



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2004107692/13**, **15.03.2004**

(24) Дата начала действия патента: **15.03.2004**

(45) Опубликовано: **20.12.2005** Бюл. № **35**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 20030022347 A1**, **30.01.2003**. **US 4242451 A1**, **30.12.1980**. **SU 1353807 A1**, **23.11.1987**. **SU 1458382 A1**, **23.11.1987**. **US 4304857 A1**, **08.12.1981**. **ЦЫПЕРОВИЧ А.С.** Ферменты. - Киев: Техника, 1971, с.138-153. **ГРАЧЕВА И.М., КРИВОВА А.Ю.** Технология ферментных препаратов. - М.: Элевар, с.132-134.

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая,
24, Коми научный центр УрО РАН, патентный
 отдел

(72) Автор(ы):

Донцов А.Г. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

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

(54) СПОСОБ ОСВЕЩЕНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ ГИДРОЛАЗ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и предназначено для осветления ферментных растворов. Способ предусматривает коагуляцию при pH 6,0-7,0, осаждение взвешенных частиц путем добавления к ферментному раствору хлористого кальция в количестве 0,015-0,025

моль/дм³ и эквимольного количества орто-фосфата натрия или калия. Изобретение позволяет увеличить скорость осветления ферментных растворов и выхода целевого продукта, увеличить удельную активность ферментных препаратов гидролаз. 1 табл.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 266 331** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 9/14**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2004107692/13, 15.03.2004**

(24) Effective date for property rights: **15.03.2004**

(45) Date of publication: **20.12.2005 Bull. 35**

Mail address:

**167982, g.Syktvykar, ul. Kommunisticheskaja,
24, Komi nauchnyj tsentr UrO RAN, patentnyj 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 CLARIFYING OF HYDROLASE ENZYME SOLUTIONS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, in particular clarifying of enzyme solutions.

SUBSTANCE: claimed method includes slurry coagulation at pH 6.0-7.0 by addition calcium chloride in amount of 0.015-0.025 mol/dm³ and

equimolar amount of sodium or potassium phosphate into enzyme solution.

EFFECT: accelerated process for clarifying of hydrolase enzyme solutions; increased yield of target product; hydrolase enzyme preparations with increased specific activity.

1 tbl, 4 ex

R U 2 2 6 6 3 3 1 C 1

R U 2 2 6 6 3 3 1 C 1

Изобретение относится к области биотехнологии и предназначено для удаления взвешенных частиц в растворах ферментных препаратов с целью их осветления перед процедурами ультрафильтрации, осаждения и адсорбционного выделения ферментов.

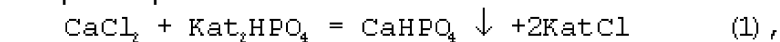
Известен способ получения галактаназного ферментного препарата *Bacillus pumilus* (прототип) [US 20030022347, 30.01.2003, С 12 N 009/40], включающий стадию осветления ферментного раствора с помощью коагуляции взвешенных частиц алюминатом натрия в присутствии катионных и анионных агентов.

Недостатком данного способа является низкая скорость осветления и существенное снижение активности ферментных растворов некоторых гидролаз в процессе очистки, что снижает выход целевого продукта.

Технический результат изобретения заключается в увеличении скорости осветления ферментных растворов и выхода целевого продукта по активности при равной степени осветления, а также в увеличении удельной активности ферментных препаратов гидролаз.

Технический результат достигается тем, что в качестве коагулирующего агента вместо алюмината натрия используют хлористый кальций в присутствии эквимольного количества орто-фосфата натрия или калия в среде, близкой к нейтральной.

Способ осуществляют следующим образом: к раствору ферментного препарата добавляют раствор хлористого кальция в количестве 1,7-2,8 г/дм³ (0,015-0,025 моль/дм³) и эквимольное количество раствора орто-фосфата натрия или калия с pH 6,0-7,0 для того, чтобы конечный pH раствора был равен 6,0-7,0. При этом в соответствии с уравнением реакции (1) происходит образование осадка гидрофосфата кальция (CaHPO₄), способствующего коагуляции взвешенных частиц и осветлению ферментного раствора:



где Kat - катион металла.

Ферментный раствор отстаивают в течение 1-2 часов, после чего отделяют от осадка декантацией и при необходимости дополнительно фильтруют через бумажный или полимерный фильтр. Степень осветления для сильно окрашенных растворов оценивают по их прозрачности П (см), за которую принимают максимальную высоту столбика раствора в цилиндре с прозрачным дном при котором еще различим шрифт №14. Степень осветления S (%) рассчитывают по формуле $S = (\text{П}_к - \text{П}_н / \text{П}_к) \times 100\%$, где П_н и П_к - прозрачность раствора до и после осветления, П - прозрачность раствора, фильтрованного через полимерный фильтр.

Образование объемного осадка CaHPO₄ способствует соосаждению взвешенных частиц исходного ферментного раствора, что приводит к его осветлению. При этом осадок CaHPO₄ имеет более плотную структуру по сравнению с гидроокисью алюминия, образующейся при гидролизе алюмината натрия в нейтральной среде, что способствует увеличению скорости коагуляции.

В отличие от активной гидроокиси алюминия CaHPO₄ слабо адсорбирует высокомолекулярные белки, что способствует увеличению выхода целевого продукта.

