



Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 25.V.1965 (P 109 231)

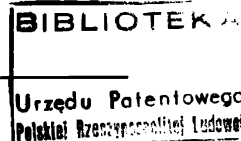
Pierwszeństwo: 26.V.1964 Wielka Brytania

Opublikowano: 5.I.1967

Kl. 6 a, 22/04

MKP C 12 d 13/10

UKD



Twórca wynalazku: Eunice Jean Napier

Właściciel patentu: Glaxo Laboratories Limited, Greenford (Wielka Brytania)

Sposób otrzymywania kompleksu enzymów proteolitycznych

1

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania kompleksu enzymów proteolitycznych.

Preparaty enzymatyczne znajdują coraz wszechstronniejsze zastosowanie w przemyśle. Na przykład enzymy proteolityczne stosuje się w przemyśle piekarniczym, garbarskim i browarniczym.

Stwierdzono, że bakterie rodzaju *Cytophaga*, zarejestrowane w Narodowym Zbiorze Bakterii Przemysłowych (National Collection of Industrial Bacteria) w Aberdeen w Szkocji, pod numerem NCIB 9497 wytwarzają kompleks enzymów proteolitycznych o szerokim zakresie działania i dużej aktywności. Kompleks ten rozkłada grzybnię grzybową. Wykazuje on silną aktywność proteolityczną również wobec keratyny i zawiera, między innymi, laminarynazę i chitynazę, co poszerza zakres jego zastosowania.

Niżej podane są cechy charakterystyczne bakterii *Cytophaga* NCIB 9497.

Morfologia. W wyniku badania bakterii za pomocą fazowego mikroskopu kontrastowego z obiektywem X20 po 24-godzinnej hodowli w temperaturze 20°C stwierdzono pojedyncze i podwójne nieruchliwe, krótkie, proste, dość cienkie pałeczki o równoległych bokach i zaokrąglonych końcach. Podobny wygląd miały w wodzie peptonowej w temperaturze 30°C.

Barwienie metodą Gramma, po 3-dniowej hodowli na pożywce agarowej w temperaturze 20°C: Gramm-ujemne, krótkie, proste pałeczki o bokach

2

równoległych i zaokrąglonych końcach; barwienie o nierównych pasmach. Podobny wygląd miały bakterie wyhodowane na pożywce zawierającej agar, glukozę i pepton. Barwienie występuje nawet na agarze z krwią.

Wygląd kolonii. Po 4 dniach hodowli na pożywce agarowej w temperaturze 20°C, hodowla jest bladeżółta, półprzezroczysta o kształcie kolistym, wypukła, jednolita, gładka i błyszcząca, ma średnicę 1—1,5 mm i wydziela gryzący zapach.

Po 4-dniowej hodowli na pożywce, zawierającej agar, glukozę i pepton w temperaturze 20°C, kolonia jest bladeżółta, przezroczysta o kształcie kolistym, wypukła, jednolita, gładka błyszcząca i śluzowata, ma średnicę 1—2,5 mm i wydziela gryzący zapach.

Po 4-dniowej hodowli na agarze z krwią w temperaturze 20°C, kolonia jest szarawo-żółta, półprzezroczysta, o kształcie kolistym, wypukła, jednolita, gładka i błyszcząca, ma średnicę 1—2 mm, wydziela gryzący zapach i nie wykazuje zjawiska hemolizy.

Wzrost w środowisku płynnym. Po dwóch dniach hodowli na pożywce z bulionu w temperaturze 20°C obserwuje się słaby wzrost kolonii, bardzo słabe równomierne zmętnienie i niewielki lepki osad. Wzrost jest również słaby w temperaturze 30°C.

Po dwóch dniach hodowli na wodnej pożywce glukozo-peptonowej w temperaturze 20° i 30°C

obserwuje się umiarkowany wzrost i słabe równomierne zmętnienie.

