

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

63864

Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 04.VI.1968 (P 127 340)

Pierwszeństwo: 05.VI.1967 Niemiecka
Republika
Demokratyczna

Opublikowano: 10.XII.1971

Kl. 6 a, 22/10

MKP C 07 g, 7/00

UKD

Współtwórcy wynalazku: Dietmar Schöpfel, Johann Huber

Właściciel patentu: Forschungsinstitut für die Gärungsindustrie, Enzymo-
logie und technische Mikrobiologie, Berlin (Niemiec-
ka Republika Demokratyczna)

Sposób wytwarzania suchych preparatów proteinowo-enzymatycznych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania suchych preparatów proteinowo-enzymatycznych o małej zawartości soli z osadu otrzymanego przez wytrącanie enzymów i białek z cieczy powstających po hodowli mikroorganizmów oraz z wyciągów pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego.

Wiadomo, że substancje białkowe można wydziełać ze środowiska wodnego w postaci ich nierozpuszczalnych w wodzie związków z taniną.

W znanych metodach związki te oczyszcza się od soli nieorganicznych przez traktowanie wodą, a następnie ekstrahuje się enzym mieszaninami wody z rozpuszczalnikiem organicznym. Znana jest także metoda oddzielania za pomocą ligniny i/lub kwasów garbnikowych amyloglikozydazy od enzymów utrudniających rozszczepienie skrobi. Z szwajcarskiego opisu patentowego nr 412744 i brytyjskiego opisu patentowego nr 969936 znany jest sposób wytrącania enzymów garbnikami naturalnymi, na przykład taniną, polegający na strącaniu garbnikiem enzymu i następnie na ekstrahowaniu wyżej podanymi rozpuszczalnikami.

Stwierdzono, że suche preparaty proteinowo-enzymatyczne o małej zawartości soli otrzymuje się ze znacznie lepszą wydajnością i o lepszej jakości, jeżeli do wytrącania enzymów i białek zawartych w cieczach pochodzących z hodowli mikroorganizmów, na przykład bakterii lub pleśni, albo w wyciągach z tkanek roślinnych lub zwierzęcych, jako substancje o charakterze garbni-

2

ków stosuje się garbniki syntetyczne, tak zwane syntany, o wzorze ogólnym podanym na rysunku, w którym Y oznacza grupę wodorotlenową lub aminową, X oznacza grupę $-\text{SO}_2-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2\text{NH}-$, $-\text{NH}-$ i/lub grupę o wzorze $-\text{C}/\text{R}_2-$, w którym R oznacza atom wodoru lub rodnik metylowy, n oznacza zero lub liczbę całkowitą 1-3, o oznacza liczbę całkowitą 1-3, p oznacza zero lub liczbę 1, a m oznacza liczbę równą co najmniej 3, przy czym jeden z obu pierścieni benzenowych tego związku jest bezpośrednio lub poprzez grupę $-\text{CH}_2-$ podstawiony grupą sulfonową.

Z otrzymanego osadu ekstrahuje się następnie sole nieorganiczne i substancje garbnikowe, po czym osad suszy się, otrzymując gotowy preparat.

Jak wiadomo, budowa syntanów różni się znacznie od budowy naturalnych garbników, na przykład taniny, toteż nie można było oczekiwać, że po wytrąceniu enzymów i białek za pomocą syntanu możliwe będzie wyekstrahowanie syntanu lub produktu jego addycji z białkiem za pomocą mieszaniny wody z acetonem lub z etanolem, jak to odbywa się w przypadku wytrącania taniną.

Syntany stosowane w sposobie według wynalazku są produktami kondensacji fenoli jedno- lub wielowodorotlenowych, kwasów fenolokarboksylowych i fenolosulfonowych, a także amidów kwasów fenolosulfonowych, kwasów ligninosulfonowych i aromatycznych amin. W celu zwiększenia rozpuszczalności w wodzie, zgodnie z wynalazkiem stosuje się

syntany zawierające grupę sulfonową. Grupa ta może pochodzić ze związku sulfonowego użytego do kondensacji lub też może być wprowadzona do tego produktu drogą jego sulfonowania.

