

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **227786**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **404540**

(51) Int.Cl.

C12P 1/02 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **02.07.2013**

(54)

Sposób otrzymywania preparatu enzymów oksydoredukcyjnych

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

05.01.2015 BUP 01/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.01.2018 WUP 01/18

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

TADEUSZ ANTCZAK, Łódź, PL

ALICJA KACZMAREK, Zduńska Wola, PL

RITA PYĆ, Łódź, PL

MIROŚLAWA SZCZĘSNA-ANTCZAK, Łódź, PL

TOMASZ RAMIĘGA, Łódź, PL

RADOSŁAW WĄCHAŁA, Włocławek, PL

MILENA STĘPCZYŃSKA, Ozorków, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

PL 227786 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania preparatu enzymów oksydoredukcyjnych, zawierającego lakazy, peroksydazy ligninowe i peroksydazy manganozależne.

W czasopiśmie International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences 3 (2012) 143–148 ujawniono otrzymywanie preparatu enzymatycznego lakazy z szczepu *Alternaria arbore-scens* w hodowli w podłożu ciekłym zawierającym glukozę, ekstrakt drożdżowy i sole mineralne.

Z czasopisma Agriculture and Biology Journal of North America 4 (2010) 591–599 znany jest sposób otrzymywania preparatu lakazy w drodze hodowli wgłębnej szczepu grzybów strzępkowych *Alternaria alternata* i *Alternaria solani* w podłożu zawierającym glukozę i sole mineralne.

W czasopiśmie Journal of Fermentation Technology 56 (1978) 543–545 opisany został sposób otrzymywania preparatu enzymatycznego lakazy w hodowli wgłębnej w podłożu ciekłym zawierającym ekstrakt drożdżowy i ekstrakt z herbaty szczepu *Alternaria tenuis* A-2.

W kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej znajduje się, wyodrębniony ze środowiska naturalnego – ze ściółki lasu iglastego, szczep pleśni *Alternaria sp.* oznaczony symbolem AK0911 należący do klasy *Dothideomycetes*, rzędu *Pleosporales*, rodziny *Pleosporaceae* i rodzaju *Alternaria*, wykazujący zdolność wzrostu w temperaturze 2–32°C, cechujący się szczególnie szybkim wzrostem w temperaturze 25°C obficie rosnąc na agarze brzęczkowym i już po 4 dniach pokrywając się aksamitną grzybnią, ciemnoszarą, wełnowatą, wydzielając do podłoża barwnik melaninę. Konidiofory są septowane, w niewielkim stopniu rozgałęzione, z wielokomórkowymi konidiami na bokac i szczycie. Konidia mają kształt elipsoidalny lub cylindryczny o szerokości 8–17 µm i długości 25–56 µm zabarwione na kolor brunatny. Ostatnia komórka wypączkowuje nowe konidium.

Sposób otrzymywania preparatu enzymów oksydoredukcyjnych, zawierającego lakazy, peroksydazy ligninowe i peroksydazy manganozależne, w drodze hodowli szczepu grzyba z rodzaju *Alternaria*, polegający na hodowli materiału posiewowego na wysterylizowanym podłożu zawierającym brzeczkę słodową, zaszczepieniu tym materiałem wysterylizowanego ciekłego podłoża produkcyjnego zawierającego glukozę i sole mineralne i prowadzeniu hodowli produkcyjnej wgłębnej w warunkach sterylnych, a po jej zakończeniu wyodrębnieniu i zagęszczeniu otrzymanej cieczy pohodowlanej, według wynalazku charakteryzuje się tym, że stosuje się szczep grzyba nitkowatego *Alternaria sp.* AK0911, z którego sporządza się materiał posiewowy na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłożu stałym zawierającym na 1000 części wagowych brzeczkę słodowej o stężeniu 8,5°Bx 20 części wagowych agaru lub 20 części wagowych agaru i 0,6–0,8 części wagowych gwajakolu lub 20 części wagowych agaru i 2–3 części wagowych ligniny alkalicznej, bądź 20 części wagowych agaru, 2–3 części wagowych ligniny alkalicznej i 0,6–0,8 części wagowych gwajakolu, w temperaturze 28–32°C w czasie 3–6 dni. Następnie, zmywa się skos agarowy 0,89% roztworem chlorku sodowego i tak przygotowanym materiałem posiewowym szczepi się, wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, ciekłe podłoże produkcyjne zawierające w 1000 ml wody destylowanej glukozy 5–15 g, wodorofosforami (V) dipotasu 0,5–1,5 g, siarczanu (VI) magnezu 0,122–0,367 g, chlorku wapnia 0,034–0,15 g, siarczanu (VI) żelaza (II) 0,91–4,1 mg, azotanu (V) sodu 1,5–5 g, siarczanu (VI) cynku 1,4–4,21 mg, chlorku potasu 0,25–0,75 g, siarczanu (VI) miedzi (II) 2,5–5 mg, siarczanu (VI) manganu (II) 20,1–60,31 mg, siarczanu (VI) kobaltu 3,06–5,0 mg, molibdenianu (VI) amonu 2,35–7,06 mg i wyjściowym pH 4,5–5,23, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzi hodowlę wstrząsaną na wytrząsarce przy szybkości obrotowej 150–220 minut⁻¹, przy stopniu wypełnienia kolb 10–30%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 84–252 godzin. Otrzymaną ciecz pohodowlaną oddziela się poprzez sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymany przesącz zagęszcza się pod próżnią w temperaturze 30°C lub metodą ultrafiltracji w temperaturze 25°C.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

