

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **221763**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **398611**

(22) Data zgłoszenia: **26.03.2012**

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/685 (2006.01)

A61L 2/20 (2006.01)

A61L 101/10 (2006.01)

(54) **Sposób wyjąławiania i modyfikacji podłoży hodowlanych stosowanych
w hodowli selektantów pleśni *Aspergillus niger***

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
30.09.2013 BUP 20/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.05.2016 WUP 05/16

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

TADEUSZ ANTCZAK, Łódź, PL

KRZYSZTOF ŚMIGIELSKI, Łódź, PL

STANISŁAW BIELECKI, Łódź, PL

RITA PYĆ, Łódź, PL

KRZYSZTOF KROSOWIAK, Łódź, PL

ALICJA KACZMAREK, Zduńska Wola, PL

TOMASZ RAMIĘGA, Łódź, PL

MIROSŁAWA SZCZĘSNA-ANTCZAK, Łódź, PL

RADOSŁAW WĄCHAŁA, Włocławek, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

PL 221763 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyjąławiania i modyfikacji podłoży hodowlanych stosowanych w hodowli selektantów pleśni *Aspergillus niger*, w wyniku której powstają preparaty enzymów zawierające w swym składzie enzymy pektynolityczne, celulazy, hemicelulazy w proporcjach korzystnych do prowadzenia procesu biorafinacji biomasy roślinnej.

Znane sposoby sterylizacji podłoży hodowlanych przeznaczonych do hodowli szczepów *Aspergillus Niger*, opisane w opisach patentowych PL 209161 i 209163, jak również w publikacjach: Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 1998, t. 20, s. 34–38, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2001, t. 26, s. 271–274, Process Biochemistry (2000), t. 36, s. 255–261, Process Biochemistry (2002), t. 37, s. 949–954 i Bioresource Technology 2004, t. 91, s. 153–156 polegają na określonej czasowo termicznej sterylizacji podłoża w środowisku nasyconej pary wodnej pod ciśnieniem równym 1000 hPa i w temperaturze 121°C.

Sposób ten jest procesem energochłonnym, wymagającym użycia kosztownych, ciśnieniowych urządzeń, co podwyższa koszt otrzymania preparatów enzymatycznych.

W opisie patentowym GB 1,148,279 opisano zastosowanie ozonu do wyjąławiania podłoży zawierających węglowodory stosowanych do hodowli drożdży.

Z opisu patentowego PL 210215 jest znane wyjąławianie podłoża melasowego w drodze ozonowania.

Z czasopisma Bioresource Technology, 2008, tom 99, s. 8265–8272 jest znane zastosowanie ozonu do wyjąławiania wód odpadowych po przerobie zboża, stosowanych jako podłoże do wytwarzania biomasy *Rhizopus oligosporus*.

W czasopiśmie Agro Przemysł, 2007 roku, tom 3, s. 27–29 opisano zastosowanie technologii ozonowania w przemyśle spożywczym i napojowym.

Znane jest, z czasopisma Gazeta Cukrownicza, 2004 roku, tom 9, s. 251–254, zastosowanie ozonu do odbarwiania syropów cukrowych.

W czasopiśmie International Journal of Dairy Technology, 2005 rok, tom 58, s. 19–24 porównano działanie ozonu, temperatury i chloru na przeżywalność bakterii zakażających żywność.

W czasopiśmie Journal of Food Protection, 1999, tom 9, s. 1071–1087 opisano zastosowanie ozonu do zwiększenia mikrobiologicznego bezpieczeństwa i jakości żywności.

W czasopiśmie Journal of Food Science, 2001 roku, tom 66, zeszyt 9, s. 1242–1252 opisano mikrobiologiczny aspekt zastosowania ozonu do zabezpieczania żywności, zaś w czasopiśmie Journal of Food Science, 2005 rok, tom 70, s. M197–M201 wykazano bójcze działanie ozonu na szczepy bakterii *Escherichia coli* i *Salmonella*.

