



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008119295/13, 15.05.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.05.2008

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.05.2008

(43) Дата публикации заявки: 20.11.2009 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 20.01.2013 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Шумилина Е.В. и др. Влияние соосаждения и взаимодействий с анионными поверхностно-активными веществами на активность растительной фосфолипазы D, журнал "Биохимия", август 1999, том 64, №8, с.1052-1058. US 6924130 B1, 02.08.2005. SU 560614 A1, 05.06.1977.

Адрес для переписки:

109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", И.С. Саломатиной

(72) Автор(ы):

**ДОРОВСКА-ТАРАН Виктория (NL),
Дрыгин Юрий Фёдорович (RU),
Зуева Вера Сергеевна (RU),
Галиуллина Раиса Анваровна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

ЛОДЕРС КРОКЛАН Б.В. (NL)**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФОСФОЛИПАЗЫ D**

(57) Реферат:

Изобретение относится к пищевой промышленности. Способ получения фосфолипазы D из моркови предусматривает обеспечение жидкого экстракта моркови и его контактирование с осветляющим средством. Осветляющее средство включает ионы одного или нескольких металлов. Стадию осветления проводят при рН от 7 до 9. Полученная суспензия включает осветленный жидкий экстракт и осадок. Осветленный жидкий

экстракт отделяют и объединяют с осаждающим средством. Осаждающее средство включает, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество в смеси с фосфолипидами и необязательно с моно-, ди- или триглицеридами. Полученная суспензия содержит супернатант и осадок. Осадок отделяют и собирают как целевой продукт. Изобретение позволяет получить из моркови фосфолипазу D с высокой степенью чистоты. 13 з.п. ф-лы, 1 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A23D 9/00 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2008119295/13, 15.05.2008**

(24) Effective date for property rights:
15.05.2008

Priority:

(22) Date of filing: **15.05.2008**

(43) Application published: **20.11.2009** Bull. 32

(45) Date of publication: **20.01.2013** Bull. 2

Mail address:

**109012, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", I.S. Salomatinoj**

(72) Inventor(s):

**DOROVSKA-TARAN Viktorija (NL),
Drygin Jurij Fedorovich (RU),
Zueva Vera Sergeevna (RU),
Galiullina Raisa Anvarovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

LODERS KROKLAN B.V. (NL)

(54) PHOSPHOLIPASE D PRODUCTION METHOD

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: invention relates to food industry.

The method for production of carrot phospholipase D envisages obtaining of a liquid carrot extract and its contacting with a clearing medium. The clearing medium includes ions of one or several metals. The clearing stage is performed at pH equal to 7-9. The produced suspension includes a clarified liquid extract and sediment. The clarified liquid extract is

separated and combined with a precipitating medium. The precipitating medium includes at least one surface-active substance in a mixture with phospholipids and optionally - with mono-, di- or triglycerides. The produced suspension contains a supernatant and sediment. The sediment is separated and collected as the target product.

EFFECT: invention allows to produce carrot phospholipase D with a high purity degree.

14 cl, 1 tbl, 3 ex

Настоящее изобретение имеет отношение к способу получения фосфолипазы D. В частности, изобретение имеет отношение к способу получения фосфолипазы D из овощей или орехов.

5 Фосфолипазу D из растений и микроорганизмов применяют в качестве биокатализатора для превращения фосфолипидов в жирные кислоты и другие гидрофобные вещества. В частности, фосфолипаза D способна как трансфосфатидилировать, так и гидролизовать разнообразные фосфолипиды. Трансфосфатидилирование особенно полезно для превращения фосфатидилхолина в
10 другие фосфолипиды.

Способы выделения фосфолипазы D из растений и микроорганизмов известны. Например, в работе Sharma et al, (2000), Bioseparation., vol.9, pages 93-98 была раскрыта очистка фосфолипазы D из арахиса путем осаждения с альгинатом. Очистка состояла из соосаждения фосфолипазы D с альгинатом при добавлении 0,06 М Ca²⁺. Фермент
15 элюировали из полимера, применяя 0,2 М хлорид натрия.

