

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY 107655

Patent dodatkowy

do patentu _____

Zgłoszono: 23.12.77 (P. 203313)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 06.11.78

Opis patentowy opublikowano: 30.11.1981

Int. Cl.². C07G 7/03
C12D 13/10

Int. Cl.³. C12N 9/38

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Instytut Chemii (Leczenie)

Twórcy wynalazku: Jadwiga Kowalewska, Stefan Poznański, Włodzimierz Bednarski,
Marian Mieczkowski, Władysław Chojnowski
Uprawniony z patentu: Akademia Rolniczo-Techniczna,
Olsztyn (Polska)

Sposób otrzymywania preparatu enzymatycznego B-galaktozydazy

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania aktywnego rozpuszczalnego preparatu enzymatycznego B – galaktozydazy z drożdży, uzdolnionych do syntezy tego enzymu, oddzielonych od podłoża hodowlanego w postaci biomasy.

B – galaktozydaza znajduje zastosowanie do produkcji napojów mlecznych, koncentratów mlecznych z rozłożoną laktozą do glukozy i galaktozy oraz coraz większe zastosowanie w technologii mleczarskiej w celu przyspieszenia dojrzewania serów, skracanie fermentacji napojów mlecznych, aktywizacji rozwoju bakterii fermentacji mlekowej i innych.

Do celów przemysłowych B – galaktozydazę otrzymuje się z drobnoustrojów. B – galaktozydaza pochodzenia mikrobiologicznego w zależności od rodzaju drobnoustrojów, wykorzystywanych do ich biosyntezy, różni się właściwościami, takimi jak: optimum pH, temperatury, aktywnością hydrolizy laktozy oraz stabilnością.

Znany jest sposób otrzymywania B – galaktozydazy z bakterii *Escherichia coli*. W tym celu wysuszoną i sproszkowaną masę bakterii wytrząsa się z buforem fosforanowym o pH=7,3, piaskiem kwarcowym i alkoholem etylowym w temperaturze 0°C i poddaje wirowaniu, uzyskując żółty roztwór. Następnie z roztworu usuwa się kwasy nukleinowe, a B – galaktozydazę wytrąca alkoholem, który usuwa się przez wirowanie, a uzyskany osad zawiesza w buforze fosforanowym i poddaje wirowaniu, otrzymując czysty roztwór. Do uzyskanego roztworu dodaje się bardzo powoli ciągle mieszając nasycony roztwór siarczanu amonu w proporcji 1:1. Suspensję poddaje się ponownie wirowaniu, a osad rozpuszcza w buforze fosforanowym i prowadzi dializę przez 48 godz. Do płynu po dializie dodaje się mieszaninę eteru i etanolu przy stałym mieszaniu w temperaturze zamrażania. Suspensję natychmiast odwirowuje się, a otrzymany osad stanowi aktywne białko B – galaktozydazy. W celu zachowania aktywności enzymu przechowuje się go w temperaturze minus 30°C.

Stwierdzono, że B-galaktozydaza, otrzymana z bakterii *Escherichia coli*, wykazuje tylko 27% aktywności, hydrolizy, stwierdzonej w roztworze czystej laktozy.

Znana jest również B-galaktozydaza, otrzymywana z pleśni, ale ze względu na wysoką stabilność termiczną i niskie optimum pH działania znajduje tylko zastosowanie do hydrolizy laktozy w ukwaszonej serwatce.

Znany jest sposób otrzymywania plonu biomasy drożdży syntetyzujących B-galaktozydazę, ale metoda

otrzymywania preparatu B-galaktozydazy z biomasy drożdży jest nieujawniona przez producentów tego enzymu.

W technologii otrzymywania enzymów wewnątrzkomórkowych, do których należy również B-galaktozydaza, jedną z głównych trudności jest opracowanie skutecznego sposobu zniszczenia struktury komórkowej drobno-ustrojów bez obniżenia aktywności wydzielonych enzymów i sposobu izolowania aktywnych białek enzymatycznych z komórek.

W wyniku dotychczas stosowanych metod dezintegracji struktury komórkowej i otrzymywania preparatów enzymatycznych uzyskuje się preparaty o daleko posuniętej denaturacji białek enzymatycznych oraz niskiej rozpuszczalności preparatu enzymatycznego w substracie. Ponadto sposoby te nie pozwalają na otrzymywanie preparatu enzymatycznego B – galaktozydazy o standartowej aktywności.

Według wynalazku B-galaktozydazę otrzymuje się z biomasy drożdży, którą rozprowadza się wodą, uzupełnioną jonami potasu i magnezu, a uzyskaną suspensję komórek drożdży dezintegruje się za pomocą schłodzonego acetonu lub alkoholu etylowego. Następnie z otrzymanego roztworu wydziela się aktywne białko enzymatyczne jedną ze znanych metod, po czym traktuje się eterem etylowym i acetonem, a wydzielone aktywne białko enzymatyczne dosusza się.

Według wynalazku preparat enzymatyczny B-galaktozydazy otrzymuje się również przez dezintegrację mechaniczną biomasy drożdży, rozprowadzonej wodą, wzbogaconą jonami potasu i magnezu. Po dezintegracji komórek drożdży oddziela się błony komórkowe, a aktywne białko enzymatyczne utrwala przez zamrażanie, liofilizację lub suszy metodą rozpyłową, dostosowaną do suszenia substancji biologicznie czynnych.

