



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2003121258/13, 09.07.2003**

(24) Дата начала действия патента: **09.07.2003**

(43) Дата публикации заявки: **20.01.2005**

(45) Опубликовано: **10.06.2005 Бюл. № 16**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 4801540 31.01.1989. ГРАЧЕВА И.М., КРИВОВА А.Ю., Технология ферментных препаратов, М, 2000, ЭЛЕВАР, с.89-92. ГРАЧЕВА И.М., КРИВОВА А.Ю., Технология ферментных препаратов, М, 2000, ЭЛЕВАР, с.149-150. SU 891775 А1, 23.12.1981.**

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Донцов А.Г. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности касается способа получения полигалактуроназного ферментного препарата, и может быть использовано в виноделии, в гидролизной промышленности. Способ получения полигалактуроназного ферментного препарата предусматривает первичное концентрирование культуральной жидкости или раствора неочищенного ферментного препарата, обессоливание раствора. Вторичное концентрирование фермента ведут непосредственно на колонке путем пропускания через термостатированную колонку при

температуре 3-5°C, заполненную гидроксипатитом с зернением 100-250 мкм. Промывают колонки 10 мМ фосфатным буфером с рН 6,0-7,0, с последующим элюированием фракций градиентом фосфатного буфера. Проводят гель-хроматографию активной фракции и лиофилизацию ферментного препарата. Изобретение позволяет увеличить выход, степень очистки и производительность препаративного получения полигалактуроназного ферментного препарата, а также уменьшить разбавление активной фракции, что повышает технологичность процесса очистки. 1 з.п. ф-лы, 1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2003121258/13, 09.07.2003**

(24) Effective date for property rights: **09.07.2003**

(43) Application published: **20.01.2005**

(45) Date of publication: **10.06.2005 Bull. 16**

Mail address:

**167982, g.Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja,
24, Komi nauchnyj tsentr UrO RAN, patentno-
litsenzionnyj otdel**

(72) Inventor(s):

Dontsov A.G. (RU)

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii Komi nauchnogo tsentra
Ural'skogo otdelenija Rossijskoj akademii
nauk (RU)**

(54) **METHOD FOR PRODUCTION OF POLYGALACTURONASE ENZYME PREPARATION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, production of polygalacturonase enzyme preparation useful in wine production and hydrolysis industry.

SUBSTANCE: claimed method includes the first concentration of cultural liquid or solution of crude enzyme preparation and solution demineralization. Second enzyme concentration is carried out directly in column by solution passing through column filled with hydroxyapatite

with granulation of 100-250 μm at 3-5°C. Columns are washed with 10 mM phosphate buffer with pH 6.0-7.0 followed by fraction elution by phosphate buffer gradient. Active fraction is subjected to gel chromatography and enzyme preparation is lyophilized.

EFFECT: method with increased yield, purification ratio, productivity and decreased dilution of active fraction.

2 cl, 1 tbl, 3 ex

R U 2 2 5 3 6 7 6 C 2

R U 2 2 5 3 6 7 6 C 2

Изобретение относится к области биотехнологии, гидролизной промышленности и виноделия и предназначено для препаративного получения очищенного полигалактуроназного ферментного препарата, пригодного для исследования структуры растительных пектинов методом ферментативного гидролиза, для переработки и
5 утилизации растительного сырья с целью получения олиго- и моносахаридов, для удаления винного камня и осветления лучших сортов вин.

Известен способ получения полигалактуроназы (прототип), [US 4801540, 31.01.89, С 12 N 015/00], включающий предварительное концентрирование ферментов путем осаждения сульфатом аммония при 90%-ном насыщении с последующим фракционированием с
10 помощью хроматографии на гидроксиапатите. При этом 2 мл раствора вводится в HPLC-колонку для жидкостной хроматографии высокого разрешения, после чего проводится хроматографирование ферментов в линейном градиенте фосфатного буфера с pH 6,8 от 10 до 350 мМ при расходе 1 мл/мин. Фракции, содержащие полигалактуроназу, диализуются против 6% уксусной кислоты и лиофилизируются.

