

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) RU⁽¹¹⁾

2228954⁽¹³⁾ C2

(51) МПК⁷ C12N9/00, C12N9/96

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 27.09.2016 - прекратил действие
Пошлина: учтена за 7 год с 07.05.2008 по 06.05.2009

(21), (22) Заявка: **2002112275/132002112275/13,**
06.05.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.05.2002

(43) Дата публикации заявки: **10.02.2004**

(45) Опубликовано: **20.05.2004**

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **ГРАЧЕВА И.М. Технология ферментных
препаратов. -М.: В. Агропромиздат, 1987, с.
144-147. КАЛУНЯНЦ К.А., ГОЛГЕР Л.И.
Микробные ферментные препараты. - М.:
Пищевая промышленность. 1979, с. 118 и 119.
ЯРОВЕНКО В.Л. и др. Производство
ферментных препаратов из грибов и бактерий.
- М.: Пищевая промышленность, 1970, с.
255-257.**

Адрес для переписки:

**167982, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая,
24, Коми научный центр Уральского отделения
РАН, патентно-лицензионный отдел**

(72) Автор(ы):
Селиванов А.С. (RU)

(73) Патентообладатель(и):
**Институт биологии Коми научного центра
Уральского отделения РАН (RU)**

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОТЕРЬ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА ПРИ ТЕПЛОВОМ
ОБЕЗВОЖИВАНИИ ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой способ определения потерь активности ферментов при тепловом обезвоживании ферментных растворов. Способ определения потерь активности ферментов при тепловом обезвоживании ферментных растворов заключается в том, что раствор ферментного препарата различных концентраций и раствора для имитации процесса наносят на металлическую сетку с разными размерами ячеек и высушивают в регулируемых условиях, моделирующих процесс обезвоживания. Изобретение обеспечивает подбор оптимальных параметров процесса теплового обезвоживания, стабилизаторов и уменьшение расхода ферментного препарата (25,0-50,0 мл раствора) при обезвоживании ферментных растворов. 1 табл.

Изобретение относится к микробиологической промышленности, биотехнологии, в частности к способам получения обезвоженных ферментных препаратов, и может быть использовано в медицинской, микробиологической промышленности и биотехнологии.

Известно, что с помощью теплового обезвоживания обрабатывают большие массы ферментных растворов и получают измельченный сухой препарат. Сохранение активности фермента при тепловом обезвоживании [Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. М., ВО Агропромиздат, 1987, с.144-147] зависит от источника получения ферментного препарата, pH раствора ферментного препарата, концентрации сухих веществ и стабилизаторов или наполнителей в высушиваемой жидкости, длительности пребывания препарата в сушильной башне и температуры теплоносителя. Определение оптимальных условий и режимов сушки ферментных растворов производится опытным путем для каждого конкретного ферментного препарата в сушильном аппарате.

Основным недостатком определения оптимальных условий и режимов при обезвоживании раствора ферментного препарата является то, что в процессе обезвоживания используются сушильные аппараты, предусматривающие большой расход раствора ферментных препаратов.

Технический результат настоящего изобретения состоит в разработке способа определения потерь активности фермента при тепловом обезвоживании ферментных растворов для получения оптимальных параметров процесса теплового обезвоживания, подбора стабилизаторов и уменьшении расхода ферментного препарата (25,0-50,0 мл раствора).

Сущность предлагаемого способа заключается в следующем.

Способ определения потерь активности фермента при тепловом обезвоживании предусматривает имитацию процесса обезвоживания: ферментные растворы или растворы обезвоживаемых веществ, нанесенных на проволочную сетку из нержавеющей металла (например, нержавеющей стали, латуни) с различными размерами ячейки сетки от 0,3 мм до 1,0 мм, дающие разные соотношения массы раствора к площади поверхности испарения, приводят в контакт с высушивающим агентом в рабочей камере электрических печей с различной температурой высушивающего агента и различным временем контакта раствора. Далее сравнивая активность фермента на сетке в растворе до сушки и в высушенном препарате, определяют потери активности фермента при тепловом обезвоживании и по результатам изменения активности осуществляют подбор оптимальных условий теплового обезвоживания ферментных растворов.