Однако сохраняется необходимость в способе получения фосфолипазы D из овощей или орехов, который мог бы быть проведен экономно и эффективно.

В соответствии с изобретением, представляется способ получения фосфолипазы D
20 из овощей или орехов, включающий следующие стадии:

(i) обеспечение жидкого экстракта овощей или орехов;

(ii) контактирование жидкого экстракта, полученного на стадии (i), с осветляющим средством, включающим ионы одного или нескольких металлов, для получения
25 суспензии, включающей осветленный жидкий экстракт и осадок, и отделение и сбор осветленного жидкого экстракта из полученной суспензии, причем стадию (ii) проводят при pH от 7 до 9;

(iii) объединение жидкого экстракта с осаждающим средством, включающим фосфолипиды, моно-, ди- или триглицериды или их смесь, с добавлением, по меньшей
30 мере, одного поверхностно-активного вещества, для получения суспензии, включающей супернатант и осадок;

и (iv) отделение и сбор осадка из суспензии, полученной на стадии (iii).

Также изобретение обеспечивает применение фосфолипазы D, полученной с
35 помощью способа изобретения, при получении фосфолипидов.

Любые овощи или орехи, которые содержат фосфолипазу D, могут быть использованы для получения жидкого экстракта, используемого в настоящем изобретении. Предпочтительно, жидкий экстракт овощей или орехов получали из проростков пшеницы или подсолнечника, моркови, капусты или арахиса. Особенно
40 предпочтительными были экстракты из моркови.

Жидкий экстракт, используемый в настоящем изобретении, был предпочтительно предоставлен в форме сока, живицы или похожих жидких препаратов. Жидкий экстракт может быть не полностью жидким и может включать некоторое количество твердых частиц. Обычно овощи или орехи охлаждают до температуры ниже
45 комнатной температуры (т.е. ниже 25°C), например при температуре от 1 до 10°C или от 2 до 7°C, промывают и измельчают. Сок или живицу затем экстрагировали из измельченных препаратов с помощью способов известных в этой области техники, например, применяя бытовую или промышленную соковыжималку. В некоторых
50 случаях часть исходного количества фосфолипазы D в источнике, представляющем собой овощи или орехи, может быть потеряна с твердыми отходами после первоначального извлечения сока или живицы. Необязательно, дополнительная фосфолипаза D может быть экстрагирована из этих твердых отходов путем

добавления воды и повторного отжима через соковыжималку. Специалистом в этой области техники будет оценено по достоинству то, что жидкие экстракты, полученные на каждой из описанных выше стадий экстракции, могут быть объединены для получения жидкого экстракта для использования на стадии (i).

5 Предпочтительно, способ получения жидкого экстракта для использования на стадии (i), такой как был описан выше, осуществляли при температуре ниже комнатной температуры (т.е. ниже 25°C), например, при температуре примерно от 1 до 10°C или от 2 до 7°C. Полученный в результате супернатант собирали и, если его
10 предполагалось хранить, то его предпочтительно замораживали в жидком азоте и хранили при приблизительно -70°C.

Для контроля эффективности описанных выше способов экстракции и для того, чтобы убедиться в том, что из овощей или орехов было экстрагировано необходимое количество фосфолипазы D, может быть использован наиболее распространенный
15 способ определения активности фосфолипазы D.

Применяя описанный выше способ экстракции, можно получить высокий выход экстракта из овощей или орехов. Например, из 1 кг сырой моркови может быть экстрагировано от 0,6 до 0,67 литров жидкого экстракта.

20 Следует понимать, что жидкий экстракт, полученный с помощью описанного выше способа экстракции, может содержать осадок. Например, неочищенные экстракты моркови могут содержать плавающий липид, насыщенный каротином. Следовательно, жидкий экстракт подвергают очистке перед стадией (iii) для получения осветленного жидкого экстракта. Предпочтительно, следовательно, чтобы жидкий
25 экстракт находился в форме осветленного жидкого экстракта.