Drugi przypadek dotyczy zwłaszcza produktów kondensacji fenoli jednowodorotlenowych, przy czym sulfonowanie prowadzi się korzystnie tak, aby na 1 cząsteczkę produktu kondensacji nie wprowadzić więcej niż 1 grupy sulfonowej.

Sposobem według wynalazku, roztwory zawierające enzymy i substancje białkowe traktuje się roztworem syntanu w takiej ilości, aby jego stężenie w mieszaninie wynosiło 0,5–5% wagowych. Proces wytrącania prowadzi się w temperaturze 0–50°C, a korzystnie 10–30°C.

Temperatura nie ma zasadniczego wpływu na przebieg procesu, lecz wpływa na prędkość powstawania osadu i jego konsystencję. Wartość pH środowiska, w którym odbywa się strącanie, dostosowuje się do rodzaju strącanych substancji białkowych i enzymów oraz rodzaju użytego syntanu, przy czym w przypadku użycia garbników anionowych strącanie prowadzi się w środowisku kwaśnym.

Wytrącony produkt odwirowuje się, odsącza lub dekantuje i następnie ekstrahuje wodą lub mieszaniną wody z organicznymi rozpuszczalnikami mieszającymi się z wodą, takimi jak alkohole jedno- lub wielowodorotlenowe, ketony, eteroglikole, dioksan i czterowodorofuran.

Za pomocą ekstrakcji usuwa się z osadu sole nieorganiczne i nadmiar użytego syntanu. W celu uniknięcia obniżenia aktywności produktów zawierających enzymy, proces ekstrakcji prowadzi się w temperaturze niższej od temperatury pokojowej, korzystnie w temperaturze 0–10°C. Po ekstrakcji osad suszy się w znany sposób, otrzymując gotowy produkt.

Przykład I. 1,5 litra przesączu hodowli bakteryjnej *Bacillus subtilis*, zawierającego jako główny enzym amylazę, traktuje się roztworem węglanu sodowego do uzyskania wartości pH wynoszącej 7. Następnie do przesączu dodaje się mieszając w temperaturze 22°C wodny roztwór syntanu, będącego sulfonowanym produktem kondensacji o wzorze podanym na rysunku, w którym X oznacza grupę $-C/CH_2-$, Y oznacza grupę wodorotlenową, n i o oznaczają liczbę 1 a m oznacza liczbę równą co najmniej 3.

Wartość pH wodnego roztworu syntanu przed dodaniem do przesączu doprowadza się za pomocą węglanu potasowego do 7,0. Dodaje się taką ilość roztworu syntanu, aby jego stężenie w mieszaninie wynosiło około 2% wagowych, to jest 0,8% wagowych w przeliczeniu na aktywną substancję garbnika. Po dodaniu syntanu z przesączu wytrąca się osad, który odwirowuje się, przemywa dwukrotnie acetonem w temperaturze około 3°C i suszy w temperaturze 30°C pod ciśnieniem 20 torów.

Otrzymuje się 3,70 g suchego produktu o aktywności 1765000 jednostek amylazy, podczas gdy aktywność przesączu użytego do procesu wynosi 2140500 jednostek amylazy, co oznacza wydajność procesu wynoszącą 82,5% wydajności teoretycznej.

Przykład II. Do 1 litra przesączu hodowli bakteryjnej *Bacillus subtilis* zawierającego jako

główny enzym 16750 jednostek proteazy i mającego wartość pH 7,0 dodaje się roztwór syntanu, którego wartość pH uprzednio doprowadzono za pomocą amoniaku do 7,0. Użyty syntan stanowi produkt polikondensacji fenolu dwuwodorotlenowego, formaldehydu i kwasu hydroksynaftalenosulfonowego o wzorze podanym na rysunku, w którym X oznacza grupę $-CH_2-$, Y oznacza grupę wodorotlenową, n i p oznaczają zero, o oznacza liczbę 2, a m oznacza liczbę równą co najmniej 3.

Syntan dodaje się w takiej ilości, aby jego stężenie w mieszaninie wynosiło 1,5% wagowych, to jest 0,6% wagowych aktywnej substancji garbnika. Po dwugodzinnym mieszaniu w temperaturze 30°C odwirowuje się otrzymany osad, ekstrahuje dwiema porcjami acetonu po 100 ml i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 2,2 g suchego produktu o aktywności 13200 jednostek proteazy, co oznacza 78,9% wydajności teoretycznej.

