

(19) RU (11) 94 025 573 (13) A1

(51) МПК⁶ C 12 N 9/36



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21), (22) Заявка: 94025573/13, 04.07.1994

(43) Дата публикации заявки: 27.06.1996

(71) Заявитель(и):

Товарищество с ограниченной
ответственностью "Ноосфера-Саратов"

(72) Автор(ы):

Кучкаев Б.И.,
Косаревская Е.Н.,
Косаревский А.В.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИЗОЦИМА ИЗ ЯИЧНОГО БЕЛКА

(57)

Изобретение относится к способам получения фермента лизоцима из белка куриных яиц, который находит применение в качестве лекарственного препарата, консерванта в пищевой промышленности, биотехнологии. Целью изобретения является разработка нового способа получения лизоцима, позволяющего ускорить процесс выделения фермента из яичного белка, сохраняя высокий выход и ферментативную активность, а также вторично использовать яичный

белок, освобожденный от лизоцима. Это достигается прямой кристаллизацией лизоцима из яичного белка при добавлении 5 мас.% NaCl и доведении pH до 9,8 двууглекислым натрием с последующей очисткой фермента двойной перекристаллизацией, причем на стадиях кристаллизации и перекристаллизации вводятся затравочные кристаллы лизоцима (0,005 мас. %). Для нейтрализации щелочного агента к яичному белку, освобожденному от лизоцима, добавляют раствор соляной кислоты.

RU 94025573 A1

RU 94025573 A1

(19) RU (11) 94 025 573 (13) A1

(51) Int. Cl.⁶ C 12 N 9/36



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 94025573/13, 04.07.1994

(43) Application published: 27.06.1996

(71) Applicant(s):

Tovarishchestvo s ogranichennoj
otvetstvennost'ju "Noosfera-Saratov"

(72) Inventor(s):

Kuchkaev B.I.,
Kosarevskaja E.N.,
Kosarevskij A.V.

(54) METHOD OF LYSOZYME PREPARING FROM EGG PROTEIN

(57)

FIELD: biotechnology, enzyme preparing.
SUBSTANCE: method involves the direct crystallization of lysozyme from egg protein by addition 5 wt.-% NaCl at pH 9.8 (with sodium hydrocarbonate) followed by purification of enzyme by double recrystallization. At crystallization and recrystallization stages

lysozyme seeding crystals were added (0.005 wt-%). Hydrochloric acid solution is added to free-lysozyme egg protein to neutralize an alkaline agent. Lysozyme is used as drug, preserving agent in food industry, in biotechnology. EFFECT: accelerated process, high yield and enzymatic activity, repeated use of lysozyme-free egg protein.

RU 94025573 A1

RU 94025573 A1

Изобретение относится к способам получения фермента лизоцима из белка, куриных яиц, который находит применение в качестве лекарственного препарата, консерванта в пищевой промышленности, биотехнологии.

Известен способ получения лизоцима, основанный на ультрафильтрации яичного белка

5 с последующим выделением его из обогащенного раствора с помощью ионообменных смол /Патент Великобритании N 1399090 МКИ С O7 G 7/026, кл. С 3 Н, опубл. 25.06.75/.

Недостатком этого способа является низкая технологичность стадии ультрафильтрации из-за высокой вязкости белка, что вызывает необходимость частой смены мембран и отрицательно сказывается на производительности.

10 Известны также способы выделения лизоцима с помощью ионообменных смол и хитина

/Ahvenainen R. Heikonen M. Kreuia M. // Food Process End. Proc. 2nd Internat. Congr. End.

and Food and 8^{ch} Eur. Food Symp. Helsinki, 1979, vol 2, London, 1980, 301-310;

патент Великобритании N 1110466, С O7 G, кл. С 3 Н, A5B, опубл. 18.04.68.

заявка ВНР N T/38 124, МКИ 4 С 12 Н 9/36;

15 авторское свидетельство СССР, N 178771, кл. 6а, 22/10, С 12 К. опубл. 19.3.66;

авторское свидетельство СССР, N 220920, кл. 6а, 22/10, опубл. 7.10.68/.

Недостатком этих способов является ограниченное время работоспособности ионообменных смол или хитина вследствие необратимой сорбции белков, необходимость длительной промывки носителей для отделения лизоцима и их последующей регенерации,

20 что делает подобные методы малопригодными для промышленного производства.

Описан способ получения лизоцима из яичного белка осаждением при пониженной температуре с помощью затравочных кристаллов лизоцима /-Патент Японии N 60-19991 МКИ 4, С 12 Н 9/36, опубл. 10.12.83:

патент США N 4504583, МКИ 3, С 12 Н 9/36, опубл. 12.03.85/. Однако получаемый

25 фермент обладает невысокой активностью из-за недостаточной очистки от других белков, кристаллизующихся при той же температуре.

Кроме того, способ имеет низкую производительность вследствие медленной скорости кристаллизации лизоцима в условиях, удаленных от его изоэлектрической точки (изоэлектрическая точка лизоцима pH=II).

30 Существует способ выделения лизоцима путем экстракции его водой в присутствии хлорида щелочного металла при pH 3,0-4,0 и нагреванием реакционной среды до 80-95°C для денатурации и отделения балластных белков /авторское свидетельство СССР, N 1239147 А1, кл. С 12 Н 9/36, опубл. 23.06.86/.

