



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr

Int. Cl.³ C12N 1/20
C12N 9/92

Zgłoszono: 20.03.80 (P. 222861)

Pierwszeństwo:

Zgłoszenie ogłoszono: 13.02.81

Opis patentowy opublikowano: 30.06.1983



Twórcy wynalazku: Maria Brzozowska, Tadeusz Gołębiewski, Janina Malanowska

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

Sposób przygotowywania pożywki do syntezy izomerazy glukozowej

Przedmiotem wynalazku jest sposób przygotowywania pożywki do syntezy izomerazy glukozowej przy zastosowaniu bakterii z rodzaju *Streptomyces*. Enzym ten ma zastosowanie przy produkcji fruktozy i charakteryzuje się zdolnością przekształcania glukozy w fruktozę. Syntetyzowany jest w warunkach hodowli węglębnej przez szereg bakterii promieniowców, między innymi przez określone szczepy z rodzaju *Streptomyces bacillus*, *Actinoplanes* i inne.

W produkcji izomerazy glukozowej metodą węglębną stosowane są pożywki, w skład których wchodzi głównie: ksyloza, ksylon oraz surowce naturalne, stanowiące źródło ksylozy, która spełnia rolę induktora wytwarzania tego enzymu. Znaną są także pożywki z ograniczoną ilością ksylozy, lecz wówczas stosuje się odpowiednie mutanty drobnoustrojów, u których zdolność syntezy izomerazy glukozowej jest genetycznie uwarunkowana. Tak na przykład według sposobu podanego w opisie patentowym RFN nr 2001 627 do syntezy izomerazy glukozowej za pomocą mutantu *Flavobacterium arborescens* NRRL—11,022 stosuje się pożywkę, w której skład wchodzi hydrolizat białka zwierzęcego Bacto-Tryptone (firmy Dioco), 1% wyciągu namoku kukurydzianego, 1% fosforanu potasu dwuzasadowego 1% fosforanu potasu jednozasadowego oraz odpowiedni węglowodan w ilości 2%.

W szwajcarskim opisie patentowym nr 576 523 podany jest skład pożywki do syntetyzowania izomerazy glukozowej dla szczepu *Streptomyces olivochromogenes*. W skład tej pożywki wchodzi: 1% ksylozy, 0,1% glicyny, 2% syropu kukurydzianego, 3,6% namoku kukurydzianego, 0,2% NH_4NO_3 i 0,003% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$.

Natomiast w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 616 221 przedstawiono sposób syntetyzowania izomerazy glukozowej przy pomocy szczepu *Streptomyces albus* w pożywkę zawierającą: 1% ksylozy, 2% enzymatycznego hydrolizatu kazeiny, 1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,024% $\text{COCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ i 0,3% K_2HPO_4 .

Znane i opisane w literaturze przedmiotu pożywki przeznaczone do hodowli drobnoustrojów mających zdolność syntetyzowania izomerazy glukozowej są na ogół bardzo drogie, co w dużym stopniu rzutuje na ekonomikę procesu otrzymywania preparatu. Celem wynalazku jest więc opracowanie sposobu przygotowywania podłoża do syntetyzowania enzymu izomerazy glukozowej w oparciu o odpadowe surowce roślinne, stanowiące jednocześnie źródło ksylozy. Po przeprowadzeniu badań empirycznych stwierdzono, że cel ten można osiągnąć, stosując zarówno do przygotowywania materiału posiewowego, jak i do samej syntezy izomerazy glukozowej pożywkę zawierającą jako źródło węglowodanów i jednocześnie składników stymulujących wzrost drobnoustrojów enzymatyczne hydrolizaty nieużytecznych odpadów przemysłu młynarskiego, zwane potocznie pyłami zbożowymi.