Zależność wzrostu kolonii od temperatury. W temperaturze 5°–10° C nie następuje wzrost kolonii. W temperaturze 37° C występuje słaby wzrost. Kolonia jest niewrażliwa na działanie penicyliny i streptomycyny, lecz wrażliwa na działanie chloramfenikolu i hydroksytetracykliny. W temperaturze 20° C lub 30° C nie powstaje żaden kwas ani gaz z glukozy, sacharozy, maltozy, manitu lub skrobi. W glukozowej pożywce Hugh i Leifsona nie występuje zmiana zabarwienia. W temperaturze 20° C następuje peptonizacja mleka lakmusowego i redukcja odczynnika, a w temperaturze 30° C tylko peptonizacja. W temperaturze 20° C żelatyna upłynnia się. W temperaturze 20° i 30° hodowli — w oksydaza Kovaca dodatnia. Poza tym w temperaturze 20° i 30° nie wytwarza się indol, a zabarwienie czerwieni metylowej nie ulega zmianie. W warunkach tych nie wytwarza się acetylometylokarbinolu a azotan nie ulega redukcji. Z peptonu wytwarza się amoniak. Katalaza i ureaza jest ujemna. Cytrynian wykorzystuje się jako jedyne źródło węgla. Lipazy i lecytynazy nie obserwuje się na agarze żółtkowym.

Badania te przeprowadzone według Bergeya Manual of Determinative Bacteriology, wyd. 7-me 1957 (Bailliere Tindall Cox, London), określają badany mikroorganizm jako *Flavobacterium* (str. 309—322) lub *Cytophaga* (str. 858—863). *Flavobacterium* i *Cytophaga* określa się dalej wspólnie jako *Cytophaga*.

Sposób otrzymywania kompleksu enzymów według wynalazku polega na hodowaniu drobnoustroju *Cytophaga* NCIB 9497 na odpowiedniej pożywce w warunkach aerobowych, na przykład metodą fermentacji aerobowej głębinowej.

Jako środowisko fermentacyjne nadają się podłoża, stosowane powszechnie przy hodowli drobnoustrojów. Podłoża te stanowią podstawowe źródła azotu, które w razie potrzeby uzupełnia się węglowodanem i (lub) solami odżywczymi. Jako źródła azotu stosuje się ekstrakt słodowy, ekstrakt mięsny, pepton i wyciąg namokowy kukurydzy, oddzielnie lub w kombinacji ze sobą. Szczególnie korzystnym źródłem azotu jest grzybnia grzybowa na przykład rodzajów *Cephalosporium* i *Penicillium*. Umożliwia to stosowanie jako źródła azotu pozostałości grzybnio-
wych po produkcji antybiotyków.

Surowiec będący źródłem azotu zaspokaja często zapotrzebowanie bakterii *Cytophaga* NCIB 9497 na węgiel i (lub) sole odżywcze tak, że na przykład wystarczające jest stosowanie jako środowiska fermentacyjnego środowiska złożonego wyłącznie z ekstraktu mięsnego i peptonu, zawierającego również chlorek sodowy. W niektórych przypadkach pożądanym jest uzupełnienie środowiska węglowodanem, przy czym odpowiednimi węglowodanami są sacharoza, maltoza, glukoza i inne. Poza tym pożądanym jest niekiedy dodatek substancji mineralnych takich jak magnez, żelazo i cynk. Przed sterylizacją pH środowiska ustala się na 5–8 korzystnie 5,5–6,0.

Proces fermentacji prowadzi się w temperaturze

20–35° C, korzystnie 22–32° C, a najkorzystniej w temperaturze około 26° C w ciągu 20–50 godzin.

Wytworzoną ciekłą kulturę stosuje się jako taką lub wyodrębnia się z niej kompleks enzymów, na przykład przez osuszenie całego bulionu lub jego sklarowanie przez odwirowanie a następnie wysuszenie sklarowanej cieczy np. przez odparowanie ze stanu zamrożenia. Wyodrębniony kompleks enzymów ewentualnie oczyszcza się, na przykład przez strącenie z roztworu wodnego za pomocą czynników strącających białka, takich jak aceton lub siarczan amonowy, drogą dializy itp. Kompleks enzymów można na przykład strącić na kaolinie przez dodanie do bulionu około 20% o-owego siarczanu amonowego.