Sposób wyjąławiania i modyfikacji podłoży hodowlanych stosowanych w hodowli selektantów pleśni *Aspergillus niger*, inokularnych i produkcyjnych ciekłych, zawierających kielki słodowe, pektynę jabłkową, celulozę mikrokrystaliczną lub wysłodki buraczane, ewentualnie pył bawełniany, ewentualnie wtyłki jabłkowe, ewentualnie otręby pszenne i/lub odpady przemysłu owocowo-warzywnego, a nadto wodę wodociągową zawierającą rozpuszczone składniki mineralne, oraz produkcyjnych stałych zawierających wysłodki buraczane, otręby pszenne, kielki słodowe, ewentualnie skórki z pomidorów lub odpady cytrusowe, ewentualnie pektynę jabłkową, a nadto wodę wodociągową zawierającą rozpuszczone składniki mineralne, z wykorzystaniem ozonu, według wynalazku polega na tym, że podłoże poddaje się działaniu mieszaniny ozonu i powietrza wprowadzanej w sposób ciągły przy ciśnieniu 500 hPa w temperaturze 19–20°C. Podłoże inokularne poddaje się działaniu mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 80–100 g/m³, wprowadzanej do kolb z tym podłożem przez spiek o porowatości G4, z prędkością 0,1–0,2 l/min w czasie 5–10 min. Ciekłe podłoże produkcyjne poddaje się działaniu mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 80–180 g/m³, wprowadzanej do fermentora z tym podłożem z prędkością 0,2–0,6 l/min w czasie 30 min przewodem przeznaczonym do napowietrzania podłoża w trakcie hodowli produkcyjnej, przy mieszaniu podłoża z szybkością obrotową 400 min⁻¹. Stałe podłoże produkcyjne poddaje się działaniu mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 90–180 g/m³, wprowadzanej do kolb z tym podłożem z prędkością 0,1–0,4 l/min w czasie 10 min, przy wstrząsaniu kolb co 15 s.

W wyniku hodowli selektantów pleśni *Aspergillus niger* na podłożach wyjąławionych sposobem według wynalazku otrzymuje się preparaty enzymów, jak celulazy (endo-1,4-β-glukanaza, egzocelobiohydrolaza, β-glukozydaza), pektynazy (polimetylogalakuronaza, pektynoesteraza, liaza

pektynowa) hemicelulazy (endo-1,4- β ksylanaza), o aktywnościach wyższych o 8–53%, w porównaniu z aktywnością preparatów otrzymanych w wyniku hodowli na podłożach sterylizowanych termicznie.

Stosując sposób wyjaławiania według wynalazku eliminuje się operację ogrzewania i schładzania podłoży konieczną w przypadku ich termicznej sterylizacji i skraca czas hodowli, co dodatkowo obniża koszt procesu wytwarzania enzymów w drodze tej hodowli.

Sposób według wynalazku ilustrują bliżej podane niżej przykłady.

