

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY 93 902 PATENTU TYMCZASOWEGO

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 17.09.75 (P. 183377)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 31.07.76

Opis patentowy opublikowano: 15.12.1977

MKP C12d 13/10

Int. Cl. C12D 13/10

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Jadwiga Skiba, Krystyna Stachowicz, Janina Malanowska

Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Fermentacyjnego,
Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania enzymów, zwłaszcza proteolitycznych

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania enzymów, zwłaszcza proteolitycznych, na drodze biosyntezy za pomocą grzybów nitkowatych z rodzaju *Aspergillus*, mających zastosowanie między innymi: w przemyśle piwowarskim, piekarniczym, paszowym, rybny, farmaceutycznym, garbarskim.

Enzymy proteolityczne stanowią kompleks, składający się głównie z proteinaz i peptydaz, i należą do grupy hydrolaz, katalizujących wiązania peptydowe.

Znane są sposoby wytwarzania enzymów na drodze biosyntezy metodą hodowli powierzchniowej i węgłębnej, przy czym coraz częściej stosuje się metodę węgłębną.

Według znanych metod hodowli węgłębnej pożywkę, zawierającą źródła węgla, azotu oraz sole mineralne, sterylizuje się pod ciśnieniem na przykład w fermentorach, a następnie chłodzi do temperatury optymalnej dla rozwoju użytego organizmu, po czym szczepi przygotowanym uprzednio inoculum i prowadzi się biosyntezę przy stałym napowietrzaniu i mieszaniu środowiska hodowlanego.

Pożywki ciekłe, stosowane do biosyntezy enzymów proteolitycznych metodą węgłębną, zawierają zwykle jako źródło węgla: otręby pszenne lub ryżowe, melasę, a jako źródło azotu: ekstrakty kukurydziane, drożdżowe lub mięsne, mąkę rybną, mocznik, peptony i kietki jęczmienne.

I tak na przykład według sposobu, opisanego w opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki nr 2848371, do biosyntezy enzymów proteolitycznych za pomocą szczepu *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus usami* i innych czarnych szczepów z rodzaju *Aspergillus* stosuje się pożywkę ciekłą, zawierającą, w stosunku do użytej wody: 2% otrąb pszennych i 2% odtłuszczonej soi.

Według innego sposobu, opisanego w opisie patentowym francuskim nr 1481031, biosyntezę enzymów proteolitycznych za pomocą grzyba *Aspergillus niger* var. *macrosporus* prowadzi się w pożywce, zawierającej skrobię, namok kukurydziany, mąkę sojową oraz ryż.

Znane i opisane w literaturze pożywki są drogie, a ponadto ich przygotowanie, szczególnie w skali przemysłowej, może nastręczać trudności technologiczne.

Celem wynalazku jest opracowanie prostego, nadającego się szczególnie do stosowania w skali przemysłowej sposobu biosyntezy enzymów na drodze hodowli węgłnej grzybów nitkowatych z rodzaju *Aspergillus* w warunkach aerobowych w pożywkach, opartych na tanich i łatwo dostępnych surowcach przy jednoczesnym zapewnieniu maksymalnej aktywności enzymów oraz ustalenie warunków biosyntezy w skróconym czasie hodowli.

Stwierdzono, że cel ten można osiągnąć stosując, zarówno do przygotowania inoculum, jak i do samej biosyntezy enzymów, zwłaszcza proteolitycznych, pożywkę, w skład której obok otręb pszennych i soli mineralnych wchodzi zarodki zbożowe, które znacznie podnoszą aktywność enzymów oraz przyspieszają proces hodowli. W tym celu przygotowaną pożywkę o następującym składzie procentowym w stosunku do użytej wody: 1–6% otręb pszennych, 0,1–4% soli mineralnych, oraz 0,1–5% zarodków zbożowych, zakwaszoną do poziomu pH w granicach 3–6, szczepi się zawiesiną grzybní *Aspergillus*, wyhodowaną na wyżej przedstawionej pożywce, dodaną w ilości 5–12% w stosunku do ilości pożywki produkcyjnej i prowadzi się proces biosyntezy w temperaturze 25–35°C przez 48–120 godzin przy stałym napowietrzaniu i mieszaniu środowiska hodowlanego.

Po zakończeniu procesu grzybní oddziela się od płynu, klaruje i zagęszcza na przykład na wyparce cienkowarstwowej i wytrąca wznany sposób aktywne białko. Otrzymany w takiej postaci enzym stanowi produkt końcowy procesu, który odznacza się aktywnością w granicach 200 000–500 000 JH/g.

P r z y k ł a d. Do 10 litrów wody wodociągowej dodaje się 0,5 kg otręb pszennych, 0,4 kg zarodków zbożowych, 0,3 kg chlorku sodu oraz 0,01 kg fosforanu amonu i ustala pH środowiska na poziomie 5,5 przez dodanie kwasu siarkowego. Następnie pożywkę sterylizuje się w fermentorze pod ciśnieniem 0,6 at w ciągu 40 minut i po ochłodzeniu szczepi zawiesiną grzybní *Aspergillus niger*, w ilości 5%, wyhodowaną w kolbach Erlenmayera.

Hodowlę węglną prowadzi się w temperaturze 35°C przy ciągłym napowietrzaniu i mieszaniu w ciągu 80 godzin. Po zakończeniu hodowli grzybní oddziela się przez wirowanie, płyn klaruje na filtrze i zagęszcza na wyparce cienkowarstwowej, a następnie wytrąca białko za pomocą etanolu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania enzymów, zwłaszcza proteolitycznych, metodą hodowli węgłnej grzybów nitkowatych z rodzaju *Aspergillus* w warunkach aerobowych, z n a m i e n n y t y m, że jako podłoże hodowlane do przygotowania inoculum i jako podłoże do biosyntezy enzymów stosuje się pożywkę w postaci zawiesiny wodnej, w której skład wchodzi otręby pszenne, zarodki zbożowe oraz sole mineralne, przy czym biosyntezę enzymów prowadzi się przy poziomie pH pożywki, ustalonym w granicach 3–6 i temperaturze 25–35°C, przy ciągłym napowietrzaniu i mieszaniu środowiska hodowlanego, dostosowanym do stanu fizjologicznego, organizmu, przez 48–120 godzin.

2. Sposób według zastr. 1; z n a m i e n n y t y m, że stosuje się pożywkę, w której skład wchodzi, w stosunku do użytej wody: 1–6% otręb pszennych, 0,1–5% zarodków zbożowych oraz 0,1–4% składników mineralnych.