

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

97023

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 21.02.76 (P. 187398)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 03.01.77

Opis patentowy opublikowano: 30.12.1980

Int. Cl.⁸ C12D 13/10

MKP C12d 13/10

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Edward Galas, Jadwiga Sierecka, Tadeusz Trzmiel

Uprawniony z patentu: Politechnika Łódzka, Łódź (Polska)

Sposób otrzymywania enzymu subtilopeptydazy

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania enzymu subtilopeptydazy, przeznaczonego zwłaszcza do depilacji i zmiękczenia skóry.

Znany jest z czasopisma Journal of Applied Chemistry and Biotechnology t. 24, s. 93, 1974 sposób otrzymywania enzymu subtilopeptydazy, polegający na tym, że szczep bakterii *Bacillus subtilis* przeszczepia się na podłoże hodowlane o składzie: 1% ekstraktu drożdżowego 1,0% Bacto pepton, 0,5% glukozy, 0,5% chlorku sodu, 0,1% uwodnionego chlorku wapnia, 0,1% uwodnionego siarczanu magnezu, 0,01% uwodnionego siarczanu manganu, 0,01% uwodnionego siarczanu żelazowego, 5% kwaśnego fosforanu potasu oraz woda, o wyjściowym pH = 6,5 i prowadzi się hodowlę inokulum w czasie 24 godzin w temperaturze 30°C. Tak otrzymanym inokulum szczepi się podłoże hodowlane o składzie: 4% zmielonego jęczmienia, 1% zmielonych kiełków słodowych, 1,5% kwaśnego fosforanu amonowego, 0,5% cytrynianu sodu, o pH = 6,5, przy czym stosuje się około 0,8% objętościowych inokulum w stosunku do podłoża. Hodowlę produkcyjną prowadzi się w ciągu 24–48 godzin w temperaturze 37,5°C doprowadzając powietrze w ilości 0,525–0,875 części objętościowych powietrza na 1 część objętościową podłoża w ciągu 1 minuty.

Z czasopisma Journal of General Microbiological 49, s. 421, 1967 znany jest sposób otrzymywania enzymu subtilopeptydazy, w którym jako składniki podłoża hodowlanego stosowane są: skrobia, maltoza, glukoza, glicerol, mieszanina witamin, hydrolizat kazeiny, ekstrakt drożdżowy, aminokwasy, sole nieorganiczne przy czym pH podłoża wynosi 6,9–7,2.

Sposób otrzymywania enzymu subtilopeptydazy według wynalazku polega na tym, że wyodrębniony szczep bakterii *Bacillus subtilis* przeszczepia się na podłoże hodowlane o składzie 0,05% uwodnionego chlorku wapnia, 0,05% uwodnionego siarczanu magnezu, 0,05% chlorku potasu, 0,1% kwaśnego fosforanu potasu, 2% glukozy, 0,5% namoku kukurydzianego, 10% wody drożdżowej, 10^{-3} % siarczanu żelazowego, 2×10^{-4} % siarczanu manganowego oraz serwatki, o wyjściowym pH = 8,5, gdzie w warunkach hodowli wgłębnej wydziela się subtilopeptydaza do płynu hodowlanego. Wyselekcjonowanym szczepem bakterii, szczepi się w kolbach

podłoże hodowlane o wyżej podanym składzie po czym stopień napełnienia kolb wynosi 10% objętościowych. W czasie inkubacji inokulum, kolby wstrząsa się w ciągu 22–24 godzin w temperaturze 30–31°C.

Następnie otrzymaną zawiesinę bakterii przeszczepia się ponownie na wyjałowione podłoże hodowlane o wyżej podanym składzie, w ilości 3% objętościowych w stosunku do podłoża oraz prowadzi hodowlę produkcyjną w czasie 24–36 godzin w temperaturze 30–31°C w obecności środków przeciwdziałających pienieniu, jak emulsje silikonowe.