Przykład I

Podłoże hodowlane o składzie: 22,9 g otrąb pszennych, 22,65 g wysłdków buraczanych, 19,25 g kielków słodowych, 6,39 g pektyny jabłkowej, 1000 ml wody wodociągowej zawierającej: 9,52 g diwodorofosforanu (V) potasu, 0,52 g siarczanu (VI) magnezu, 0,275 g chlorku wapnia, 9,505 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 0,44 mg siarczanu (VI) kobaltu, 0,48 mg siarczanu (VI) manganu, 0,77 mg siarczanu (VI) miedzi oraz 1,605 g mocznika i wyjściowym pH=4,4, w ilości 100 ml, wprowadzono do kolb o objętości 1000 ml i poddawano ozonowaniu za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 80 g/m³, wprowadzanej z prędkością 0,2 l/min przy nadciśnieniu 500 hPa, przez siek G4, w temperaturze 19–20°C, w czasie 10 min. Po 30 min od zakończenia sterylizacji podłoże inokularne szczepiono 3 ml zarodników szczepu *Asperigillus niger* IBT-90 uaktywnionego w czasie 5 dni w temperaturze 30°C, w sterylnym podłożu stałym zawierającym 1000 części wagowych brzezki słodowej o stężeniu 8°Bx i 30 części wagowych agaru i zmytymi ze skosu agarowego za pomocą 100 ml 0,85% roztworu NaCl, i prowadzono hodowlę wstrząsaną przy szybkości obrotowej wstrząsarki 220 min⁻¹, stopniu wypełnienia kolb 10% objętościowych, w zakresie temperatur 28–30°C w czasie 120 godzin. Ciecz pohodowlaną przefiltrowano przy użyciu przegrody filtracyjnej i zagęszczono dziesięciokrotnie w obrotowej wyparce próżniowej w temperaturze 40°C.

Uzyskano preparat enzymatyczny, który charakteryzował się aktywnością enzymów wyższą od aktywności enzymów preparatu otrzymanego na podłożu sterylizowanym termicznie: endo-1,4- β -glukanazy o 32%, β -glukozydazy o 42%, egzocelobiohydrolazy o 12%, FPA o 38%, endo-1,4- β -ksylanazy o 25%, poligalakturonazy o 38%, pektynoesterazy o 28%, ogólną aktywnością pektynolityczną o 32%.

Przykład II

Podłoże hodowlane o składzie: 5,0 g celulozy mikrokryształicznej, 60,0 g kielków słodowych, 60,0 g pektyny jabłkowej, 1000 ml wody wodociągowej zawierającej: 3,24 g diwodorofosforanu (V) potasu, 0,56 g siarczanu (VI) magnezu, 0,3 g chlorku wapnia, 9,77 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 0,53 mg siarczanu (VI) kobaltu, 1,52 mg siarczanu (VI) manganu, 0,18 g siarczanu (VI) cynku, 2,45 mg siarczanu (VI) miedzi oraz 1,459 g mocznika i wyjściowym pH=4,0, w ilości 100 ml, wprowadzono do kolb o objętości 1000 ml i poddano ozonowaniu za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 80 g/m³, wprowadzanej z prędkością 0,2 l/min przy nadciśnieniu 500 hPa, przez siek G4, w temperaturze 19–20°C, w czasie 10 min. Po 30 minutach od zakończenia sterylizacji podłoże szczepiono zarodnikami szczepu *Asperigillus niger* IBT-90 i prowadzono hodowlę jak w przykładzie I.

Uzyskano preparat enzymatyczny, który charakteryzował się aktywnością enzymów wyższą od aktywności enzymów preparatu otrzymanego na podłożu sterylizowanym termicznie: endo-1,4- β -glukanazy o 22%, β -glukozydazy o 31%, egzocelobiohydrolazy 14%, FPA o 30%, endo-1,4- β -ksylanazy o 18%, poligalakturonazy o 41%, pektynoesterazy o 19%, ogólną aktywnością pektynolityczną o 29%.

Przykład III

Podłoże hodowlane o składzie: 21,6 g wysłdków buraczanych, 95,8 g kielków słodowych, 49,0 g pektyny jabłkowej, 1000 ml wody wodociągowej zawierającej: 3,24 g diwodorofosforanu (V) potasu, 0,56 g siarczanu (VI) magnezu, 0,3 g chlorku wapnia, 9,77 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 0,53 mg siarczanu (VI) kobaltu, 1,52 mg siarczanu (VI) manganu, 0,18 mg siarczanu (VI) cynku, 2,45 mg siarczanu (VI) miedzi oraz 1,459 g mocznika i wyjściowym pH=4,0, w ilości 100 ml, wprowadzono do kolb o objętości 1000 ml i poddano ozonowaniu za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 80 g/m³, wprowadzanej z prędkością 0,2 l/min przy nadciśnieniu 500 hPa, przez siek G4, w temperaturze 19–20°C, w czasie 10 min. Po 30 minutach od zakończenia sterylizacji podłoże szczepiono zarodnikami szczepu *Asperigillus niger* IBT-90 prowadzono hodowlę jak w przykładzie I.

