

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) RU<sup>(11)</sup>2239657<sup>(13)</sup> C2

(51) МПК 7 C12N9/62  
C12N9/62, C12R1:66

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 27.09.2016 - прекратил действие  
Пошлина: учтена за 6 год с 22.10.2007 по 21.10.2008

(21), (22) Заявка: **2002128157/13, 21.10.2002**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**21.10.2002**(45) Опубликовано: **10.11.2004**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **КОВАЯШИ Т. et al. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of Bacillus. Biosci., Biotechnol., Biochem., 65(4), p.842-847, 2001. RU 2000101050 A, 27.11.2001. RU 2072691 C1, 27.01.1997. КАЛУНЯНЦ К.А. и др. Микробные ферментные препараты. Технология и оборудование. - М.: Пищевая промышленность, 1979, с.10-12. ГРАЧЕВА И.М. и др. Технология ферментных препаратов. 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Элевар, 2000, с.236.**

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

**Донцов А.Г. (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения РАН (RU)**

## (54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ПЕКТОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, гидролизной промышленности и виноделия и предназначено для получения очищенного пектолитического ферментного препарата. Способ включает концентрирование культуральной жидкости или неочищенного ферментного препарата из *Aspergillus foetidus*, стабилизацию, проводимую добавлением многоатомного спирта, комплексообразователя и любого неактивного белка с молекулярной массой выше 15 кДа. Ультрафильтрацию проводят при 35-40°C и при постоянном добавлении ацетатного буферного раствора, содержащего многоатомный спирт и комплексообразователь. Ферменты выделяют сильнокислотной катионообменной смолой с последующей их десорбцией, обессоливанием диафильтрацией и лиофильно сушат. Способ позволяет получить пектолитический ферментный препарат с более высокой степенью очистки и с высоким выходом по активности, а также увеличить удельную активность ферментов более чем в 20 раз. 4 з.п.ф-лы, 1 табл.

Изобретение относится к области биотехнологии, гидролизной промышленности и виноделия и предназначено для получения с высоким выходом пектолитического ферментного препарата из *Aspergillus foetidus*, пригодного для исследования структуры растительных пектинов методом ферментативного гидролиза, для переработки и утилизации растительного сырья с целью получения олиго- и моносахаридов, для удаления винного камня и осветления лучших сортов вин.

Известен способ очистки полигалактуроназы (прототип), включающий осветление культуральной жидкости центрифугированием, ее концентрирование в 5 раз при 5°C с помощью ультрафильтрации на полволоконном модуле с пределом пропускания 13 кДа с последующей очисткой и выделением методами ионообменной и гель-проникающей хроматографии с получением препарата в 20%-ном растворе глицерина [Kobayashi T. et al. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopoligalacturonase from a strain of *Bacillus*.//Biosci., Biotechnol., Biochem., 65 (4), 842-847 (2001)].

Недостатками способа являются низкая степень очистки (1,2 раза) и выход ферментов по активности (52%), а также низкая удельная полигалактуроназная активность ферментного препарата (0,25 ед/мг белка) после стадии ультрафильтрации.

Это связано с тем, что ферменты присутствуют в культуральной жидкости в основном в виде малоактивных гликопротеиновых комплексов с углеводами и пектиновыми веществами, которые в условиях способа-прототипа не разрушаются в процессе ультрафильтрации.

Технический результат изобретения заключается в получении пектолитического ферментного препарата, содержащего смесь эндо- и экзополигалактуроназ при более высокой степени очистки и выходе ферментов по активности, а также в увеличении удельной полигалактуроназной активности ферментов.

Технический результат достигается тем, что культуральную жидкость или раствор неочищенного ферментного препарата из *Aspergillus foetidus* предварительно осветляют, например, с помощью коагуляции хлоридом кальция в среде фосфатного буфера при pH 6,0-7,0 и удаляют взвешенные частицы микрофильтрацией, активируют ферменты, извлекая ионы металлов путем катионообменной очистки, и после концентрирования раствора в 5-10 раз в концентрат добавляют стабилизаторы и проводят ультрафильтрацию при температуре 35-40°C при непрерывном добавлении в концентрат ацетатного буферного раствора с pH 4,0 со стабилизаторами. Ферменты выделяют из очищенного раствора путем сорбции сильнокислотной катионообменной смолой с последующей десорбцией фосфатным буфером, обессоливанием и лиофильной сушкой концентрата.