Поскольку CaHPO₄ обладает низкими адсорбционными свойствами по отношению к белкам, на его поверхности происходит преимущественное связывание неактивных низкомолекулярных белков - олигопептидов, что приводит к увеличению удельной активности ферментного раствора, рассчитанной как отношение активности раствора (ед/см³) к общей концентрации белка (мг/см³).

Способ опробован на растворах ферментных препаратов Пектофоетидин ГЗх, Целловиридин ГЗх и Глюкаваморин ГЗх. Сравнительные экспериментальные данные по применению способа приведены в примерах 1-4 и в таблице 1.

Пример 1 (прототип). К 1000 см³ растворов ферментных препаратов Пектофоетидин ГЗх, Целловиридин ГЗх и Глюкаваморин ГЗх с концентрацией сухих веществ 10 г/дм³ добавляют эффективное количество щелочного раствора алюмината натрия с концентрацией 100 г/дм³ (20-30 см³). Доводят pH раствора до 6,5-7,0 добавлением 20%-ной серной кислоты и

отстаивают растворы до осаждения активной гидроокиси алюминия и коагуляции ферментного раствора. После отделения раствора от осадка декантацией получают 800 см³ осветленного ферментного раствора.

5 Пример 2. К 1000 см³ растворов ферментных препаратов Пектофоетидин ГЗх, Целловиридин ГЗх и Глюкаваморин ГЗх с концентрацией сухих веществ 10 г/дм³ добавляют в качестве коагулирующего агента 15 см³ 1 М раствора СаСl₂ (1,7 г/дм³) и равный объем 1 М раствора орто-фосфата натрия (калия) с рН 6,0-7,0. Растворы отстаивают до осаждения осадка СаНРО₄ и коагуляции ферментного раствора. После отделения раствора от осадка декантацией получают 800 см³ осветленного ферментного раствора.

10 Пример 3. К 1000 см³ растворов ферментных препаратов Пектофоетидин ГЗх, Целловиридин ГЗх и Глюкаваморин ГЗх с концентрацией сухих веществ 10 г/дм³ добавляют 20 см³ 1 М раствора СаСl₂ (2,2 г/дм³) и равный объем 1 М раствора орто-фосфата натрия (калия) с рН 6,0-7,0. Растворы отстаивают до осаждения осадка СаНРО₄ и коагуляции ферментного раствора. После отделения раствора от осадка декантацией получают 800 см³ осветленного ферментного раствора.

15 Пример 4. К 1000 см³ растворов ферментных препаратов Пектофоетидин ГЗх, Целловиридин ГЗх и Глюкаваморин ГЗх с концентрацией сухих веществ 10 г/дм³ добавляют 25 см³ 1 М раствора СаСl₂ (2,8 г/дм³) и равный объем 1 М раствора орто-фосфата натрия (калия) с рН 6,0-7,0. Растворы отстаивают до осаждения осадка СаНРО₄ и коагуляции ферментного раствора. После отделения раствора от осадка декантацией получают 800 см³ осветленного ферментного раствора.

25

Таблица 1							
Фермент/образец	Доза коагулянта, г/дм ³	Время осаждения, час	Степень осветления, %	Активность, ед/см ³	Содержание белка, мг/см ³	Удельная активность, ед/мг белка	Выход активности, %
Пектофоетидин ГЗх исходный	-	-	-	110,7	0,75	147,6	-
пример 1 прототип	2,0	2,0	51,0	9,8	0,41	23,9	9,2
30 пример 2	1,7	1,5	62,3	112,1	0,68	164,9	104,3
пример 3	2,2	1,0	78,6	115,8	0,60	193,0	111,6
пример 4	2,8	1,0	92,4	79,3	0,52	152,5	75,2
Целловиридин ГЗх исходный	-	-	-	8,5	2,10	4,04	-
пример 1 прототип	3,0	>5,0	91,7	1,7	0,66	2,50	21,2
35 пример 2	1,7	1,5	64,5	8,2	2,00	4,10	99,3
пример 3	2,2	1,0	76,2	7,6	1,78	4,27	98,8
пример 4	2,8	1,0	88,9	7,0	1,46	4,79	86,5
Глюкаваморин ГЗх исходный	-	-	-	9,9	1,20	8,3	-
пример 1 прототип	2,0	>2,0	94,4	3,4	0,36	9,4	35,7
40 пример 2	1,7	1,5	89,6	9,5	0,97	9,8	98,8
пример 3	2,2	1,0	95,3	8,8	0,85	10,4	92,1
пример 4	2,8	1,0	97,8	6,7	0,73	9,2	71,1

45 Данные таблицы 1 показывают, что предлагаемое изобретение позволяет увеличить скорость осветления ферментных растворов и выход целевого продукта по активности при равной степени осветления, а также увеличить удельную активность ферментных препаратов по сравнению со способом-прототипом.

Формула изобретения

50 Способ осветления ферментных растворов гидролаз, включающий коагуляцию и осаждение взвешенных частиц, отличающийся тем, что для коагуляции используют хлористый кальций в количестве 0,015-0,025 моль/дм³ и эквимольное количество орто-фосфата натрия или калия, при этом коагуляцию проводят при рН 6,0-7,0.