



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

259211

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 27/00

(22) Prihlášené 02 08 85

(21) PV 5672-85

(40) Zverejnené 15 02 88

(45) Vydané 15 03 89

(75)

Autor vynálezu

DOBŘÁNSKY TOMÁŠ ing., SOVA OTO MUDr. CSc., KOŠICE

(54) Spôsob výroby amfolytických pufrov

Účelom spôsobu výroby amfolytických pufrov na báze bielkovín je ich rozloženie na základné stavebné kamene - aminokyseliny a ich torza minerálnou hydrolýzou. Uvedeného účelu sa dosiahne použitím štandardného odstredeného mlieka s 6 molárnou kyselinou chlorovodíkovou pri teplote 105 °C po dobu 40 hodín. Po hydrolýze sa kyselina chlorovodíková z roztoku odparí a zostávajúci roztok sa podrobí autofokusácii. Zo získaných frakcií sa pre konečný produkt vyberajú tie, ktoré sa najviac blížia svojími hodnotami požadovanému rozsahu. Spôsob výroby amfolytických pufrov môže nájsť široké praktické použitie vo výskumných pracoviskách, v priemysle farmaceutickom, chemickom, potravinárskom a pri všetkých využitíach elektromigračných techník.

Vynález sa týka spôsobu prípravy amfolytických pufrov, vhodných pre elektromigračné metódy, ako izoelektrické fokusovanie.

Doteraz sa pre izoelektrické fokusovanie a iné elektromigračné metodiky ako amfolytické pufre používali syntetické látky. Príprava týchto látok je veľmi zložitá a nákladná. Preto sú uvedené výrobky ťažko dostupné a vylučujú ich použitie v preparatívnom meradle pri priemyselnom použití. Výroba amfolytických pufrov podľa ČSSR AO č. 187 104 má tú nevýhodu, že východzia surovina obsahuje až 40 % solí, čo komplikuje spôsob výroby, pretože vyžaduje odsoľovanie gélovou filtráciou.

Uvedené nevýhody odstraňuje vynález, ktorého podstata spočíva v tom, že bielkoviny získané z odstredeného mlieka štandardného zloženia sa podrobia minerálnej hydrolýze kyselinou chlorovodíkovou. Táto sa zo vzniknutého roztoku odstráni odparením a zostávajúcim roztokom sa po prefiltrovaní naplní autofokusačná aparátúra, kde pôsobením jednosmerného prúdu sa získa gradient pH. Zmiešaním vybraných frakcií sa získavajú amfolytické pufre požadovaného rozsahu.

Vynález umožňuje jednoduchú výrobu veľkého množstva amfolytických pufrov so štandardnými vlastnosťami, bez obsahu sacharózy pre analytické i priemyselné použitie izoelektrickej separácie, expedovateľné aj v lyofilizovanom stave, čo predlží expiračnú dobu pufrov.

P r í k l a d

K príprave amfolytických pufrov z odstredeného mlieka s maximálnym obsahom tuku 0,05 objem. percent, ktoré obsahuje 26 až 30 g kazeínu v litri. Prvým krokom je izolácia mliečnej bielkoviny vyzrážaním v izoelektrickom bode pri pH 4,7 jednomolárnym roztokom kyseliny chlorovodíkovej. Po naslednom odstredení pri 10^4 m.s^{-2} 20 minút sa na izolovaný kazeín pôsobí šesťmolárnym roztokom kyseliny chlorovodíkovej v pomere 1:50 k množstvu bielkoviny, ktorá sa ďalej hydrolyzuje pod spätným chladičom pri teplote 105°C 40 hodín. Do roztoku sa pridáva 10 ml/l kyseliny mravenčej, aby sa zabránilo vzniku huminových látok, ktoré sú produktami rozkladajúceho sa tryptofánu v prítomnosti cukorných zložiek.

Pred započatím hydrolýzy sa do roztoku pridáva 1 % hmot. aktívneho uhlí, ktorý už behom hydrolýzy viaže na seba väčšinu látok obsahujúcich ultrafialové svetlo a roztok vyčisťuje. Po skončení hydrolýzy sa roztok ochladí na teplotu 20°C a po filtrácii sa z filtrátu odparí kyselina chlorovodíková za zníženého tlaku najvhodnejšie v rotačnom odparováku pri teplote 40°C tak, aby výsledný roztok vykazoval mernou elektrickou vodivosť 2 až 3 mS.cm^{-1} . Potom sa roztok naleje do autofokusera, kde prebieha autofokusácia pri 4°C po dobu 48 až 72 hodín tak, aby príkon elektrického prúdu nepresahoval 3 W. Napätie sa postupne zvyšuje z počiatočných 100 V až na 100 V. Po ukončení autofokusovania, keď klesne prúd pod 0,5 mA sa z fokusačnej aparatury zhromaždia tie frakcie, ktoré sú najbližšie v gradiente pH k hodnotám, žiadúcim po projekcii potrebného rozsahu pH pre výsledný produkt.

Zvolená zmes sa podľa potreby môže ešte raz refokusovať. Výsledná vodivosť pufrov sa upraví na 1 mS.cm^{-1} a obsah sušiny na 40 % hmot. Získaný produkt sa pre izoelektrickú fokusáciu použije v 2 až 3 objemových % koncentracii v pomere k médiu.

Vynález môže nájsť široké praktické použitie vo výskumných pracoviskách, v priemysle farmaceutickom, chemickom, potravinárskom a pri všetkých využitíach elektromigračných techník.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob výroby amfolytických pufrov na báze bielkovín vyznačujúci sa tým, že odstredeného mlieka sa hydrolyzuje kyselinou chlorovodíkovou, výhodne 6 mol kyselinou chlorovodíkovou, následne odparuje do hodnoty vodivosti roztoku 2 až 3 mS.cm^{-1} a roztok sa autofokusuje aspoň 48 hod.