Способ осуществляют следующим образом.

Культуральную жидкость или раствор технического пектолитического ферментного препарата из *Aspergillus foetidus* осветляют, например, с помощью коагуляции хлоридом кальция в среде фосфатного буфера при pH 6,0-7,0 и удаляют взвешенные частицы микрофильтрацией, активируют ферменты, извлекая ионы металлов сильнокислотной катионообменной смолой, например КУ-2 или Амберлит CG-120, при pH 6,0-7,0 и дозировке 100 г/дм<sup>3</sup> и концентрируют в 5-10 раз, например, с помощью ультрафильтрации. Концентрат стабилизируют добавлением 200 г/дм<sup>3</sup> многоатомного спирта, в частности глицерина или низкомолекулярного гликоля, добавкой 10 ммоль/дм<sup>3</sup> комплексообразователя, например Трилона Б или диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА), а также 10 г/дм<sup>3</sup> любого неактивного белка с молекулярной массой выше 15 кДа, например бычьего сывороточного альбумина, после чего устанавливают температуру раствора 35-40°C и проводят его

ультрафильтрацию при постоянном добавлении в концентрат ацетатного буферного раствора с рН 4,0 и температурой 35-40°C, содержащего 100 г/дм<sup>3</sup> многоатомного спирта и 1 ммоль/дм<sup>3</sup> комплексообразователя. Ферменты выделяют из раствора сильнокислотной катионообменной смолой, например КУ-2 или Амберлит CG-120, с размерами зерен 100-250 мкм при комнатной температуре, рН 4,0-5,0 и дозировке 400 г/дм<sup>3</sup>. Десорбцию ферментов осуществляют путем промывки смолы фосфатным буфером с рН 6,0-7,0. Очищенный ферментный раствор обессоливают путем диафильтрации и лиофильно высушивают.

Разрушение гликопротеиновых комплексов полигалактуроназ с углеводами в процессе ультрафильтрации при нагревании и при выделении ферментов сильнокислотной катионообменной смолой приводит к увеличению подвижности молекул ферментов и, следовательно, их удельной активности. Это позволяет получить выход ферментов по активности более 100% от исходного значения.

Пример 1. Культуральную жидкость от продуцента *Aspergillus foetidus* или раствор технического пектолитического ферментного препарата Пектофоетидин ГЗх объемом 4 дм<sup>3</sup> с концентрацией 10 г/дм<sup>3</sup> подвергают концентрированию при температуре 4-6°C с помощью ультрафильтрации на полволоконном модуле с пределом пропускания 15 кДа до объема 0,4 дм<sup>3</sup>. Концентрат стабилизируют добавлением 200 г/дм<sup>3</sup> глицерина, 10 ммоль/дм<sup>3</sup> Трилона Б и 10 г/дм<sup>3</sup> бычьего сывороточного альбумина, после чего устанавливают рН 4,0 и температуру раствора 35-40°C и проводят его ультрафильтрацию в течение 90 минут при постоянном добавлении 0,01-0,10 М ацетатного буферного раствора с рН 4,0 и температурой 35-40°C, содержащего 100 г/дм<sup>3</sup> глицерина и 1 ммоль/дм<sup>3</sup> Трилона Б. Ферменты выделяют из раствора сильнокислотной катионообменной смолой КУ-2 с размерами зерен 100-250 мкм при комнатной температуре, рН 4,0-5,0 и дозировке смолы 400 г/дм<sup>3</sup>. Десорбцию ферментов осуществляют путем промывки смолы 1 дм<sup>3</sup> 0,25 М фосфатного буфера с рН 6,0-7,0. Ферментный раствор обессоливают путем диафильтрации и лиофильно высушивают. Результаты приведены в таблице.

Пример 2. Обработку проводят аналогично п.1, но в качестве источника неактивного белка используют белковую фракцию из раствора после выделения ферментов катионообменной смолой, содержащую неадсорбировавшиеся белки. Результаты приведены в таблице.

Пример 3. Обработку проводят аналогично п.1, но ферментный раствор перед концентрированием осветляют путем коагуляции, добавляя 20-40 см<sup>3</sup> 1 М раствора хлорида кальция и 20-40 см<sup>3</sup> 1 М фосфатного буфера с рН 6,0-7,0, после чего раствор отстаивают 30 минут, декантируют с осадка и удаляют взвешенные частицы микрофильтрацией. Результаты приведены в таблице.