Очистка обычно включает контакт жидкого экстракта с осветляющим средством, включающим один или несколько ионов металла, для получения суспензии, включающей осветленный жидкий экстракт и осадок. Полученный осветленный
30 жидкий экстракт затем отделяли и отбирали из суспензии.

Таким образом, способ изобретения включает следующие стадии перед стадией (iii):

а) инкубация жидкого экстракта, полученного на стадии (i), с осветляющим средством, включающим один или несколько ионов металлов, для получения суспензии, включающей осветленный жидкий экстракт и осадок; и

35 б) отделение и отбор осветленного жидкого экстракта из суспензии, полученной на стадии (a).

Обычно, один или несколько ионов металлов в осветляющем средстве представляют собой моно- или двухвалентные ионы, например ионы кальция, натрия, калия, магния и их смеси. Например, может быть использована соль галогенида подходящего иона металла, такого, как был описан выше. Двухвалентные ионы кальция представляют собой предпочтительные ионы, представленные обычно в
40 форме хлорида кальция.

Концентрация одного или нескольких ионов металлов на стадии (a) предпочтительно составляет от 20 до 60 мМ, например от 30 до 50 мМ или от 35 до 45
45 мМ.

Инкубацию на стадии (a) жидкого экстракта, полученного на стадии (i), с осветляющим средством предпочтительно проводили при температуре ниже комнатной температуры, т.е. ниже 25°C, например при температуре примерно от 1 и
50 20°C, более предпочтительно от 1 до 15°C, например от 2 до 10°C или от 2 до 7°C. Во время инкубации смесь тщательно перемешивали (например, с помощью механического перемешивания).

Предпочтительно, стадию (а) проводили при значении рН примерно от 4 до 9. Наиболее предпочтительно, величина рН была выше 7, например примерно от 7 до 9 или от 7 до 8. Желаемую величину рН можно было получить с помощью способов, известных в этой области техники, например путем добавления любого подходящего основания, такого как гидроксид натрия или гидроксид аммония.

В предпочтительном воплощении стадии (а), после инкубации жидкого экстракта, полученного на стадии (i), с осветляющим средством, рН доводили до желаемого значения, температуру смеси предпочтительно снижали приблизительно до 0°C и смесь оставляли в течение достаточного времени (например, примерно 20 минут) для образования осадка.

Осветленный жидкий экстракт, полученный на стадии (а), может быть отделен от осадка с помощью известных в этой области техники способов, например с помощью центрифугирования и/или фильтрования. Например, на стадии (b) суспензия может быть отфильтрована, и фильтрат центрифугировали при приблизительно 9000 грм в течение примерно 15 минут.

На протяжении стадии (b) температуру предпочтительно поддерживали ниже комнатной температуры, например при температуре примерно от 1 до 20°C, более предпочтительно от 1 до 15°C, такую как от 2 до 10°C или от 2 до 7°C.

Обычно стадии (а) и (b) приводили к незначительному снижению количества фосфолипазы D в жидком экстракте. Например, очистка может приводить к менее чем 10%-ному по массе снижению количества фосфолипазы D в осветленном жидком экстракте по сравнению с неосветленным жидким экстрактом.

Осаждающее средство, используемое в способе изобретения, было предпочтительно в форме водной эмульсии. Предпочтительно, осаждающее средство включало фосфолипиды. Фосфолипиды могли быть синтетическими или могли быть получены из природных источников. Типичные примеры фосфолипидов, которые могут присутствовать во втором осаждающем средстве, включают фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, сфингомиелин и их смеси. Предпочтительным фосфолипидом был фосфатидилхолин.

Осаждающее средство, примененное в изобретении, может быть получено из веществ, существующих в природе, полученных из животных и растительных источников, таких как лецитин, цефалин и сфингомиелин. Предпочтительно осаждающее средство было получено из лецитина.

Лецитин содержит смесь гликолипидов, триглицеридов и фосфолипидов (например, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозитола) и может быть получен из природных источников или может быть синтетической природы.