Surowy kompleks enzymów otrzymany sposobem według wynalazku występuje w postaci suchego, białokremowego proszku, który w temperaturze 4° C jest trwały przez szereg miesięcy. Proszek ten rozpuszcza się w wodzie w ilości 0,1% tworząc opalizujący roztwór.

Jak wspomniano wyżej, wytworzony sposobem według wynalazku, kompleks enzymów wykazuje między innymi działanie podobne do proteazy, laminarynazy i chitynazy. Poza tym, kompleks ten wykazuje aktywność keratynazy, elastazy i lipazy oraz zdolność rozkładania grzybni różnych ustrojów grzybowych.

Działanie kompleksu enzymów ujawnia na przykład jego zdolność do rozkładania żelatyny i kazeiny, keratyny oraz różnych grzybni grzybowych, na przykład pleśni rodzaju *Penicillium* i *Cephalosporium*.

Szczególnie godna podkreślenia jest duża szybkość działania kompleksu enzymów, wytworzonego sposobem według wynalazku.

Kompleks ten stosuje się na przykład przy produkcji pokarmów zbożowych i karmy dla zwierząt, do udelikatniania mięsa, do produkcji hydrolizatów białkowych, do wytrawiania skór, do usuwania plam przy czyszczeniu na sucho, a także dla celów medycznych do przyspieszania zablizniania ran, łagodzenia stanów zapalnych, usuwania skrzepów krwi i siniaków.

Poza tym stwierdzono, że kompleks enzymów wykazuje rozkładające działanie wobec różnych grzybów patogenicznych na przykład *M. canis*, *Trichophyton rubrum* i *T. sulphureum*.

Dzięki temu, że kompleks enzymów, otrzymany sposobem według wynalazku wykazuje zdolność rozkładania grzybni grzybowej można za jego pośrednictwem wykorzystać zużytą grzybnię z produkcji antybiotyków, zwłaszcza produktów cefalosporinowych. Taką zużytą grzybnię rozkłada się za pomocą enzymu, a wytworzoną rozpuszczalną substancję stosuje się jako pożywkę w czasie fermentacji. Stopień aktywności kompleksu enzymów wobec grzybni grzybowej zależy od rodzaju danej grzybni, na przykład w przypadku rodzaju *Cephalosporium* i trzech rodzajów dermatofitowych podanych wyżej, zachodzi całkowity rozpad komórki. W przypadku *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus* i *Rhizopus nigricans*, młode strzępki grzyba stają się szybko półprzeźroczyste, a zawartość komórek zanika lub plazmolizuje się.

Pomimo uwolnienia niewielkiej ilości N-acetylo-glukozaminy, ścianki komórek pozostają zasadniczo niezmiennione.

Jeśli chodzi o działanie keratynazowe, kompleks enzymów działa na włosy i warstwę rogową.

Kompleks ten stosuje się w sposób używany zwykle w technologii enzymów. Przy rozkładaniu grzybni grzybowej najkorzystniejsza wartość pH wynosi 7, a temperatura procesu 37°C. Przy działaniu proteolitycznym wartości te wynoszą korzystnie odpowiednio pH = 8 i temperatura 37°C. Działanie rozkładające kompleksu enzymów wobec grzybni grzybów ustaje szybko w temperaturze 50°C i wyższej; działanie proteolityczne ustaje w temperaturze 60°C.

Poniższe przykłady objaśniają sposób według wynalazku nie ograniczając jego zakresu.