Для определения точности набора объема раствора сетками с различными ячейками опыт проводят с карбонатом натрия Na_2CO_3 , не подвергающегося в процессе обезвоживания количественным изменениям. Для определения содержания в растворе карбоната натрия Na_2CO_3 используют методику титрования карбоната натрия стандартным раствором хлористоводородной кислоты. Сетки из нержавеющей стали размером ячейки $D=1,0$ мм и латуни размером ячейки $D=0,315$ мм погружают в раствор Na_2O_3 с титром, определенным титрованием стандартным раствором хлористоводородной кислоты. Далее с сеток с нанесенным раствором в горизонтальном положении снимают избыток жидкости фильтровальной бумагой по краям проволочной рамки из нержавеющей проволоки с диаметром проволоки $D=1,0$ мм и высушивают в муфельной печи при температуре 150° в течение 3 минут. После этого высушенный карбонат натрия с сетки растворяют в 25 мл дистиллированной воды в прямоугольных ячейках размером $100 \times 25 \times 10$ мм и определяют количество Na_2CO_3 перенесенного сеткой титрованием стандартным раствором хлористоводородной кислоты. Одновременно с опытным определением проводят контрольное определение количества Na_2CO_3 перенесенного сеткой на той же сетке, исключая процесс сушки. После проведения статистической обработки результатов 10 опытов установили, что количество вещества переносимого сетками раствора соответствуют как в контрольном, так и опытном варианте. Объем раствора удерживаемого сеткой составляет для сетки с размером ячейки 1,0 мм $0,2878 \pm 0,005$ мл или $0,2878 \pm 1,8\%$, аналогично для сетки с размером ячейки 0,315 мм $0,2228 \pm 0,006$ мл или $0,2228 = 2,7\%$.

Пример 1

В раствор фермента целлюлаз, полученный путем очистки фильтрата культуральной жидкости продуцента целлюлаз гриба *Trichoderma viride* методами микро - и ультрафильтрации с активностью по фильтровальной бумаге 11,0 ед/мл (метод Мандельс-Вебера) опускают сетки из нержавеющей стали размером ячейки $D=1,0$ мм и латуни размером ячейки $D=0,315$ мм. Далее с сеток с нанесенным раствором в горизонтальном положении снимают избыток жидкости фильтровальной бумагой по краям проволочной рамки из нержавеющей проволоки с диаметром проволоки $D=1,0$ мм и высушивают в муфельной печи при температуре 150° в течение 3 минут. После этого высушенный ферментный препарат с сетки растворяют в 25 мл дистиллированной воды в прямоугольных ячейках размером

100x25x10 мм и определяют активность ферментного препарата.

Одновременно с опытным определением проводят контрольное определение активности ферментного препарата на той же сетке, исключая процесс сушки. Разница активности ферментного препарата контрольной и опытной проб показывает степень инактивации ферментного препарата в процессе обезвоживания. Сравнивая активность фермента на сетке в растворе до сушки и в высушенном препарате после сушки, определяют потери активности при тепловом обезвоживании. Результаты эксперимента приведены в строке 1 таблицы.

Пример 2

Эксперимент проводят аналогично примеру 1, но вместо раствора фермента целлюлаз с активностью по фильтровальной бумаге 11,0 ед/мл (метод Мандельс-Вебера) используют раствор фермента целлюлаз с активностью 20,0 ед/мл по фильтровальной бумаге. Результаты эксперимента приведены в строке 2 таблицы.

Пример 3

Эксперимент проводят аналогично примеру 1, но вместо высушивания в муфельной печи при температуре 150°C в течение 3 минут высушивают при температуре 60°C в течение 10 минут. Результаты эксперимента приведены в строке 3 таблицы.

Пример 4

Эксперимент проводят аналогично примеру 1, но в раствор фермента вносят дополнительно сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в количестве 1,0 мг/мл. Результаты эксперимента приведены в строке 4 таблицы.

Пример 5

Эксперимент проводят аналогично примеру 1, но в раствор фермента вносят дополнительно сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в количестве 50,0 мг/мл. Результаты эксперимента приведены в строке 5 таблицы.