Предпочтительно, лецитин для применения в получении осаждающего средства получали из источников животного или растительного происхождения, таких как соевые бобы, яичный желток или семена рапса, применяя общепринятые способы получения. Подходящий коммерчески доступный препарат лецитина включает, например, Membranol-35.

Предпочтительно, содержание фосфолипидов лецитина для применения в получении осаждающего средства было больше чем 15% по массе, более предпочтительно больше чем 25% по массе, например больше чем 30% по массе или больше чем 50% по массе.

В предпочтительном воплощении количество по массе фосфолипидов в осаждающем средстве составляло от 0,1 до 7% по массе, например от 0,5 до 4% по массе, более предпочтительно от 0,8 до 3% по массе или от 0,8 до 2% по массе.

Количество фосфолипидов на стадии (iii), рассчитанное на общий реакционный объем, составляло примерно от 0,05 до 1% по массе, более предпочтительно от 0,1 до 0,5% по массе, например от 0,1 до 0,3% по массе.

5 Содержание фосфатидилхолина по отношению к массе фосфолипидов, присутствовавших в осаждающем средстве, предпочтительно было больше, чем 15% по массе. Например, содержание фосфатидилхолина могло изменяться в пределах от 20 до 100% по массе, например от 20 до 80% по массе, от 25 до 60% по массе, или от 25 до 40% по массе фосфолипидов в осаждающем средстве.

10 Необязательно, осаждающее средство дополнительно включает один или несколько ионов металлов. Один или несколько ионов металлов предпочтительно были моно- или двухвалентными ионами, например ионами натрия, калия, кальция, магния и их смесями. Например, осаждающее средство может включать водный раствор соли галогенида подходящего иона металла. Двухвалентные ионы кальция представляют собой предпочтительные ионы, которые обычно были представлены в форме хлорида кальция.

15 Концентрация одного или нескольких ионов металлов на стадии (iii) предпочтительно находилась в пределах от 20 до 60 мМ, например от 30 до 50 мМ или от 35 до 45 мМ.

20 В предпочтительном воплощении, в котором жидкий экстракт подвергали очистке (т.е. стадии (a) и (b)), следует по достоинству оценить то, что один или несколько ионов металлов уже присутствовали в осветленном жидком экстракте и, вследствие этого, не нужно было включать в осаждающее средство один или несколько ионов металлов. Однако по причине того, что часть ионов кальция может связаться с осадком на стадии (b), в предпочтительном воплощении осаждающее средство включает один или несколько ионов металлов, предпочтительно в таком количестве, чтобы концентрация ионов металлов на стадии (iii) снижалась, оставаясь в пределах

30 предпочтительной концентрации, такой как была описана выше.

Осаждающее средство дополнительно включает, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество. Ионные или неионные поверхностно-активные вещества предпочтительно присутствуют во втором осаждающем средстве, особенно предпочтительны ионные поверхностно-активные вещества. Подходящие ионные

35 поверхностно-активные вещества включают анионные поверхностно-активные вещества, например соль карбоновой кислоты, такой как холевая кислота, соль сульфата линейного (от C4 до C24) алкила, такого как додецилсульфат натрия или их смесь. Подходящие соли холевой кислоты включают, например, пищевые соли, такие как соли натрия. Додецилсульфат натрия представляет собой предпочтительное

40 поверхностно-активное вещество.

Количество поверхностно-активного вещества в осаждающем средстве предпочтительно составляло от 0,05 до 5% по массе, более предпочтительно от 0,1 до 3% по массе или от 0,2 до 1,5% по массе.

45 Количество поверхностно-активного вещества на стадии (iii), на основе общего реакционного объема, предпочтительно составляло от 0,01 до 3% по массе, более предпочтительно от 0,05 до 1,0% по массе, наиболее предпочтительно от 0,08 до 0,16% по массе.