W czasie fermentacji doprowadza się do hodowli powietrze w ilości 1 część objętościowa powietrza na 1 część objętościową podłoża w ciągu 1 minuty, ponadto podłoże hodowlane jest poddawane mieszaniu za pomocą mieszadła, obracającego się z szybkością 450 obrotów/minutę. Pod koniec okresu hodowlanego otrzymuje się taką koncentrację subtilopeptydazy w podłożu, która gwarantuje wyprodukowanie dowolnych preparatów tego enzymu. Po zakończeniu procesu fermentacji oddziela się składniki podłoża i bakterie przez odwirowanie i filtrację po uprzednim dodaniu chlorku wapnia w ilości 0,9–1% i doprowadzeniu pH do wartości 8,3.

Następnie filtrat zagęszcza się do 1/2 objętości i po ustaleniu pH na około 7,5, wytrąca się subtilopeptydazę alkoholem etylowym, przy czym stosuje się 2,5 części objętościowe alkoholu na 1 część objętościową płynu. Oddzielanie przeprowadza się w obniżonej temperaturze przy ciągłym mieszaniu. Po oddzieleniu osadu, przemywa się go acetonem i suszy w warunkach próżniowych nad wodorotlenkiem potasu w temperaturze pokojowej.

Preparat subtilopeptydazy, otrzymany sposobem według wynalazku, charakteryzuje się aktywnością enzymatyczną rzędu 2 jednostek A/1 g preparatu, optymalnym pH = 10,2 oraz optymalną temperaturą działania rzędu 60–70°C. Preparat powoduje depilację i zmiękczenie skóry bez uszkodzenia łożyska skóry oraz jej podstawowej struktury, ponadto znajduje zastosowanie w przemyśle spożywczym, tekstylnym i kosmetycznym. Podstawowym składnikiem podłoża hodowlanego w sposobie według wynalazku jest serwatka, stanowiąca produkt odpadowy przemysłu mleczarskiego.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania enzymu subtilopeptydazy przez hodowlę bakterii *Bacillus subtilis*, polegający na przeszczepieniu bakterii *Bacillus subtilis* na podłoże hodowlane, zawierające uwodniony chlorek wapnia, uwodniony siarczan magnezu kwaśny fosforan potasu, glukozę, siarczan żelazowy, siarczan manganowy, hodowli inokulum w ciągu 22–24 godzin w temperaturze 30–31°C, a następnie zaszczepieniu otrzymanym inokulum podłoża hodowlanego, zawierającego wyżej podane składniki oraz hodowli produkcyjnej w ciągu 24–36 godzin, w temperaturze 30–31°C przy napowietrzeniu, z n a m i e n n y t y m, że hodowlę inokulum prowadzi się na podłożu hodowlanym, zawierającym 0,05% uwodnionego chlorku wapnia, 0,05% uwodnionego siarczanu magnezu, 0,05% chlorku potasu, 0,1% kwaśnego fosforanu potasu, 2% glukozy, 0,5% namoku kukurydzianego, 10% wody drożdżowej $1 \cdot 10^{-3}\%$ siarczanu żelazowego, $2 \times 10^{-4}\%$ siarczanu manganowego oraz serwatkę o wyjściowym pH = 8,5, po czym otrzymanym inokulum szczepi się podłoże hodowlane o wyżej podanym składzie w ilości 3% objętościowych zawiesiny inokulum w stosunku do podłoża i prowadzi hodowlę produkcyjną w obecności środków przeciwdziałających pienieniu, korzystnie emulsji silikonowych, doprowadzając w czasie hodowli 1 część objętościową powietrza na 1 część objętościową podłoża w ciągu 1 minuty, a po zakończeniu fermentacji oddziela się składniki podłoża i bakterie przez odwirowanie i filtrację w obniżonej temperaturze oraz suszy otrzymany osad subtilopeptydazy.