



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr _____

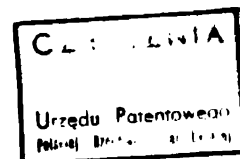
Int. Cl.³ C12N 9/54
C12R 1/09

Zgłoszono: 08.06.81 (P. 231550)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 13.04.82

Opis patentowy opublikowano: 30.06.1984



Twórcy wynalazku: Jerzy Sobieszczański, Anna Rodziewicz, Antoni Polanowski

Uprawniony z patentu tymczasowego: Akademia Rolnicza,
Wrocław (Polska)

Sposób otrzymywania enzymów proteolitycznych

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania na drodze mikrobiologicznej enzymów proteolitycznych, a zwłaszcza służących do koagulacji białek mleka.

Znane są liczne sposoby otrzymywania, w oparciu o hodowane na pożywkach płynnych mikroorganizmy, aktywnych koagulacyjnie enzymów proteolitycznych.

Jednym ze znanych przykładów jest otrzymywanie preparatu znanego pod nazwą protopolimyxy Q-158, w którym zastosowanie znajduje szczep bakterii *Bacillus polymyxa* 13-13 hodowany na podłożu płynnym metodą wstrząsaną w okresie czasu 32 godzin i w temperaturze 25°C. W celu wyhodowania szczepu bakterii wykorzystano 750 ml kolby, stosując 100 ml płynnego podłoża i 4% materiału siewnego w postaci inokulum, przy czym w skład podłoża wchodziło 1% odtłuszczonego suchego mleka, 2% ziemniaczanej skrobi, 0,5% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄, 0,05% MnSO₄ i 0,001% FeSO₄. Po zakończeniu hodowli oddzielono poprzez wirowanie biomasę, a dalszym badaniom poddano supernatant. Z supernatantu wytrącono siarczanem amonu i o stopniu nasycenia 40-80% oraz rozpuszczalnikami organicznymi białka enzymatyczne, przy czym jako rozpuszczalnik stosowano etanol o stężeniu końcowym 48-80%, izopropanol 66-83% i aceton 66-83%. Optymalny efekt uzyskiwano przez wysalanie płynu pohodowlanego (NH₄)₂SO₄ do 0,7 stopnia nasycenia. Oddzielony wirowaniem przy 5000 obr/min osad rozpuszczano w małej objętości wody destylowanej i poddawano 12-godzinnej dializie przepływowej wobec wody wodociągowej w temperaturze 1°C. Poprzez sublimacyjne wysuszenie dializatu uzyskano wysoko aktywny koagulacyjnie preparat, przy wydajności procesu 98,6%. (I. Ja Veselov, Smirnowa: Proteoloticeskij preparat iz kultury bakterii *Bacillus polymyxa* 13-13. Prikladnaja biochimja i mikrobiologija XI, wyp. 6, s.824 1975).

Znany jest również przykład, w którym badany szczep bakterii *Bacillus cereus* wyizolowano z mleka na agarze cukrowym prowadząc hodowlę na bodłożu syntetycznym zawierającym 1% glukozy. Maksymalne uwalnianie proteaz obserwowano po siedmiu dniach w temperaturze 40°C i pH 8,0. Uzyskany oczyszczony enzym wykazał wobec kazeiny aktywność proteolityczną wyższą od dostępnych preparatów handlowych (Tani J., Noami S., Ashida H. at all.; Studies on the bacterial protease I. Isolation and characterization of protease produced by a strain of *Bacillus cereus*. J. Bact. 23/2/, 145-51, 1968).

Zgodnie z istotą wynalazku szczepiąc podłoże hodowlane dwudziestoczerogodzinną hodowlą płynną bakterii *Bacillus circulans* w ilości 1–2% i następnie prowadząc ją przez 17–24 godzin w warunkach wstrząsania i temperaturze 25–40°C otrzymuje się produkt wyjściowy, który po odwirowaniu przy 10 000 obr/min w okresie 20–30 minut pozwala na wydzielenie supernatantu, z którego pod działaniem acetonu w stężeniu końcowym 75–90% w temperaturze –10°C wydziela się osad białka enzymatycznego rozpuszczony następnie w 5 ml wody destylowanej. Jako podłoże hodowlane bakterii stosuje się rozcieńczoną 2–5 krotnie serwatkę z mleka odtłuszczonego z dodatkiem 0,1–1,0% mąki sojowej, względnie zarodków zbożowych, przy wyjściowym pH 6–8,5. Zastosowana serwatka może być zastąpiona sokiem ziemniaczanym uzyskanym w wyniku pierwszego wirowania.

Sposób według wynalazku dotyczący otrzymywania enzymów proteolitycznych polega na zaszczepieniu 50 ml podłoża w postaci rozcieńczonej 2–5 krotnie wodą destylowaną serwatki z odtłuszczonego mleka, względnie soku ziemniaczanego uzyskanego przy pierwszym wirowaniu miazgi, w ilości 1–2% inokulum w postaci 24-godzinnej kultury bakterii *Bacillus circulans*. Jakość wykorzystywanego podłoża warunkują wyjściowe pH 6–8,5 i wzbogacenie jego dodatkiem w postaci 0,1–1,0% mąki sojowej, względnie zarodników zbożowych.

