylizowanym w temperaturze 118–122°C w czasie 20 minut, podłożu stałym zawierającym na 1000 części wagowych breczki słodowej o stężeniu 8,5° Bx 20 części wagowych agaru lub 20 części wagowych agaru i 0,6–0,8 części wagowych gwajakolu, bądź 20 części wagowych agaru, 2–3 części wagowych ligniny alkalicznej i 0,6–0,8 części wagowych gwajakolu, w temperaturze 28–32°C w czasie 3–5 dni, następnie zmywa się skos agarowy 0,89% roztworem chlorku sodowego i tak przygotowanym materiałem posiewowym szczepi się, wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, ciekłe podłoże produkcyjne zawierające w 1000 ml wody destylowanej 5–15 g glukozy, 0,5–1,0 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 0,122–0,366 g siarczanu (VI) magnezu, 0,05–0,15 mg chlorku wapnia, 1,36–4,1 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 1,5–3 g azotanu (V) amonu, 2,81–4,21 mg siarczanu (VI) cynku, 0,25–0,5 g chlorku potasu, 1,6–4,79 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 20,1–40,21 mg siarczanu (VI) manganu (II), 1,37–4,14 mg siarczanu (VI) kobaltu, 4,71–7,1 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 4,5–5,0, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzi hodowlę wstrząsaną na wstrząsarce przy szybkości obrotowej 150–220 min<sup>-1</sup>, przy stopniu wypełnienia kolb 15–25%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 168–252 godzin, a otrzymaną ciecz pohodowlaną oddziela się poprzez sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymany przesącz zagęszcza się pod próżnią w temperaturze 25°C.