Пример 4. Обработку проводят аналогично п.3, но после осветления ферментный раствор активируют обработкой сильнокислотной катионообменной смолой КУ-2 (100-250 мкм) при комнатной температуре, рН 6,0-7,0 и дозировке 100 г/дм<sup>3</sup>. Результаты приведены в таблице.

Пример 5 (по прототипу). Культуральную жидкость от продуцента *Aspergillus foetidus* или раствор технического пектолитического ферментного препарата Пектофоетидин ГЗх объемом 4 дм<sup>3</sup> с концентрацией 10 г/дм<sup>3</sup> осветляют с помощью центрифугирования и концентрируют его при температуре 4-6°C с помощью ультрафильтрации на полволоконном модуле с пределом пропускания 15 кДа до объема 0,4 дм<sup>3</sup>. Ферменты выделяют из раствора сильнокислотной катионообменной смолой КУ-2 с размерами зерен 100-250 мкм при комнатной температуре, рН 4,0-5,0 и дозировке смолы 400 г/дм<sup>3</sup>.

Десорбцию ферментов осуществляют промывкой смолы 1 дм<sup>3</sup> 0,25 М фосфатного буфера с рН 6,0-7,0. Раствор после десорбции обессоливают путем диафильтрации и лиофильно высушивают. Результаты приведены в таблице.

№ пп	Общая активность, ед×10 <sup>-3</sup>	Выход активности, %	Удельная активность, ед/мг белка	Степень очистки, п раз
Культуральная жидкость	1034	100,0	279	-
Пример 1/2	1167	112,9	4024	14,4
Пример 3	1206	116,6	5624	20,2
Пример 4	1332	128,8	6230	22,3
Пример 5 (прототип)	853	82,5	325	1,2

Примечание: 1 единица активности соответствует количеству фермента, приводящему к образованию 1 мкмоль D-галактурановой кислоты из полигалактурановой кислоты за 1 мин при рН 4,0 и температуре 50 °С.

Таким образом, разрушение гликопротеиновых комплексов ферментов с углеводами в процессе ультрафильтрации при нагревании и при выделении ферментов сильнокислотной катионообменной смолой позволяет получить пектолитический ферментный препарат с более высокой степенью очистки и с выходом по активности выше 100%, а также увеличить удельную активность ферментов более чем в 20 раз.

#### Формула изобретения

1. Способ очистки пектолитического ферментного препарата, включающий концентрирование ультрафильтрацией при 4-6°С культуральной жидкости или неочищенного ферментного препарата, стабилизацию, выделение ферментов, отличающийся тем, что концентрированию подвергают культуральную жидкость или неочищенный ферментный препарат из *Aspergillus foetidus*, стабилизацию ведут добавлением 200 г/дм<sup>3</sup> многоатомного спирта, 10 ммоль/дм<sup>3</sup> комплексообразователя и 10 г/дм<sup>3</sup> любого неактивного белка с молекулярной массой выше 15 кДа с последующей ультрафильтрацией при 35-40°С и при постоянном добавлении ацетатного буферного раствора с рН 4,0, содержащего 100 г/дм<sup>3</sup> многоатомного спирта и 1 ммоль/дм<sup>3</sup> комплексообразователя, ферменты выделяют сильнокислотной катионообменной смолой при рН 4,0-5,0 и концентрации смолы 400 г/дм<sup>3</sup> с последующей их десорбцией фосфатным буфером с рН 6,0-7,0, обессоливают диафильтрацией и лиофильно сушат.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что перед концентрированием дополнительно проводят осветление с помощью коагуляции путем добавления раствора хлорида кальция и фосфатного буфера с рН 6,0-7,0, а взвешенные частицы удаляют микрофильтрацией.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что после осветления раствор активируют обработкой сильнокислотной катионообменной смолой при комнатной температуре, рН 6,0-7,0 и концентрации смолы 100 г/дм<sup>3</sup>.

4. Способ п.1 или 3, отличающийся тем, что используют сильнокислотную

катионообменную смолу КУ-2 с размерами зерен 100-250 мкм.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что в качестве неактивного белка используют белковую фракцию из раствора после выделения ферментов.

---

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

Дата прекращения действия патента: **22.10.2008**

Дата публикации: [20.04.2011](#)

---