Uzyskana tą drogą hodowla zostaje poddana w okresie 17–48 godzin wstrząsaniu przy częstotliwości 180 obr/min i w temperaturze 25–40°C.

Otrzymany produkt wyjściowy poddaje się wirowaniu przy 10 000 obr/min w okresie 0,5 godziny, a uzyskany płyn pohodowlany w postaci supernatantu charakteryzuje pH 7–9, zawartość białka 1–3 mg/ml, aktywność proteolityczna 3000–4000 jednostek na mililitr płynu i aktywność koagulacyjna 1000–2000 jednostek na mililitr płynu.

Stosując aceton o stężeniu końcowym 75–90% z otrzymanego supernatantu w temperaturze –10°C wytrąca się białko enzymatyczne, uzyskując 90–100% wydajność koagulacyjną i 30–40% wydajność aktywności proteolitycznej.

Przykład I. Umieszczone w 500 ml kolbie 50 ml podłoża, w postaci dwukrotnie rozcieńczonej wodą destylowaną serwatki z odtłuszczonego mleka i 0,5% mąki sojowej o wyjściowym pH 7,5 szczepi się 24-godzinną hodowlą płynną bakterii *Bacillus circulans* w ilości 1%. Przedmiotową hodowlę prowadzi się przez 24 godzin w temperaturze 30°C na wstrząsaczu przy 180 obr/min.

Uzyskany tą drogą materiał wyjściowy poddaje się wirowaniu przy 10 000 obr/min w okresie 20 minut, otrzymując w wyniku rozdzielenia supernatant o pH 8, zawartości białka 1,5 mg/ml, aktywności proteolitycznej na hemoglobinie 7,6 mg tyrozyny na mililitrze i aktywności koagulacyjnej 3000 jednostek na mililitr płynu pohodowlanego. Stosując aceton o stężeniu końcowym 80% w temperaturze –10°C i przy ciągłym mieszaniu wytrąca się osad białka enzymatycznego, który kolejno po godzinie odstawia, wykorzystując wirówkę z chłodzeniem, odwirowuje się przy 3500 obr/min i rozpuszcza w 5 ml wody destylowanej otrzymując tą drogą produkt końcowy w postaci wstępnie oczyszczonego roztworu enzymów proteolitycznych.

Przedmiotowy proces charakteryzuje wydajność koagulacyjna 99% i wydajność aktywności proteolitycznej na hemoglobinie 30%, a na kazeinie 44%.

Przykład II. Umieszczone w 500 ml kolbie 50 ml podłoża w postaci uzyskanego w wyniku pierwszego wirowania miazgi soku ziemniaczanego wzbogaconego 0,5% zarodników zbożowych o wyjściowym pH 8 szczepi się 24-godzinną hodowlą płynną bakterii *Bacillus circulans* w ilości 1,5%. Przedmiotową hodowlę prowadzi się przez 17 godzin w temperaturze 30°C na wstrząsaczu przy 180 obr/min.

Uzyskany tą drogą materiał wyjściowy poddaje się wirowaniu przy 10 000 obr/min w czasie 20 minut, otrzymując w wyniku rozdzielenia supernatant o pH 8,6, zawartości białka 2 mg/ml, aktywności proteolitycznej na hemoglobinie 8 mg tyrozyny na mililitr i aktywności koagulacyjnej 3 500 jednostek na mililitr płynu pohodowlanego. Stosując aceton o stężeniu końcowym 80% w temperaturze –10°C i przy ciągłym mieszaniu wytrąca się osad białka enzymatycznego, który kolejno po godzinie odstawia, wykorzystując wirówkę z chłodzeniem, odwirowuje się przy 3500 obr/min i rozpuszcza w 5 ml wody destylowanej otrzymując tą drogą produkt końcowy w postaci wstępnie oczyszczonego roztworu enzymów proteolitycznych.

Przedmiotowy proces charakteryzuje wydajność koagulacyjna 99% i wydajność aktywności proteolitycznej na hemoglobinie 30%, a na kazeinie 44%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania enzymów proteolitycznych, a zwłaszcza służących do koagulacji białek mleka, **znamienny tym**, że szczepiąc podłoże hodowlane dwudziestoczwierogodziną hodowlą płynną bakterii *Bacillus circulans* w ilości 1–2% i następnie prowadząc ją przez 17–24 godzin w warunkach wstrząsania i temperaturze 25–40°C otrzymuje się produkt wyjściowy, który po odwirowaniu przy 10 000 obr/min w okresie 20–30 minut pozwala na wydzielenie supernatantu, z którego pod działaniem acetonu o stężeniu końcowym 75–90% w temperaturze –10°C wydziela się osad białka enzymatycznego rozpuszczany następnie w 5 ml wody destylowanej.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako podłoże hodowlane bakterii stosuje się rozcieńczoną 2–5 krotnie serwatkę z mleka odtłuszczonego z dodatkiem 0,1–1,0% mąki sojowej, względnie zarodków zbożowych, przy wyjściowym pH 6–8,5.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako podłoże hodowlane bakterii stosuje się uzyskany w wyniku pierwszego wirowania sok ziemniaczany z dodatkiem 0,1–1,0% mąki sojowej, względnie zarodków zbożowych, przy wyjściowym pH 6–8,5.