Uzyskano preparat enzymatyczny, który charakteryzował się aktywnością enzymów wyższą od aktywności enzymów preparatu otrzymanego na podłożu sterylizowanym termicznie: endo-1,4- β -glukanazy o 38%, β -glukozydazy o 27%, egzocelobiohydrolazy 8%, FPA – 39%, endo-1,4- β -

-ksylanazy o 26%, poligalakturonazy o 53%, pektynoesterazy o 11%, ogólną aktywnością pektynolityczną o 37%.

Przykład IV

Podłoże hodowlane o składzie: 5,0 g celulozy mikrokrystalicznej, 60,0 g kielków słodowych 60,0 g pektyny jabłkowej, 1000 ml wody wodociągowej zawierającej: 3,24 g diwodorofosforanu (V) potasu, 0,56 g siarczanu (VI) magnezu, 0,3 g chlorku wapnia, 9,77 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 0,53 mg siarczanu (VI) kobaltu, 1,52 mg siarczanu (VI) manganu, 0,18 g siarczanu (VI) cynku, 2,45 mg siarczanu (VI) miedzi oraz 1,459 g mocznika, w ilości 10 l, wprowadzono do fermentora o pojemności całkowitej 14 l poddano ozonowaniu za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 80 g/m^3 wprowadzanej z prędkością $0,2 \text{ l/min}$ przy nadciśnieniu 500 hPa w temperaturze $19\text{--}20^\circ\text{C}$ w czasie 30 min, za pomocą przewodu do doprowadzania powietrza do podłoża fermentora hodowli, przy mieszaniu mieszadłem z szybkością obrotową 120 min^{-1} , w temperaturze 20°C , następnie podgrzanego do temperatury 30°C i wysycanego sterylnym powietrzem przez 10 min. Podłoże szczepiono zarodnikami szczepu *Aspergillus niger* IBT-90 przygotowanymi i w ilości jak w przykładzie I, po czym prowadzono hodowlę produkcyjną w warunkach wglębnych, w temperaturze 28°C , w czasie 120 godz., w obecności emulsji silikonowej dodanej w ilości 0,02% v/v objętości podłoża. W czasie hodowli produkcyjnej doprowadzano do fermentora sterylne powietrze w ilości 1 część objętościowa na 1 część objętościową podłoża, przy czym podłoże hodowlane mieszano przy pomocy mieszadła turbinowego obracającego się z szybkością obrotową 400 min^{-1} . Ciecz pohodowlaną, otrzymaną w wyniku hodowli produkcyjnej przefiltrowano przy użyciu przegrody filtracyjnej i zagęszczono dziesięciokrotnie w obrotowej wyparce próżniowej w temperaturze 40°C .

Uzyskano preparat enzymatyczny, który charakteryzował się aktywnością enzymów wyższą od aktywności enzymów preparatu otrzymanego na podłożu sterylizowanym termicznie: endo-1,4- β -glukanazy o 24%, β -glukozydazy o 27%, egzocelobiohydrolazy o 8%, FPA o 39%, endo-1,4- β -ksylanazy o 26%, poligalakturonazy o 53%, pektynoesterazy o 11%, ogólną aktywnością pektynolityczną o 37%.