Sposób postępowania według wynalazku jest następujący: Pyły zbożowe nawilża się wodą korzystnie w stosunku 1 : 5 i ogrzewa do temperatury około 120°C w ciągu 30–60 minut, utrzymując temperaturę na tym samym poziomie. Następnie po schłodzeniu do temperatury 50–80°C, optymalnej dla działania określonego enzymu, korzystnie 70°C, dodaje się enzym — α -amylazy lub enzym celololityczny lub enzym pektynolityczny lub enzym z grupy hemicelulaz w ilości od 0,1–4% w przeliczeniu na suchą masę surowca. Wymienione enzymy, otrzymane w drodze mikrobiologicznej, mogą być dodawane bądź w postaci cieczy pohodowlanej, bądź w postaci roztworów enzymatycznych, bądź też w postaci proszku. Z kolei całość schładza się do temperatury pokojowej i oddziela się części stałe od cieczy. Hydrolizę enzymatyczną prowadzi się przez 0,5–1,5 godziny.

Otrzymany hydrolizat w przypadku hodowli inocularnych wzbogaca się namokiem kukurydzianym, peptyną lub ekstraktem drożdżowym oraz solami mineralnymi, a w przypadku hodowli produkcyjnych dodaje się nieznaczna ilość ksylozy i koryguje się pH do wartości 6,8–7,5, korzystnie 7,0. Po rozlaniu do kolb sterylizuje się w temperaturze 110–120°C przez 30–60 minut.

Kolby lub fermentory szczepi się zawiesiną bakterii z rodzaju *Streptomyces* i prowadzi się hodowlę w warunkach aerobowych w temperaturze 25–35°C, w czasie od 15 do 40 godzin. Po zakończeniu procesu biomasę oddziela się od cieczy i poddaje się dalszej obróbce, zmierzającej do stabilizacji aktywności izomerazy glukozowej.

Przykład. (dla pożywki inoculanej). Do 1 litra wody wodociągowej dodaje się 100 gramów pyłów zbożowych, ustalając pH środowiska na poziomie 6,2. Całość podgrzewa się do temperatury 117°C utrzymując ją w ciągu 30 minut. Następnie po schłodzeniu całości do temperatury 70°C dodaje się enzymu α -amylazy. Hydrolizę enzymatyczną prowadzi się w ciągu 45 minut po czym tak przygotowaną zawiesinę podgrzewa się aż do zagotowania i po ostudzeniu do temperatury pokojowej oddziela się na wirówce części stałe od cieczy.

Płynny hydrolizat stanowi produkt końcowy procesu, który — po uprzednim skorygowaniu pH do wartości 7,4 i dodaniu namoku kukurydzianego oraz soli mineralnych — sterylizuje się w temperaturze 121°C w ciągu 60 minut.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób przygotowania pożywki do syntezy enzymu izomerazy glukozowej przy użyciu bakterii *Streptomyces*, **znamienny tym**, że jako główny składnik pożywki stosuje się odpady przemysłu młynarskiego, zwane pyłami zbożowymi, które po nawilżeniu, ogrzaniu do temperatury około 120°C w ciągu 30–60 minut i następnie ochłodzeniu do temperatury 50–80°C poddaje się hydrolizie enzymatycznej w ciągu 0,5–1,5 godziny, dodając enzym α -amylazy lub celololityczny lub pektynolityczny lub enzym z grupy hemicelulaz lub mieszaninę tych enzymów w ilości 0,1–4,0% w przeliczeniu na suchą masę surowca, po czym po zakończeniu procesu i ochłodzeniu tak otrzymanego hydrolizatu do temperatury pokojowej oddziela się wyciąg od części stałych i koryguje pH do wartości 6,8–7,5, korzystnie 7,0.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku przygotowania pożywki dla hodowli inocularnych wzbogaca się otrzymany hydrolizat namokiem kukurydzianym oraz solami mineralnymi.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku przygotowywania pożywki dla hodowli produkcyjnych wzbogaca się otrzymany hydrolizat nieznaczna ilością ksylozy.