Przykład I. Pożywki w ilości 40 ml umieszczone w stożkowych kolbach o pojemności 250 ml, składające się z 4% maltozy, 2,4% ekstraktu słodowego, 1% peptonu i wody destylowanej do 100%, o pH = 7, ustalonym przez dodanie wodorotlenku sodowego, zaszczepiono oczkami kultury drobnoustroju *Cytophaga NCIB 9497* i prowadzono fermentację w temperaturze 26°C na trzęsawce (podrzut 5 cm) pracującej z prędkością 200 obrotów na minutę. Po 2-dniowej inkubacji, kultura ta wykazywała silne rozkładowe działanie wobec *Cephalosporium acremonium* (Brotzu) IMI 49137.

Przykład II. Pożywki w ilości 100 ml, umieszczone w stożkowatych kolbach o pojemności 250 ml zawierające 1% ekstraktu mięsnego, 1% peptonu, 0,5% chlorku sodowego i wody destylowanej do 100% o pH = 8 ustalonym przez dodanie wodorotlenku sodowego, po 1-godzinnym gotowaniu, odsączeniu i ustaleniu pH na 7,2 przez dodanie kwasu chlorowodorowego, zaszczepiono oczkami kultury drobnoustroju *Cytophaga NCIB 9497* i prowadzono fermentację w temperaturze 26°C na trzęsawce (podrzut 5 cm), pracującej z prędkością 200 obrotów/min. Po jednodniowej inkubacji, kultura wykazywała silne działanie rozkładające wobec *C. acremonium*.

Przykład III. W warunkach określonych w przykładzie II lecz z zastosowaniem pożywki, składającej się z 2,5% namokowego roztworu kukurydzy, 0,55% octanu amonowego, 2,5% sacharozy i wody destylowanej do 100% o pH = 6,5 ustalonym przez dodanie wodorotlenku sodowego, po jednodniowej inkubacji otrzymano kulturę, która wykazywała działanie rozkładowe wobec *C. acremonium*.

Przykład IV. Trzy litry, sterylizowanej przez 30 minut w temperaturze 120°C pożywki, składającej się z 6% sprasowanej na mokro grzybni *C. acremonium*, 0,07% wodorofosforanu dwupotasowego, 0,03 dwuwodorofosforanu potasowego, 0,05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0001 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 oddzielnie sterylizowanej glukozy i uzupełnionej wodą destylowaną do 100%, zaszczepiono 60 ml wyrośniętej kultury drobnoustroju *Cytophaga NCIB 9497* i całość utrzymywano w temperaturze 26°C mieszając z prędkością 550 obrotów/min. oraz napowietrzając najpierw przez 20

godzin z prędkością 3 litrów powietrza na minutę, następnie przez 4 godziny z prędkością 1 litr/min. a przez dalsze 2 godziny z prędkością 0,5 litra/min.

Następnie odwirowano środowisko fermentacyjne i po liofilizacji górnej warstwy płynu, otrzymano 6,6 g kremowej stałej substancji, która wykazywała rozkładowe działanie wobec *C. acremonium* i działanie proteolityczne wobec kazeiny.

Przykład V. Półtora litra kultury z przykładu IV uwolniono przez odwirowanie od substancji stałej, ustalono pH na 6,1 przez dodanie kwasu octowego i odparowano mieszaninę w próżni w temperaturze poniżej 40°C do objętości 250 ml. Otrzymany koncentrat wprowadzono powoli do 2 litrów acetonu po czym ochłodzono mieszaninę do 5°C mieszając ją szybko. Po wypłukaniu acetonem i wysuszeniu nad pięciotlenkiem fosforu, otrzymano 7,4 g jasnobrunatnego produktu, który wykazywał tę samą aktywność co wyjściowy bulion.

Przykład VI. Jeden litr kultury z przykładu IV uwolniono przez odwirowanie ze stałej substancji, po czym rozpuszczono w nim 472 g siarczanu amonowego. Po odsączeniu strąconego produktu i wysuszeniu go, otrzymano 19 g substancji wykazującej około 50% aktywności wyjściowej bulionu.