Przykład 1

Szczep *Alternaria sp.* AK0911 uaktywniano w czasie 6 dni w temperaturze 28°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzeczkę słodowej o stężeniu 8,5°Bx i 20 części wagowych agaru, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 8,23 g glukozy, 0,87 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 0,245 g siarczanu (VI) magnezu, 0,096 g chlorku wapnia, 2,28 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 5 g azotanu (V) sodu, 3,03 mg siarczanu (VI) cynku, 0,47 g chlorku

potasu, 3,82 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 39,96 mg siarczanu (VI) manganu (II), 3,13 mg siarczanu (VI) kobaltu, 5,89 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 5,11, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 180 minut⁻¹, przy stopniu wypełnienia kolb 10%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 191 godzin. Ciecz pochodzącą otrzymaną w wyniku hodowli przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem przez lejek Schotta ze spiekami szklanym G3.

Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 966,67, peroksydaz ligninowych – 5,46, peroksydaz manganozależnych – 2,27.

Przykład 2

Szczep *Alternaria* sp AK0911 uaktywniano w czasie 3 dni w temperaturze 32°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzożki słodowej o stężeniu 8,5 °Bx, 20 części wagowych agaru i 0,6 części wagowych gwajakolu, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłoża hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 7,87 g glukozy, 0,84 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 0,245 g siarczanu (VI) magnezu, 95,88 mg chlorku wapnia, 2,19 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 2,73 g azotanu (V) sodu, 3,07 mg siarczanu (VI) cynku, 0,46 g chlorku potasu, 3,94 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 21,83 mg siarczanu (VI) manganu (II), 3,21 mg siarczanu (VI) kobaltu, 6,12 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 5,13, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 200 minut⁻¹, przy stopniu wypełnienia kolb 20%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 196 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 1458,33, peroksydaz ligninowych – 1,71, peroksydaz manganozależnych – 1,11.

Przykład 3

Szczep *Alternaria* sp AK0911 uaktywniano w czasie 6 dni w temperaturze 28°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121 °C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzożki słodowej o stężeniu 8,5°Bx, 20 części wagowych agaru i 0,8 części wagowych gwajakolu, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłoża hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 6,45 g glukozy, 0,74 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 0,245 g siarczanu (VI) magnezu, 93,13 mg chlorku wapnia, 1,83 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 2,55 g azotanu (V) sodu, 3,25 mg siarczanu (VI) cynku, 0,44 g chlorku potasu, 4,44 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 21,72 mg siarczanu (VI) manganu (II), 3,51 mg siarczanu (VI) kobaltu, 7,06 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 5,23, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 180 minut⁻¹, przy stopniu wypełnienia kolb 10%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 214 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 2391,67, peroksydaz ligninowych – 15,71, peroksydazy manganozależnych – 0,76.