Przykład V

Inokularne podłoże hodowlane o składzie w przykładzie II wprowadzono, w ilości 10 l, do fermentora o objętości całkowitej 14 l i poddawano ozonowaniu za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 80 g/m^3 wprowadzanej z prędkością $0,2 \text{ l/min}$ przy nadciśnieniu 500 hPa, w temperaturze $19\text{--}20^\circ\text{C}$ w czasie 30 min, za pomocą przewodu do doprowadzania powietrza do podłoża hodowli, mieszanego mieszadłem z szybkością obrotową 120 min^{-1} , w temperaturze 20°C , następnie podgrzanego do temperatury 30°C i wysycanego sterylnym powietrzem przez 10 min. Następnie podłoże szczepiono zarodnikami szczepu *Aspergillus niger* IBT-90 przygotowanymi w ilości jak w przykładzie I, po czym prowadzono binokularną hodowlę w czasie 24 godz. w warunkach jak w przykładzie IV. Podłoże hodowlane produkcyjne o składzie w częściach wagowych jak w przykładzie II wprowadzono w ilości 80 l do fermentora produkcyjnego o objętości 130 l i poddawano ozonowaniu za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 80 g/m^3 wprowadzanej z prędkością $0,2 \text{ l/min}$ przy nadciśnieniu 500 hPa w temperaturze $19\text{--}20^\circ\text{C}$ w czasie 30 min, za pomocą przewodu doprowadzającego powietrze do podłoża fermentora hodowli, mieszanego mieszadłem z szybkością obrotową 120 min^{-1} , w temperaturze 20°C , następnie podgrzanego do temperatury 30°C , wysycanego sterylnym powietrzem przez 10 min i zaszczerpionego podłożem inokularnym użytym w ilości 10% v/v, po czym prowadzono hodowlę produkcyjną w warunkach wglębnych w temperaturze 28°C w czasie 120 godz., w obecności emulsji silikonowej dodanej w ilości 0,02% v/v w stosunku do objętości podłoża. W czasie hodowli produkcyjnej doprowadzano do fermentora sterylne powietrze w ilości 1 część objętościowa na 1 część objętościową podłoża w czasie 1 min, przy czym podłoże hodowlane mieszano przy pomocy mieszadła turbinowego obracającego się z szybkością 220 min^{-1} . Ciecz pohodowlaną otrzymaną w wyniku hodowli produkcyjnej przefiltrowano przy użyciu prasy filtracyjnej marki Sartorius i zagęszczono dziesięciokrotnie w obrotowej wyparce próżniowej w temperaturze 40°C .

Uzyskano preparat enzymatyczny, który charakteryzował się aktywnością enzymów wyższą od aktywności enzymów preparatu otrzymanego na podłożu sterylizowanym termicznie: endo-1,4- β -glukanazy o 35%, β -glukozydazy o 13%, egzocelobiohydrolazy o 9%, FPA o 48%, endo-1,4- β -ksylanazy o 31%, poligalakturonazy o 45%, pektynoesterazy o 17%, ogólną aktywnością pektynolityczną o 45%.