50 В предпочтительном воплощении, осаждающее средство получают в виде водной эмульсии. Преимущественно, осаждающее средство получают в виде гомогенной смеси. Это может быть достигнуто, например, просто с помощью механического перемешивания осаждающего средства в водной среде в течение подходящего

промежутка времени. Присутствие поверхностно-активных веществ может способствовать диспергированию компонентов осаждающего средства в водной среде.

Осаждающее средство предпочтительно имело рН больше чем 7, предпочтительно рН был равен приблизительно от 7 до 9, например от 7 до 8,5 или от 7,2 до 8. Это значение рН может быть достигнуто с помощью известных в этой области техники способов, например, путем добавления любого подходящего основания, такого как гидроксид натрия или гидроксид аммония.

Стадию (iii) способа изобретения предпочтительно проводили при температуре ниже комнатной температуры, т.е. при температуре ниже 25°C. Наиболее предпочтительно, стадию (iii) осуществляли при температуре примерно от 0 до 15°C, например, от 1 до 10°C или от 1 до 5°C. Обычно значение рН смеси на стадии (iii) было больше, чем 7 (например, при рН в пределах примерно от 7 до 9, наиболее предпочтительно, в пределах примерно от 7 до 7,5).

Не будучи связанными в рамках определенной теории, считается, что во время стадии (iii) изобретения, фосфолипаза D в жидком экстракте адсорбируется, образует комплексы или иным способом связывается с осадком, образовавшимся из одного или нескольких ионов металлов и поверхностно-активного вещества. Например, если жидкий экстракт взаимодействует с осаждающим средством, включающим додецилсульфат натрия (SDS) в присутствии хлорида кальция, считается, что фосфолипаза D адсорбируется на образовавшемся осадке кальций/SDS.

Стадию (iii) предпочтительно проводили до того этапа, на котором, по меньшей мере, 30% по массе или, по меньшей мере, 40% по массе фосфолипазы D в жидком экстракте возвращалось в осадок. Более предпочтительно, по меньшей мере, 50% по массе, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 60% по массе или, по меньшей мере, 66% по массе фосфолипазы D в жидком экстракте возвращалось в осадок.

Хотя скорость образования осадка или возвращения фосфолипазы D в осадок может изменяться в зависимости от температуры и других изменяемых параметров способа, стадию (iii) предпочтительно проводили в течение примерно, по меньшей мере, 5 минут, более предпочтительно в течение больше чем 30 минут или 1 час. Наиболее предпочтительно, стадию (iii) проводили в течение примерно от 30 минут до 30 часов, например от 1 до 24 часов, от 1 до 10 часов, от 1 до 5 часов или от 1,5 до 2,5 часов.

Осадок, полученный на стадии (iii), может быть отделен от супернатанта, с помощью известных в этой области техники способов, таких как центрифугирование и/или фильтрация. Например, на стадии (iv) суспензию можно центрифугировать при приблизительно 6000 rpm в течение примерно 15 минут.

Во время стадии (iv) температуру предпочтительно поддерживали ниже комнатной температуры, например примерно от 1 до 20°C, более предпочтительно от 1 до 15°C, например от 2 до 10°C или от 2 до 7°C.

Обычно собранный осадок впоследствии высушивают. Высушивание осадка может быть проведено с применением известных в этой области техники способов. В предпочтительном воплощении осадок суспендировали в воде, замораживали (например, в жидком азоте) и лиофилизировали.

С целью улучшить срок годности при хранении или сохранить активность фосфолипазы D, полученной с помощью изобретения, фосфолипазу D предпочтительно лиофилизировали в присутствии хлорида калия, гистидина-HCl, хлорида кальция, ацетата натрия или их смеси, обычно, при рН примерно от 5 до 7. Наиболее предпочтительно, фосфолипазу D, полученную с помощью изобретения,

лиофилизуют в присутствии хлорида калия и ацетата натрия при рН примерно от 5 до 6.

Количество полученной фосфолипазы D, рассчитанное на общий объем жидкого экстракта, было предпочтительно больше чем 0,2% по массе, например больше чем 0,3% по массе или больше чем 0,5% по массе, наиболее предпочтительно больше чем 0,7% по массе.