Недостатком способа является низкий выход и невысокая активность фермента, что 35 свидетельствует о недостаточной его чистоте.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемым результатам является способ получения лизоцима путем прямой кристаллизации из яичного белка при добавлении NaCl (до 5%) и доведении pH до 9,8 с помощью щелочного агента (NaOH), выдерживанием 48 часов при температуре 4°C, отделением лизоцима центрифугированием, повторным осаждением из надосадочной смеси после шестисуточного выдерживания его при 4°C и очисткой с помощью двойной перекристаллизации из раствора (растворение путем добавления раствора HCl до pH=4.5). /патент Франции N 92459, кл. C07g, A01n, опубл. 71068, дополнение к французскому патенту N 1444176, кл. C07g, A01n. опубл. 23.05.66/. Указанный способ позволяет 40 получать лизоцим с высокой активностью и хорошим выходом, однако требует больших затрат времени. Кроме того затруднено вторичное использование освобожденного от лизоцима белка куриных яиц из-за содержания в нем щелочи(NaOH)

Задачей изобретения является разработка нового способа получения лизоцима, позволяющего ускорить по сравнению с прототипом процесс выделения фермента из яичного белка, сохраняя высокий выход и ферментативную активность, а также вторично использовать яичный белок, освобожденный от лизоцима.

50 Эта задача достигается прямой кристаллизацией лизоцима при температуре 4°C добавлением к яичному белку NaCl (5 мас%) и доведением pH до 9,8 водным 15%

раствором двууглекислого натрия, дальнейшей очисткой фермента двукратной перекристаллизацией его из раствора (растворений при рН=4,5 за счет добавления водного 10% раствора HCl), последующей диализацией и лиофилизацией. При этом на стадиях кристаллизации и перекристаллизации вводят затравочные кристаллы лизоцима (0,005 мас%). К яичному белку, освобожденному от лизоцима добавляют 10% водный раствор HCl в количестве 10 мас% Образующаяся смесь, содержащая около 5% NaCl пригодна для повторного использования в пищевой промышленности.

Отличительными особенностями предлагаемого способа является добавление затравочных кристаллов лизоцима на стадиях кристаллизации (отличие от прототипа) и перекристаллизации, ускоряющих как процесс выделения лизоцима из белка, так и его очистку, а также применение в качестве щелочного агента соды, а не щелочи и добавление к яичному белку, освобожденному от лизоцима, раствора соляной кислоты для нейтрализации щелочного агента, что позволяет использовать образующуюся смесь в пищевой промышленности, например, для производства яичного порошка.

Применение затравочных кристаллов описано в патентах Японии N 60-19991 и США N 4504563 (см. выше). Отличие предлагаемого способа в том, что кристаллизация ведется при рН=9,8, близкой к изоэлектрической точке лизоцима. Это позволяет получать более чистый продукт за меньшее время.

Для обессоливания раствора лизоцима применяются обычные методы диализа, а для получения кристаллического препарата лиофильная сушка.

Следующий пример иллюстрирует изобретение.

Пример. К 10 кг белка куриных яиц при постоянном медленном перемешивании добавляют порциями 500 г NaCl, а затем 15% водный раствор Na₂CO₃ до достижения рН=9,8. После чего добавляют 500 мг затравочных кристаллов лизоцима (0,005 мас%).

Большее количество затравочных кристаллов не приводит к заметному увеличению скорости кристаллизации, а меньшее-замедляет процесс. Полученную смесь выдерживают при температуре 4°C в течение 36 часов. Образовавшиеся хлопья лизоцима отделяют центрифугированием. Надо садочную жидкость выдерживают при температуре 4°C в течение двух суток для окончательного выделения лизоцима, который также отделяют центрифугированием. В полученную надсадочную жидкость добавляют 10% водный раствор HCl для нейтрализации Na₂CO₃ и она становится пригодной для использования в пищевой промышленности. Осадки, содержащие лизоцим после центрифугирования объединяют и подвергают очистке двойной перекристаллизацией. Для этого к объединенному осадку добавляют два объема воды и путем добавления раствора HCl (при постоянном медленном перемешивании) доводят до рН=4,5. После этого смесь фильтруют. Затем к раствору добавляют 5% (по массе раствора), NaCl, раствор Na₂CO₃ до достижения рН=9,8 и затравочные кристаллы лизоцима (0,005% от массы осадка) и оставляют на одни сутки при температуре 4°C. Осадок отделяют центрифугированием и повторяют операцию перекристаллизации. При второй перекристаллизации внесение затравочных кристаллов не требуется, а выдерживание при 4°C длится несколько часов. После диализа и лиофилизации получают около 10 г кристаллического лизоцима, имеющего активность 15-25 тыс.ед. в зависимости от качества исходного сырья.

Предложенный способ получения лизоцима из яичного белка по сравнению с прототипом позволяет ускорить процесс выделения фермента в несколько раз за счет уменьшения времени кристаллизации и перекристаллизации и позволяет использовать яичный белок, освобожденный от лизоцима, в пищевой промышленности, например, для получения яичного порошка.

Формула изобретения

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения лизоцима из яичного белка путем прямой кристаллизации при добавлении 5% по массе NaCl и доведения pH до 9,8 щелочным агентом с последующей очисткой лизоцима двукратной перекристаллизацией, отличающейся тем, что на стадиях

криSTALLизации и перекристаллизации добавляют затравочные кристаллы, в качестве щелочного агента используют двууглекислый натрий и к яичному белку, освобожденному от лизоцима, добавляют раствор HCl.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50