Przykład VI

Podłoże hodowlane o składzie: 61,1 g suchej substancji wyśłodków buraczanych, 53,3 g suchej substancji otrąb pszennych, 78,1 g suchej substancji kielków słodowych, 7,5 g suchej substancji pektyny jabłkowej, 800 ml wody wodociągowej zawierającej 3,584 g diwodorofosforanu (V) potasu, 0,688 g siarczanu (VI) magnezu, 0,08 g chlorku wapnia, 4,616 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 0,184 mg siarczanu (VI) kobaltu, 0,816 mg siarczanu (VI) manganu, 0,224 mg siarczanu (VI) cynku, 2,904 mg siarczanu (VI) miedzi oraz 0,6072 g mocznika, wprowadzano do kolb Erlenmayera o pojemności 1 l zawierających 20 g stałych składników podłoża o wilgotności 80%, poddawano ozonowaniu za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 90 g/m^3 , wprowadzanej z prędkością 0,4 l/min przy nadciśnieniu 500 hPa, przez 10 min, w temperaturze $19\text{--}20^\circ\text{C}$, wstrząsając co 15 s umieszczone w niej stałe podłoże hodowlane. Po czasie 20 min od zakończenia procesu sterylizacji, podłoże szczepiono zarodnikami grzyba nitkowego *Aspergillus niger* IBT-90 stosując 1,5 ml materiału posiewowego na 100 g podłoża stałego, otrzymanego jak w przykładzie I. Hodowlę produkcyjną prowadzono w temperaturze $28\text{--}30^\circ\text{C}$ w czasie 5 dni mieszając podłoże stałe co 12 godz. Po zakończeniu hodowli masę podłoża uzupełniono wodą do masy 300 g, wprowadzono detergent o nazwie firmowej Tween 20 w ilości 0,5% w stosunku do masy wprowadzonej wody i prowadzono ekstrakcję enzymów w czasie 30 min mieszając całość na mieszadło z szybkością 200 min^{-1} . Następnie mieszaninę sączono na przegrodzie filtracyjnej i zagęszczano w temperaturze 40°C w wyparce próżniowej. Uzyskano preparat enzymatyczny, który charakteryzował się aktywnością enzymów wyższą od aktywności enzymów preparatu otrzymanego na podłożu sterylizowanym termicznie: endo-1,4- β -glukanazy o 28%, β -glukozydazy o 12%, egzocelobiohydrolazy o 12%, FPA o 51%, endo-1,4- β -ksylanazy o 35%, poligalakturonazy o 38%, pektynoesterazy o 8%, ogólną aktywnością pektynolityczną o 30%.

Przykład VII

Podłoże hodowlane o składzie: 47,2 g suchej substancji wyśłodków buraczanych, 49,9 g suchej substancji otrąb pszennych, 79,2 g suchej substancji kielków słodowych, 9,20 g suchej substancji skórek z pomidorów, 14,5 g suchej substancji pektyny jabłkowej oraz 800 ml wody wodociągowej zawierającej 3,584 g diwodorofosforanu (V) potasu, 0,688 g siarczanu (VI) magnezu, 0,08 g chlorku wapnia, 4,616 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 0,184 mg siarczanu (VI) kobaltu, 0,816 mg siarczanu (VI) manganu, 0,224 mg siarczanu (VI) cynku, 2,904 mg siarczanu (VI) miedzi oraz 0,6072 g mocznika, wprowadzano do kolb Erlenmayera o pojemności 1 l, zawierających 20 g stałych składników podłoża o wilgotności 80% i poddawano ozonowaniu za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 90 g/m^3 , wprowadzanej z prędkością 0,4 l/min przy nadciśnieniu 500 hPa przez 10 min w temperaturze $19\text{--}20^\circ\text{C}$, do kolb wstrząsając co 15 s umieszczone w niej stałe podłoże hodowlane. Po czasie 20 min od zakończenia procesu sterylizacji podłoże szczepiono zarodnikami grzyba nitkowego *Aspergillus niger* IBT-90 jak w przykładzie V. Hodowlę produkcyjną prowadzono jak w przykładzie V. Ekstrakcję enzymów prowadzono metodą opisaną w przykładzie V stosując detergent o nazwie firmowej Sulforokanol w ilości 0,1% w stosunku do masy wprowadzonej wody.

Uzyskano preparat enzymatyczny, który charakteryzował się aktywnością enzymów wyższą od aktywności enzymów preparatu otrzymanego na podłożu sterylizowanym termicznie: endo-1,4- β -glukanazy o 37%, β -glukozydazy o 13%, egzocelobiohydrolazy o 11%, FPA o 32%, endo-1,4- β -ksylanazy o 29%, poligalakturonazy o 32%, pektynoesterazy o 8%, ogólną aktywnością pektynolityczną o 46%.