Przykład III. Do 1000 ml przesączu z hodowli bakteryjnej *Bacillus subtilis* zawierającego proteazę jako główny enzym, o sumarycznej aktywności wynoszącej 29800 jednostek proteazy, którego pH wynosi 6,0 dodaje się roztwór syntanu (2% produktu), który uprzednio doprowadzono do wartości pH = 6,0 za pomocą rozcieńczonego wodorotlenku sodowego.

Użyty syntan stanowi produkt polikondensacji kwasu fenolokarboksylowego i kwasu ligninosulfonowego o wzorze podanym na rysunku, w którym X oznacza grupę $-CH_2-$, Y oznacza grupę wodorotlenową, n oznacza zero, o i p oznaczają liczbę 1, a m oznacza liczbę co najmniej równą 3 i w którym na 6 pierścieni przypada 1 cząsteczka kwasu ligninosulfonowego. Po jednogodzinnym mieszaniu w temperaturze 40°C oddziela się osad, który następnie miesza się z 50 ml wody i rozpuszcza dodając w temperaturze około 5°C 30 ml izopropanolu. Przez podwyższenie stężenia izopropanolu do 65% wytrąca się z układu proteazę, po czym odwirowuje ją. Pozostała ciecz zostaje wzbogacona w główną ilość soli z płynu pohodowlanego i wprowadzony syntan.

Po wysuszeniu odwirowanego osadu pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymuje się 1,60 g produktu o aktywności 22250 jednostek. Wydajność procesu, uwzględniając aktywność surowca i produktu wynosi 74,8% wydajności teoretycznej.

Przykład IV. Do 1000 ml przesączu z hodowli bakteryjnej *Bacillus subtilis* zawierającego kompleks enzymowy wytwarzający celulozę o sumarycznej aktywności wynoszącej 43000 jednostek celulozy, którego wartość pH wynosi 5,5, dodaje się roztwór syntanu, którego wartość pH ustalono również na 5,5. Stężenie syntanu w układzie poddawalnemu strąceniu wynosi 2% produktu (około 0,7% substancji aktywnej garbnikowej). Temperatura wynosi około 17°C.

Użyty syntan stanowi produkt polikondensacji kwasu fenolosulfonowego o wzorze podanym na rysunku, w którym X oznacza grupę $-SO_2-$, Y oznacza grupę wodorotlenową, n i p oznaczają zero, o oznacza liczbę 1, a m oznacza liczbę większą od 4. Po jednogodzinnym mieszaniu wytrącony osad odwirowuje się, po czym miesza z 50 ml wody, a następnie w temperaturze około 5°C rozpuszcza

przez dodanie 30 ml etanolu. Po podwyższeniu stężenia etanolu do 70% objętościowych wytrąca się osad zawierający enzym, który następnie oddziela się przez odwirowanie.

Po wysuszeniu pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 22° C otrzymuje się 4,5 g suchego preparatu o aktywności wynoszącej 36000 jednostek celulozy.

Wydajność procesu uwzględniając aktywność surowca i produktu wynosi więc 83,7% wydajności teoretycznej.

Przykład V. Do 8000 ml przesącza z hodowli bakteryjnej *Bacillus subtilis*, zawierającego głównie kompleks enzymowy zdolny do rozszczepiania β -glukanu zawartego w jęczmieniu, o sumarycznej aktywności wynoszącej 187000 jednostek glukonazy i o wartości pH = 6,5 dodaje się roztwór syntanu o tej samej wartości pH.

Stężenie syntanu w mieszaninie wynosi 0,5% względnie 0,2% substancji aktywnej garbnikowej. Użyty syntan stanowi produkt polikondensacji kwasów aminosulfonowych o wzorze podanym na rysunku, w którym Y oznacza grupę $-\text{SO}_2 \cdot \text{NH}-$, X oznacza grupę $-\text{NH}_2$, n i p oznaczają zero, o oznacza liczbę 1, a m oznacza liczbę równą co najmniej 6. Podczas gdy stosowane w przykładach I—IV syntany miały charakter anionowy, to syntan użyty w tym przykładzie jest amfoteryczny. Po jednogodzinnym mieszanym w temperaturze pokojowej osad oddziela się od cieczy i ekstrahuje 300 ml mieszaniną acetonu z wodą, zawierającą 80% objętościowych acetonu i następnie 200 ml mieszaniny acetonu z wodą, zawierającą 65% objętościowych acetonu.