Пример 6

Эксперимент проводят аналогично примеру 1, но в раствор фермента вносят дополнительно карбоксиметилцеллюлозу (КМ-целлюлоза) в количестве 1,0 мг/мл. Результаты эксперимента приведены в строке 6 таблицы.

Пример 7

Эксперимент проводят аналогично примеру 1, но вместо раствора фермента целлюлаз используют раствор фермента пектиназ, полученный путем очистки фильтрата культуральной жидкости продуцента пектиназ гриба *Aspergillus foetidus* методами микро - и ультрафильтрации с пектолитической активностью при каталитическом расщеплении пектина ед/мл (интерферометрический метод). Одновременно с опытным определением проводят контрольное определение активности ферментного препарата на той же сетке, исключая процесс сушки. Разница активности ферментного препарата контрольной и опытной проб показывает степень инактивации ферментного препарата в процессе обезвоживания. Сравнивая активность фермента на сетке в растворе до сушки и в высушенном препарате после сушки, определяют потери активности при тепловом обезвоживании. Результаты эксперимента приведены в строке 7 таблицы.

№ п/п	Наименование материала, вносимого в раствор	Концен- трация вносимого материала в раствор фермента, мг/мл	Размер ячейки сетки, мм	Активность раствора фермента, ед/мл	Тепловое обезвоживание раствора фермента	
					Выход препарата по активности, %	Потери активности, %
1.	Фермент целлюлаза	-	1,0	11,0	46,0	54,0
		-	0,315	11,0	24,0	76,0
2.	Фермент целлюлаза	-	1,0	20,0	30,0	70,0
		-	0,315	20,0	16,0	84,0
3.	Фермент целлюлаза	-	1,0	11,0	64,0	36,0
		-	0,315	11,0	60,0	40,0
4.	Фермент целлюлаза и стабилизатор (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0	1,0	11,0	69,0	31,0
		1,0	0,315	11,0	32,0	68,0
5.	Фермент целлюлаза и стабилизатор (NH ₄) ₂ SO ₄	50,0	1,0	11,0	29,0	71,0
		50,0	0,315	11,0	14,0	86,0
6.	Фермент целлюлаза и стабилизатор КМ- целлюлоза	1,0	1,0	11,0	66,0	34,0
		1,0	0,315	11,0	43,0	57,0
7.	Фермент пектиназа	-	1,0	12,0	52,0	48,0
		-	0,315	12,0	31,0	69,0

Таким образом, с использованием предлагаемой методики для растворов ферментов возможно подобрать эффективные стабилизаторы, предохраняющие ферменты от инактивации в процессе обезвоживания при действии высоких температур и получения препаратов ферментов со стабилизацией в процессе сушки. Данный способ дает возможность уменьшения потерь ферментативной активности на одной из основных стадий процесса получения препарата ферментов, соответственно удешевления получаемого продукта за счет получения дополнительного продукта, уменьшения объема и исключения из процесса некоторых материалов.

Данная методика позволяет работать с небольшими количествами термолабильных ферментных препаратов и биологически активных веществ, может применяться для получения оптимальных параметров процесса теплового обезвоживания растворов ферментных препаратов, выбора способа обезвоживания и стабилизаторов, способствующих уменьшению потерь ферментативной активности при тепловом обезвоживании с применением различных температур процесса, времени процесса и различными соотношениями массы раствора к площади поверхности испарения, для процесса сушки распылением.

Формула изобретения

Способ определения потерь активности фермента при тепловом обезвоживании ферментных

растворов, заключающийся в имитации процесса теплового обезвоживания ферментных растворов путем нанесения ферментного раствора на проволочную сетку из нержавеющей металла с размером ячейки $D = 1,0$ мм или $D = 0,315$ мм, высушивании при различных температурных значениях высушиваемого агента и продолжительности сушки, определении активности фермента на сетке в растворе до сушки и в высушенном препарате, а по результатам изменения активности ферментного препарата определяют потери активности при тепловом обезвоживании.

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **07.05.2009**

Дата публикации: [10.12.2011](#)