Przykład 4

Szczep *Alternaria* sp AK 0911 uaktywniano w czasie 3 dni w temperaturze 32°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzożki słodowej o stężeniu 8,5°Bx, 20 części wagowych agaru, 0,6 części wagowych gwajakolu i 2 części wagowe ligniny alkalicznej, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłoża hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 15 g glukozy, 0,5 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 0,367 g siarczanu (VI) magnezu, 50 mg chlorku wapnia, 4,1 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 1,5 g azotanu (V) sodu, 4,21 mg siarczanu (VI) cynku, 0,25 g chlorku potasu, 4,79 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 20,1 mg siarczanu (VI) manganu (II), 4,14 mg siarczanu (VI) kobaltu, 2,35 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 5,0, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 150 minut⁻¹, przy stopniu wypełnienia kolb 25%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 84 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 166,67, peroksydaz ligninowych – 11,61, peroksydaz manganozależnych – 11,36.

Przykład 5

Szczep *Alternaria* sp AK0911 uaktywniano w czasie 6 dni w temperaturze 28°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzezki słodowej o stężeniu 8,5°Bx, 20 części wagowych agaru, 0,8 części wagowych gwajakolu i 3 części wagowe ligniny alkalicznej, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 15 g glukozy, 1,5 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 0,367 g siarczanu (VI) magnezu, 150 mg chlorku wapnia, 4,1 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 4,5 g azotanu (V) sodu, 4,21 mg siarczanu (VI) cynku, 0,75 g chlorku potasu, 4,79 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 60,31 mg siarczanu (VI) manganu (II), 4,14 mg siarczanu (VI) kobaltu, 2,35 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 5,00, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsną przy szybkości obrotowej 220 minut⁻¹, przy stopniu wypełnienia kolb 30%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 252 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 550,0, peroksydaz ligninowych – 9,9, peroksydaz manganozależnych – 0,76.

Przykład 6

Szczep *Alternaria* sp AK 0911 uaktywniano w czasie 3 dni w temperaturze 32°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzezki słodowej o stężeniu 8,5°Bx i 20 części wagowych agaru, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 5 g glukozy, 0,9 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 244,67 mg siarczanu (VI) magnezu, 97,25 mg chlorku wapnia, 2,37 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 2,87 g azotanu (V) sodu, 2,98 mg siarczanu (VI) cynku, 0,476 g chlorku potasu, 3,69 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 40 mg siarczanu (VI) manganu (II), 3,06 mg siarczanu (VI) kobaltu, 5,65 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 5,08, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsną przy szybkości obrotowej 150 minut⁻¹, przy stopniu wypełnienia kolb 20%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 186 godzin.

Dalej postępowano jak w przykładzie 1. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 816,67, peroksydaz ligninowych – 3,07, peroksydaz manganozależnych – 1,52.

Przykład 7

Szczep *Alternaria* sp AK 0911 uaktywniano w czasie 6 dni w temperaturze 28°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzezki słodowej o stężeniu 8,5°Bx, 20 części wagowych agaru i 3 części wagowe ligniny alkalicznej, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono uprzednio wysterylizowane, w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody destylowanej zawierającej 10 g glukozy, 0,5 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 0,122 g siarczanu (VI) magnezu, 0,034 g chlorku wapnia, 0,91 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 2,5 g azotanu (V) sodu, 1,404 mg siarczanu (VI) cynku, 0,25 g chlorku potasu, 2,5 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 20,104 mg siarczanu (VI) manganu (II), 5 mg siarczanu (VI) kobaltu, 5 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 4,5, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsną przy szybkości obrotowej 180 minut⁻¹, przy stopniu wypełnienia kolb 20%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 120 godzin. Ciecz pohodowlaną otrzymaną w wyniku hodowli przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem przez lejek Schotta ze spiekem szklanym G3 i zagęszczono 10-krotnie metodą ultrafiltracji w systemie Sartorium Vivaflow 50 w filtrach polisulfonowych o przepływie krzyżowym o masie odcięcia 5000 MCWO w temperaturze 25°C. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 3010,5, peroksydaz ligninowych – 131,14.