Otrzymuje się 11,5 g suchego preparatu o sumarycznej aktywności wynoszącej 149000 jednostek glukonazy. Wydajność procesu, uwzględniając aktywność surowca i produktu wynosi 79,6% wydajności teoretycznej.

Przykład VI. Do 2000 ml przesącza z hodowli bakteryjnej *Aspergillus niger*, zawierającego karboksymetylocelulozę o sumarycznej aktywności wynoszącej 3260 jednostek, którego wartość pH wynosi 6,2 dodaje się roztwór syntanu (2% produktu) o takiej samej wartości pH.

Użyty syntan stanowi produkt polikondensacji aniliny i formaldehydu, o wzorze podanym na rysunku, w którym X oznacza grupę $-\text{CH}_2$, Y oznacza grupę $-\text{NH}_2$, n i p oznaczają zero, o oznacza liczbę 1, a m oznacza co najmniej liczbę 4. Produkt ten jest związkiem o charakterze kationowym. Po około dwugodzinnym mieszanym wytrącony osad oddziela się i pod zmniejszonym ciśnieniem ekstrahuje dwiema porcjami po 50 ml acetonu w temperaturze pokojowej.

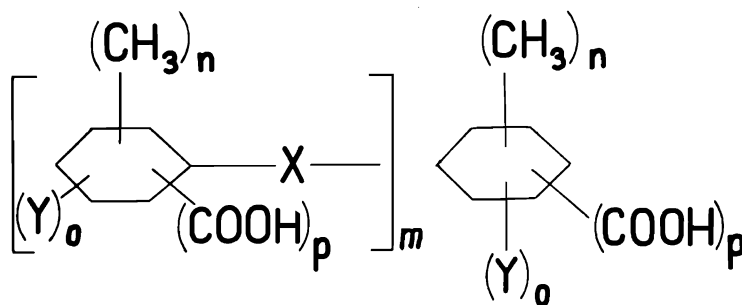
Po oddzieleniu cieczy i wysuszeniu osadu pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymuje się 6 g suchego preparatu o sumarycznej aktywności wynoszącej 2250 jednostek.

Wydajność procesu wynosi 69,0% wydajności teoretycznej.

W sposób analogiczny do opisanego w przykładach I—VI prowadzi się proces przy użyciu syntanu o wzorze podanym na rysunku, w którym X oznacza grupę $-\text{SO}-$ lub grupę $-\text{NH}-$, a pozostałe symbole mają wyżej podane znaczenie.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania suchych preparatów proteino-enzymatycznych o małej zawartości soli na drodze wytrącania enzymów oraz białek zawartych w cieczach pochodzących po prowadzeniu hodowli mikroorganizmów, takich jak bakterie lub pleśnie, albo w wyciągach z tkanek roślinnych lub zwierzęcych, substancjami o charakterze garbników i następnie ekstrakcją z uzyskanego osadu soli nieorganicznych i substancji o charakterze garbników wodą lub mieszaniną wody z rozpuszczalnikami organicznymi mieszającymi się z wodą i wysuszenie otrzymanego produktu, **znamienny tym**, że jako substancję o charakterze garbnika stosuje się związek o wzorze podanym na rysunku, w którym Y oznacza grupę wodorotlenową lub aminową, X oznacza grupę $-\text{SO}_2-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2 \cdot \text{NH}-$, $-\text{NH}-$ lub grupę o wzorze $-\text{C/R}_2-$, w którym R oznacza atom wodoru lub rodnik metylowy, n oznacza zero lub liczbę całkowitą 1—3, o oznacza liczbę całkowitą 1—3, p oznacza zero lub liczbę 1, a m oznacza liczbę równą co najmniej 3, przy czym jeden z obu pierścieni benzenowych tego związku jest bezpośrednio lub poprzez grupę $-\text{CH}_2-$ podstawiony grupą sulfonową.



Wzór