Недостатком данного способа является относительно низкая степень очистки полигалактуроназы, низкая производительность процесса и существенное разбавление исходного раствора фермента в ходе очистки, что затрудняет препаративное получение целевого продукта.

Технический результат изобретения заключается в увеличении степени очистки по удельной полигалактуроназной активности (ПгА) и в повышении производительности
20 процесса препаративного получения целевого продукта. Применение изобретения позволяет также снизить разбавление исходного раствора фермента в ходе очистки и увеличить выход ферментного препарата.

Технический результат по способу достигается тем, что после предварительного концентрирования ферментов путем осаждения или другим подходящим методом ферментный раствор обессоливают, например, диализом, после чего вторично концентрируют ферменты при вводе пробы непосредственно на колонке с
25 гидроксиапатитом путем пропускания обессоленного ферментного раствора с объемом, равным 1-2 объемам колонки, промывают колонку слабым фосфатным буфером и проводят градиентное элюирование активной фракции. Все операции проводят при
30 температуре 3-5°C.

Способ осуществляют следующим образом: 1000 см³ культуральной жидкости или раствора ферментного препарата предварительно концентрируют в 5-10 раз подходящим
35 методом, например осаждением сульфатом аммония, ультрафильтрацией или вакуумной дистилляцией и обессоливают, например, диализом при температуре около 4°C против 10 мМ фосфатного буфера с pH 6,0-7,0. После этого 100-200 см³ обессоленного раствора с помощью насоса пропускают со скоростью 4 см³/мин через термостатированную при 4°C колонку 1,6x50 см (объем 100,5 см³), заполненную гидроксиапатитом с зернением 100-250
40 мкм. После введения всего объема раствора колонку промывают 100 см³ 10 мМ фосфатного буфера с pH 6,0-7,0 и далее производят элюирование активной фракции линейным градиентом того же буфера от 10 до 500 мМ в течение 30 минут со скоростью 4 см³/мин. По результатам детектирования при 280 нм отбирают белоксодержащую фракцию, которая элюируется при концентрации фосфатного буфера, равной 250-300 мМ,
45 диализуют ее против 10 мМ ацетатного буфера с pH 4,0-4,5 или проводят гель-хроматографию на TSK-геле HW-50F, используя 10 мМ ацетатный буфер с pH 4,0-4,5 в качестве элюента, после чего лиофилизируют.

Низкая ионная сила исходного ферментного раствора перед фракционированием способствует более сильной адсорбции ферментов гидроксиапатитом при 4°C, что
50 приводит к их концентрированию на колонке и отмыванию неактивных примесей уже в процессе ввода пробы, что увеличивает конечную степень очистки.

Вторичное концентрирование ферментов на колонке перед их разделением позволяет уменьшить объем активной фракции по сравнению с исходным раствором. При этом

увеличение концентрации белков на старте колонки способствует стабилизации фермента и, следовательно, увеличению его выхода по активности.

Использование гель-хроматографии на TSK-геле HW-50F вместо диализа перед лиофилизацией приводит к дополнительному увеличению степени очистки полигалактуроназы.

Способ увеличивает производительность очистки, так как позволяет за 80 минут провести очистку 100 см³ ферментного раствора, тогда как по способу-прототипу за это время может быть очищено не более 5-6 см³ того же раствора.

Способ опробован на примере растворов ферментного препарата Пектофоетидин ГЗх. В таблице 1 приведены экспериментальные данные по использованию способа для получения очищенного полигалактуроназного препарата.

Пример 1. 1000 см³ раствора ферментного препарата Пектофоетидин ГЗх (40 г/дм³ по сухому веществу) предварительно концентрируют в 5-10 раз с помощью ультрафильтрации, диализуют при 4°С против 10 мМ фосфатного буфера с рН 6,8 и фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм.

Пробу объемом 2 см³ (по прототипу) вводят в колонку 1,6×50 см (объем 100,5 см³), заполненную гидроксипатитом с зернением 100-250 мкм, после чего проводят элюирование при 4°С градиентом фосфатного буфера с рН 6,8 от 10 до 500 мМ за 30 минут со скоростью 4 см³/мин. По результатам детектирования при 280 нм отбирают белоксодержащую фракцию, которая элюируется при концентрации фосфатного буфера, равной 250-300 мМ, диализуют против 10 мМ ацетатного буфера с рН 4,0-4,5 и лиофилизируют. Показатели процесса очистки и характеристика препарата приведены в таблице 1.