Przykład VIII

Podłoże hodowlane o składzie: 52,2 g suchej substancji wyśłodków buraczanych, 51,0 g suchej substancji otrąb pszennych, 67,5 g suchej substancji kielków słodowych, 29,3 g suchej substancji odpadów cytrusowych, 800 ml wody wodociągowej zawierającej: 6,358 g diwodorofosforanu (V) potasu, 1,215 g siarczanu (VI) magnezu, 0,239 g chlorku wapnia, 5,886 mg siarczanu (VI) żelaza (II), 0,616 mg siarczanu (VI) kobaltu, 0,454 mg siarczanu (VI) manganu, 0,699 mg siarczanu (VI) miedzi oraz 1,669 g mocznika, wprowadzano do kolb Erlenmayera o pojemności 1 l zawierających 20 g stałych składników podłoża o wilgotności 80% i poddawano ozonowaniu za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 90 g/m^3 , wprowadzanej z prędkością 0,4 l/min przy nadciśnieniu 500 hPa przez 10 min w temperaturze $19\text{--}20^\circ\text{C}$ do kolby wstrząsając co 15 s umieszczone w niej stałe podłoże hodowlane. Po czasie 20 min od zakończenia procesu sterylizacji, podłoże szczepiono zarodnikami grzyba nitkowego *Aspergillus niger* IBT-90 jak w przykładzie V. Hodowlę produkcyjną prowadzono jak w przykładzie V. Ekstrakcję enzymów prowadzono metodą opisaną w przykładzie V stosując detergent o nazwie firmowej Tween 20 w ilości 0,5% w stosunku do masy wprowadzonej wody.

Uzyskano preparat enzymatyczny, który charakteryzował się aktywnością enzymów wyższą od aktywności enzymów preparatu otrzymanego na podłożu sterylizowanym termicznie: endo-1,4- β -glukanaza o 29%, β -glukozydazy o 14%, egzocelobiohydrolazy o 11%, FPA o 34%, endo-1,4- β -ksylanazy o 34, poligalakturonazy o 32%, pektynoesterazy o 8%, ogólną aktywnością pektynolityczną o 41%.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wyjaławiania i modyfikacji podłoży hodowlanych stosowanych w hodowli selektantów pleśni *Aspergillus niger*, inokularnych i produkcyjnych ciekłych, zawierających kielki słodowe, pektynę jabłkową, celulozę mikrokryształiczną lub wysłodki buraczane, ewentualnie pył bawełniany, ewentualnie wytloki jabłkowe, ewentualnie otręby pszenne i/lub odpady przemysłu owocowo-warzywnego, a nadto wodę wodociągową zawierającą rozpuszczone składniki mineralne, oraz produkcyjnych stałych zawierających wysłodki buraczane, otręby pszenne, kielki słodowe, ewentualnie skórki z pomidorów lub odpady cytrusowe, ewentualnie pektynę jabłkową, a nadto wodę wodociągową zawierającą rozpuszczone składniki mineralne, z wykorzystaniem ozonu, **znamienny tym**, że podłoże poddaje się działaniu mieszaniny ozonu i powietrza wprowadzanej w sposób ciągły przy ciśnieniu 500 hPa w temperaturze 19–20°C, przy czym podłoże inokulacyjne poddaje się działaniu mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 80–100 g/m³, wprowadzanej do kolb z tym podłożem przez spiek o porowatości G4, z prędkością 0,1–0,2 l/min w czasie 5–10 min, ciekłe podłoże produkcyjne poddaje się działaniu mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 80–180 g/m³, wprowadzanej do fermentora z tym podłożem z prędkością 0,2–0,6 l/min w czasie 30 min przewodem przeznaczonym do napowietrzania podłoża w trakcie hodowli produkcyjnej, przy mieszaniu podłoża z szybkością obrotową 400 min⁻¹, zaś stałe podłoże produkcyjne poddaje się działaniu mieszaniny ozonu i powietrza o zawartości ozonu 90–180 g/m³, wprowadzanej do kolb z tym podłożem z prędkością 0,1–0,4 l/min w czasie 10 min, przy wstrząsaniu kolb co 15 s.