Изобретение также обеспечивает применение фосфолипазы D, полученной с помощью способа изобретения, в получении фосфолипидов. Типичные примеры фосфолипидов, которые могут быть получены с применением фосфолипазы D, включают фосфатидилсерин, фосфатидную кислоту, фосфатидинозитол, фосфатидилглицерол, фосфатидилэтанол, фосфатидилглюкозу, фосфатидилбутанол, фосфатидилметанол, фосфатидилэтаноламин и их смеси.

Следующие неограничивающие примеры иллюстрируют изобретение и никаким образом не ограничивают его объем. В примерах и по всему описанию все проценты, части и отношения даны по массе, если не указано иначе.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Пример 1

Получение PLD из моркови путем осаждения фермента с помощью Ca-SDS Mtnzbranol-35

3,9 килограммов моркови, исходно охлажденной до 4°C, промывают и измельчают. Сок получают с помощью соковыжималки Braun MP 80 при 4°C.

Дополнительную PLD, оставшуюся в твердых отходах (выжимках) моркови, извлекают с помощью повторного отжима твердых отходов в соковыжималке. В совокупности получают 2400 мл морковного сока и 1500 г отходов. Сок фильтруют через 4 слоя марли. Фильтрат центрифугируют при 9000 rpm (центрифуга Beckman J-21, ротор JA-14) в течение 15 мин при 4°C. После центрифугирования получают 2300 мл супернатанта, который замораживают в жидком азоте и хранят at -70°C. Супернатант был ярко-желтого цвета.

Морковный сок быстро размораживают в тепловатой воде и затем помещают в водно-ледяную баню. К 300 мл размороженного сока медленно при постоянном перемешивании добавляют 14 мл 1M CaCl₂ до конечной концентрации, равной 40 mM. рН смеси тщательно доводят до рН 7,4, добавляя 1M NH₄OH, и оставляют на 20 мин при 0°C. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием при 6000 rpm (центрифуга Beckman J-21, ротор JA-14) в течение 15 мин при 4°C. Супернатант (осветленный сок) собирают.

К 160 мл осветленного сока добавляют 16 мл эмульсии SDS-Membranol-35 (см. Пример 2 для получения эмульсии) и смесь хорошо перемешивают. 8 мл 1 M CaCl₂ добавляют маленькими порциями (по 1 мл). При перемешивании добавляют по каплям 5 мл раствора 1N NH₄OH до тех пор, пока рН не достигнет значения равного примерно 7,15. Всю смесь хранят в ледяной бане в течение приблизительно 2-х часов. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием при 6000 rpm (центрифуга Beckman J-21, ротор JA-14) в течение 15 мин при 4°C. Осадок суспендируют примерно в 5 мл воды, замораживают в жидком азоте и лиофилизуют.

После лиофилизации получают 1,29 г лиофилизованного препарата. Из 1 мл морковного сока было получено приблизительно 8 мг порошка (активности см. в таблице 1).

Пример 2

Получение эбульсии SDS-Membranol-35

К 1,2 мл Membranol-35 (Lipid Nutrition B.V., Wormerveer, The Netherlands) при перемешивании добавляют 0,15 мл IN NaOH и 2,4 мл 10%-ного водного раствора додецилсульфата натрия (SDS). Затем при энергичном перемешивании маленькими порциями (5 раз x 1 мл) добавляют воду до тех пор, пока не образуется гомогенная смесь. Затем добавляют воду до 40 мл общего объема, и смесь перемешивают в течение примерно 30 мин с помощью мешалки.