Пример 2. Операции проводят аналогично п.1, при этом после концентрирования ультрафильтрацией, диализа и микрофильтрации на фильтре 0,45 мкм, с целью вторичного концентрирования, пробу объемом 180 см³ при помощи насоса со скоростью 4 см³/мин вводят в колонку 1,6×50 см (объем 100,5 см³), заполненную гидроксипатитом с зернением 100-250 мкм, колонку промывают 100 см³ 10 мМ фосфатного буфера с рН 6,8 и далее производят элюирование активных фракций линейным градиентом того же буфера от 10 до 500 мМ в течение 30 минут со скоростью 4 см³/мин. По результатам детектирования при 280 нм отбирают белоксодержащую фракцию, которая элюируется при концентрации фосфатного буфера, равной 250-300 мМ, диализуют против 10 мМ ацетатного буфера с рН 4,0-4,5 и лиофилизируют. Показатели процесса очистки и характеристика препарата приведены в таблице 1.

Пример 3. Операции проводят аналогично п.2, но вместо диализа перед лиофилизацией проводят гель-хроматографию: 2 см³ активной фракции вводят в колонку 1,6×50 см (объем 100,5 см³), заполненную TSK-гелем HW-50F, после чего проводят элюирование фракций 10 мМ ацетатным буфером с рН 4,0-4,5 при 4°С со скоростью 1 см³/мин. По результатам рефрактометрического детектирования отбирают фракции, в которых определяют активность (ПГА) и содержание белка. Активную фракцию подвергают лиофилизации. Показатели процесса очистки и характеристика препарата приведены в таблице 1.

Данные таблицы 1 показывают, что предлагаемый способ позволяет увеличить степень очистки и выход полигалактуроназы, а также производительность процесса при ее препаративном получении с использованием хроматографии на гидроксипатите. Способ позволяет также снизить разбавление исходного раствора фермента, что повышает технологичность процесса очистки.

| Таблица 1 | | | | | | | |
|--------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------|
| N п/п | V, см ³ до очистки | V, см ³ после очистки | ПГА, ед/см ³ | ПГА _{общ} , ед | Выход активности, (%) | ПГА _{уд} , ед/мг белка | Кратность очистки, п раз |
| Пример 1 | | | | | | | |
| исходный р-р | 2,0 | - | 492,0 | 984 | - | 134,8 | - |

| | | | | | | | |
|--|-------|------|--------|--------|-------|-------|------------|
| очищенный р-р | - | 56,0 | 17,2 | 963 | 97,8 | 161,8 | 1,2 |
| Пример 2 | | | | | | | |
| исходный р-р | 180,0 | - | 492,0 | 88560 | - | 134,8 | - |
| очищенный р-р | - | 86,4 | 1330,3 | 114938 | 129,8 | 350,1 | 2,6 |
| Пример 3 | | | | | | | |
| р-р после п.2 | 2,0 | - | 1330,3 | 2660,6 | - | 350,1 | - |
| очищенный р-р | - | 18,6 | 141,3 | 2628,2 | 98,8 | 441,6 | 1,26/3,28* |
| * - в числителе дано значение по отношению к примеру 2, в знаменателе - по отношению к исходному раствору. | | | | | | | |

5

10

Формула изобретения

1. Способ получения полигалактуроназного ферментного препарата, включающий предварительное концентрирование ферментов, фракционирование ферментов хроматографией на гидроксиапатите, очистку активной фракции и лиофилизацию, отличающийся тем, что перед фракционированием проводят обессоливание ферментного раствора и вторично концентрируют ферменты непосредственно на колонке, заполненной гидроксиапатитом, путем пропускания ферментного раствора с объемом, равным 1-2 объемам колонки, при температуре 3-5°C с последующей промывкой колонки 10 мМ фосфатным буфером с рН 6,0-7,0.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что очистку активной фракции проводят диализом или гель-хроматографией на колонке с TSK-гелем - HW-50F.

25

30

35

40

45

50