Istotną zaletą sposobu według wynalazku jest uzyskanie preparatu enzymatycznego B – galaktozydazy o standardowej aktywności i wysokiej rozpuszczalności w substratach. Enzym ten jest przydatny do hydrolizy laktozy nie tylko w mleku, ale i w serwatce, otrzymanej przy produkcji serów i białczanów. Ponadto w opracowanej metodzie stopień denaturacji białek enzymatycznych jest znikomy.

Badania wykazały, że B – galaktozydaza, otrzymana z komórek drożdży, wykazuje zbliżoną aktywność, zarówno gdy substratem jest roztwór czystej laktozy, jak i w przypadku gdy substratem jest laktoza, występująca w mleku.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach wykonania.

P r z y k ł a d I. Do wilgotnej biomasy drożdży dodaje się buforu fosforanowego o pH=6,5, zawierającego 0,15% potasu oraz chlorku magnezu, zawierającego 0,05% magnezu i dokładnie miesza w celu otrzymania jednolitej suspensji drożdży. Do otrzymanej suspensji drożdży ciągle mieszając dodaje się cienkim strumieniem aceton w temperaturze minus 20°C i zawartość przetrzymuje w temperaturze minus 18°C do minus 10°C przez kilkanaście minut, okresowo mieszając. Po tym okresie oddziela się aktywne wydzielone białko od pozostałego roztworu przez odwirowanie. Oddzielone aktywne białko ponownie rozprowadza się schłodzonym acetonem, natychmiast ponownie oddziela białko od acetonu. Uzyskane aktywne białko enzymatyczne przemycia się eterem etylowym, a następnie acetonem, po czym dokładnie filtruje i dosusza w temperaturze, nie przekraczającej 20°C. Otrzymuje się enzym B – galaktozydazę w postaci proszku o barwie kości słoniowej. Przechowuje się go szczelnie w zamkniętym opakowaniu w temperaturze 5°C. Aktywność enzymatyczną preparatu ustala się po upływie tygodnia. Aktywność preparatu, otrzymanego według wynalazku, wynosi 20000 jednostek orto-nitro-fenilo-beta-D-galaktopiranozydu (gram preparatu).

P r z y k ł a d II. Do wilgotnej biomasy dodaje się wodę z dodatkiem jonów potasu o stężeniu 0,15% i magnezu w ilości 0,05% o pH=6,5 i dokładnie miesza w celu uzyskania jednolitego roztworu bez zawiesiny. Całość schładza się możliwie szybko do temperatury 1–3°C i poddaje dezintegracji mechanicznej, używając urządzeń pozwalających na maksymalne rozrywanie struktury komórkowej. Uzyskany roztwór po dezintegracji komórek możliwie jak najszybciej poddaje się wirowaniu w celu oddzielenia błon komórkowych drożdży od roztworu, zawierającego aktywne białko enzymatyczne.

W celu pełnego utrwalenia wyjściowej aktywności obecnej w roztworze B – galaktozydazy roztwór poddaje się jednej z następujących operacji: zamrażaniu, liofilizacji lub suszeniu rozpyłowemu.

Zamrażanie prowadzi się w temperaturze od minus 20°C do minus 40°C w opakowaniach z tworzyw sztucznych. Roztwór przechowywany w stanie zamrożenia zachowuje dobrą rozpuszczalność i wyjściową aktywność enzymatyczną, to jest 180 jednostek orto-nitro-fenilo-beta-D- galaktopiranozydu/gram preparatu.

Liofilizację prowadzi się z dodatkiem nośników białka enzymatycznego w postaci skrobi lub laktozy, uzyskując preparat enzymatyczny, który przechowywany w temperaturze 5°C zachowuje aktywność 10000 jednostek orto-nitro-fenilo-beta-D- galaktopiranozydu/gram preparatu.

Suszenie rozpyłowe prowadzi się z dodatkiem nośników białka enzymatycznego przy użyciu suszarek, pozwalających na pełne zachowanie aktywności enzymatycznej preparatu. Wysuszony preparat B-galaktozydazy w postaci proszku wykazuje 80% rozpuszczalności i przechowywany w temperaturze 5°C zachowuje aktywność

12000 jednostek orto-nitro-fenilo-beta-D- galaktopiranozydu/gram preparatu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania preparatu enzymatycznego B-galaktozydazy, z n a m i e n n y t y m , że biomasę drożdży rozprowadza się wodą, wzbogaconą jonami potasu i magnezu, następnie uzyskaną suspensję komórek drożdży dezintegruje się za pomocą schłodzonego acetonu lub alkoholu etylowego, a z otrzymanego roztworu wydziela się aktywne białko enzymatyczne jedną ze znanych metod, po czym traktuje się eterem etylowym i acetonem, a wydzielone aktywne białko enzymatyczne dosusza się.

2. Sposób otrzymywania preparatu enzymatycznego B-galaktozydazy, z n a m i e n n y t y m , że rozprowadzoną biomasę drożdży w wodzie z dodatkiem jonów potasu i magnezu dezintegruje się mechanicznie, następnie oddziela błony komórkowe, a aktywne białko enzymatyczne utrwala przez zamrażanie, liofilizację lub suszy metodą rozpyłową, dostosowaną do suszenia substancji biologicznie czynnych.