Пример 3

Получение PLD из моркови с помощью осаждения этанолом

К одному объему осветленного и охлажденного (0°C) сока, медленно при постоянном перемешивании, добавляют 0,4 объема охлажденного этанола, температуру смеси поддерживают в пределах от 0°C до -5°C. Смесь оставляют на 30-60 мин при -13°C -15°C, затем центрифугируют при -10°C при 9000 rpm (ротор JA-14, 15 мин). Супернатант отбрасывают, а осадок быстро суспендируют в 0,1-0,2 объема воды (от исходного объема сока) в лабораторном смесителе с прямым приводом и с постоянно заданным максимальным крутящим моментом, суспензию центрифугируют при 14,000 rpm в течение 15 мин в роторе JA-20 при 2-4°C и получают супернатант 1. Экстракцию водой повторяют еще один раз и получают супернатант 2. Оба супернатанта (1 и 2) объединяют и добавляют 2М KCl, 1 М CaCl₂ и 2М ацетат калия (рН 5,6) до конечной концентрации 220 мМ, 40 мМ и 20 мМ, соответственно (активности см. в таблице 1).

Характеристики препаратов PLD, осажденной с помощью этанола, и PLD, осажденной с помощью Ca-SDS-Membranol-3 (определено с помощью рН-титриметрии и/или с помощью TLC)		
Препарат PLD	Специфические активности PLD по отношению к 1 мл сока моркови (мкмоль/мин.мл)	Специфические активности PLD по отношению к 1 мг препарата (мкмоль/мин.мг)
*Полученный морковный сок	10,69±0,5	Примерно 0,01
[#] Высушенный при пониженном давлении Ca-SDS-Membranol-3 5 препарат, осажденный из осветленного морковного сока	5,3±0,33	0,66±0,04
[#] Высушенная при пониженном давлении PLD, осажденная из осветленного морковного сока этанолом в присутствии ацетата натрия	0,62±0,08	0,31±0,04

* Активности определяли с помощью титриметрии

[#]Активности определяли с помощью визуального сравнения интенсивности пятен PA на пластинке TLC. Сравнивали ряд из 4 двукратно разведенных образцов стандартного препарата PLD и исследуемых препаратов ферментов. Активности стандартного препарата PLD определяли с помощью титриметрии.

Формула изобретения

1. Способ получения фосфолипазы D из моркови, включающий следующие стадии:

(i) обеспечение жидкого экстракта моркови;

(ii) контактирование жидкого экстракта, полученного на стадии (i), с осветляющим средством, включающим ионы одного или нескольких металлов, для получения суспензии, включающей осветленный жидкий экстракт и осадок, и отделение и сбор осветленного жидкого экстракта из полученной суспензии, причем стадию (ii) проводят при рН от 7 до 9;

(iii) объединение осветленного жидкого экстракта из (ii) с осаждающим средством, включающим, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество в смеси с

фосфолипидами и необязательно с моно-, ди- или триглицеридами или их смесью для получения суспензии, содержащей супернатант и осадок;

(iv) отделение и сбор осадка из суспензии, полученной в (iii).

2. Способ по п.1, где осаждающее средство находится в виде водной эмульсии.

3. Способ по п.1, где осаждающее средство получают из лецитина.

4. Способ по п.1, где осаждающее средство из (iii) дополнительно включает ионы одного или нескольких металлов.

5. Способ по п.1, где поверхностно-активное вещество представляет собой анионное поверхностно-активное вещество.

6. Способ по п.5, в котором поверхностно-активное вещество выбирают из соли холевой кислоты, додецилсульфата натрия и их смесей.

7. Способ по п.6, в котором соль холевой кислоты представляет собой холат натрия.

8. Способ по п.1, в котором ионы одного или нескольких металлов представляют собой двухвалентные ионы кальция.

9. Способ по п.8, в котором двухвалентные ионы кальция представлены в форме хлорида кальция.

10. Способ по п.1, в котором стадию (iii) проводили при рН от 7 до 9.

11. Способ по п.1, в котором стадию (iii) осуществляют при температуре ниже 25°C, предпочтительно при температуре от 0 до 15°C.

12. Способ по п.1, в котором собранный осадок сушат.

13. Способ по п.1, в котором количество поверхностно-активного вещества находится в диапазоне от 0,05 до 3% по массе.

14. Способ по п.3, в котором лецитин получают из животных и растительных источников.