Przykład VII. Dwa litry kultury z przykładu IV uwolniono ze stałej substancji przez odwirowanie, po czym wiano je do 20 litrów lodowatego acetonu. Po odsączeniu produktu, wypłukaniu go acetonem i wysuszeniu nad pięciotlenkiem fosforu, otrzymano 10 g substancji wykazującej aktywność równą aktywności wyjściowego bulionu.

Przykład VIII. Kawałki świeżej skóry ciełej zanurzono w 1%-owym roztworze, wytworzonego jak w przykładzie VII preparatu enzymowego, w buforze M/50 Tris o pH = 7. Po 18 godzinach w temperaturze 37°C włosie wychodziło łatwo pod wpływem łagodnego skrobania. Podobne działanie buforu Tris lecz bez zastosowania preparatu enzymowego nie umożliwiło usunięcia włosa nawet przez silne wyciąganie.

Przykład IX. W ciągu 24 godzin w środowisku złożonym z peptonu i ekstraktu słodowego o temperaturze 26°C umieszczonym w kolbie wstrząsanej wytworzono grzybnie *Trichophyton rubrum* (jeden z grzybów wywołujących grzybicę stóp u sportowców). Następnie odsączono grzybnie i zawieszono ją (0,2%) w 0,2%-owym roztworze, wytworzonego jak w przykładzie VII, preparatu enzymowego w buforze M/50 Tris o pH = 7. Po trzech godzinach w temperaturze 27°C grzybnia rozpuściła się całkowicie.

Przykład X. Do 600 ml bulionu fermentacyjnego, wytworzonego jak w przykładzie IV, dodano 1,65 g kaolinu, a następnie porcjami 180 g siarczanu amonowego, mieszając całość mechanicznie do rozpuszczenia. Następnie przez odsączenie wyosobniono mieszaninę kaolinowo-proteinową, którą wypłukano wodą i wysuszono w piecu próżniowym w temperaturze pokojowej. Otrzymano 11,7 g produktu wykazującego całą aktywność wyjściowego bulionu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania kompleksu enzymów proteolitycznych na drodze mikrobiologicznej, **znamienny tym**, że bakterie *Cytophaga* NCIB 9497 hoduje się w warunkach aerobowych w temperaturze 20—35°C na pożywkach, zwykle stosowanych do hodowli drobnoustrojów, po czym otrzymany kompleks enzymów ewentualnie wyodrębnia się z ciekłej kultury.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę, zawierającą jako źródło azotu grzybnię grzybów korzystnie rodzaju *Cephalosporium* lub *Penicillium*.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę, zawierającą jako źródło azotu ekstrakt słodowy, ekstrakt mięsny, pepton i (lub) namokowy roztwór kukurydzy.
4. Sposób według zastrz. 1 i 3, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę, zawierającą ekstrakt mięsny, pepton i chlorek sodowy.
5. Sposób według zastrz. 1—4, **znamienny tym**,

- że stosuje się pożywkę z dodatkiem węglowodanów, korzystnie sacharozy, maltozy i (lub) glukozy.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się korzystnie w temperaturze 22—32°C, najkorzystniej w temperaturze około 26°C.
 7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w ciągu 20—50 godzin.
 8. Sposób według zastrz. 1—7, **znamienny tym**, że kompleks enzymów wyosabnia się z surowej kultury przez jej wysuszenie.
 9. Sposób według zastrz. 1—8, **znamienny tym**, że kompleks enzymów wyosabnia się z surowej kultury przez odwirowanie z niej zanieczyszczeń i wysuszenie sklarowanej cieczy np. przez odparowanie ze stanu zamrożonego.
 10. Sposób według zastrz. 1—9, **znamienny tym**, że wyodrębniony kompleks enzymów oczyszcza się przez strącenie go z roztworu wodnego za pomocą czynnika strącającego proteiny np. acetonu lub siarczanu amonowego.