Przykład 8

Szczep *Alternaria* sp AK 0911 uaktywniano w czasie 3 dni w temperaturze 32°C na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzezki słodowej o stężeniu 8,5°Bx, 20 części wagowych agaru i 2 części wagowe ligniny alkalicznej, po czym sporządzono zawiesinę zarodników tego szczepu zmywając skos agarowy 50 ml 0,89% roztworu NaCl. Tak przygotowanym materiałem posiewowym zaszczepiono, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłoże hodowlane w postaci 1000 ml wody

destylowanej zawierającej 11 g glukozy, 1 g wodorofosforanu (V) dipotasu, 0,244 g siarczanu (VI) magnezu, 0,1 g chlorku wapnia, 2,73 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 3 g azotanu (V) sodu, 2,808 mg siarczanu (VI) cynku, 0,5 g chlorku potasu, 5 mg siarczanu (VI) miedzi (II), 40,207 mg siarczanu (VI) manganu (II), 4,52 mg siarczanu (VI) kobaltu, 3,69 mg molibdenianu (VI) amonu i wyjściowym pH 4,5 stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej 180 minut⁻¹, przy stopniu wypełnienia kolb 20%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 120 godzin. Ciecz pohodowlaną otrzymaną w wyniku hodowli przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem przez lejek Schotta ze spiekim szklanym G3 i zagęszczono 10-krotnie w obrotowej wyparce próżniowej w temperaturze 30°C przy szybkości obrotowej wyparki 120 minut⁻¹. Uzyskano preparat enzymatyczny o aktywnościach [nkat/l]: lakaz – 4916,67, peroksydaz ligninowych – 295,56.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób otrzymywania preparatu enzymów oksydoredukcyjnych, zawierającego lakazy, peroksydazy ligninowe i peroksydazy manganozależne, w drodze hodowli szczepu grzyba z rodzaju *Alternaria*, polegający na hodowli materiału posiewowego na wysterylizowanym podłożu zawierającym brzeczkę słodową, zaszczepieniu tym materiałem wysterylizowanego ciekłego podłoża produkcyjnego zawierającego glukozę i sole mineralne i prowadzeniu hodowli produkcyjnej wgłębniej w warunkach sterylnych, a po jej zakończeniu wyodrębnieniu i zagęszczeniu otrzymanej cieczy pohodowlanej, **znamienny tym**, że stosuje się szczep grzyba nitkowatego *Alternaria sp.* AK0911, z którego sporządza się materiał posiewowy na, wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłożu stałym zawierającym na 1000 części wagowych breczki słodowej o stężeniu 8,5°Bx 20 części wagowych agaru lub 20 części wagowych agaru i 0,6–0,8 części wagowych gwajakolu lub 20 części wagowych agaru i 2–3 części wagowych ligniny alkalicznej, bądź 20 części wagowych agaru, 2–3 części wagowych ligniny alkalicznej i 0,6–0,8 części wagowych gwajakolu, w temperaturze 28–32°C w czasie 3–6 dni, następnie zmywa się skos agarowy 0,89% roztworem chlorku sodowego i tak przygotowanym materiałem posiewowym szczepi się, wysterylizowane w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, ciekłe podłoże produkcyjne zawierające w 1000 ml wody destylowanej glukozy 5–15 g, wodorofosforanu (V) dipotasu 0,5–1,5 g, siarczanu (VI) magnezu 0,122–0,367 g, chlorku wapnia 0,034–0,15 g, siarczanu (VI) żelaza (II) 0,91–4,1 mg, azotanu (V) sodu 1,5–5 g, siarczanu (VI) cynku 1,4–4,21 mg, chlorku potasu 0,25–0,75 g, siarczanu (VI) miedzi (II) 2,5–5 mg, siarczanu (VI) manganu (II) 20,1–60,31 mg, siarczanu (VI) kobaltu 3,06–5,0 mg, molibdenianu (VI) amonu 2,35–7,06 mg i wyjściowym pH 4,5–5,23, stosując 1 ml materiału posiewowego na 100 ml podłoża i prowadzi hodowlę wstrząsaną na wytrząsarce przy szybkości obrotowej 150–220 min⁻¹, przy stopniu wypełnienia kolb 10–30%, w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 84–252 godzin, a otrzymaną ciecz pohodowlaną oddziela się poprzez sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymany przesącz zagęszcza się pod próżnią w temperaturze 30°C lub metodą ultrafiltracji w temperaturze 25°C.

