



(51) МПК
C12N 9/00 (2006.01)
C07C 39/00 (2006.01)
C07C 403/08 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010108916/10, 11.03.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.03.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.03.2010

(43) Дата публикации заявки: 20.09.2011 Бюл. № 26

(45) Опубликовано: 27.01.2012 Бюл. № 3

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: BECK B.D. Utilization of Quantitative

Structure-Activity Relationships (QSARs) in Risk Assessment: Alkylphenols // Regulatory Toxicology and Pharmacology, №14, 1991, pp.273-285. RU 2239657 C2, 10.11.2004. RU 2238318 C1, 20.10.2004. RU 2288228 C2, 13.03.2002. JP 57193456 A, 27.11.1987, реферат. US 2008051404 A1, 28.02.2008. RU 2395510 C2, 27.01.2009.

Адрес для переписки:

117418, Москва, ул. Гарибальди, 31, корп.2,
 кв.31, Ю.А. Николаеву

(72) Автор(ы):

Эль-Регистан Галина Ивановна (RU),
 Николаев Юрий Александрович (RU),
 Калинин Михаил Владимирович (RU),
 Гернет Марина Васильевна (RU),
 Шаненко Елена Феликсовна (RU),
 Лойко Наталья Геннадьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Эль-Регистан Галина Ивановна (RU),
 Николаев Юрий Александрович (RU),
 Калинин Михаил Владимирович (RU)

(54) СТАБИЛИЗАТОР ФЕРМЕНТНЫХ БЕЛКОВ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биохимии. Предложены пять вариантов стабилизаторов ферментов на основе алкилфенолов. Стабилизаторы представляют собой смесь алкилфенолов, взятых в количестве от 1% до 99% от суммарного содержания алкилфенолов при любом их

соотношении. Изобретение позволяет повысить устойчивость ферментов к инактивирующему воздействиям температуры, pH и других неблагоприятных факторов, сохранить высокую активность ферментов при неоптимальных параметрах каталитических реакций и при неоптимальных условиях их хранения. 5 н.п. ф-лы, 3 ил., 7 табл.

R U 2 4 4 1 0 6 9 C 2

R U 2 4 4 1 0 6 9 C 2

R U 2 4 4 1 0 6 9 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU⁽¹¹⁾ 2 441 069⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
C12N 9/00 (2006.01)
C07C 39/00 (2006.01)
C07C 403/08 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2010108916/10, 11.03.2010

(24) Effective date for property rights:
11.03.2010

Priority:

(22) Date of filing: 11.03.2010

(43) Application published: 20.09.2011 Bull. 26

(45) Date of publication: 27.01.2012 Bull. 3

Mail address:

117418, Moskva, ul. Garibal'di, 31, korp.2,
kv.31, Ju.A. Nikolaevu

(72) Inventor(s):

Ehl'-Registan Galina Ivanovna (RU),
Nikolaev Jurij Aleksandrovich (RU),
Kalinin Mikhail Vladimirovich (RU),
Gernet Marina Vasil'evna (RU),
Shanenko Elena Feliksovna (RU),
Lojko Natal'ja Gennad'evna (RU)

(73) Proprietor(s):

Ehl'-Registan Galina Ivanovna (RU),
Nikolaev Jurij Aleksandrovich (RU),
Kalinin Mikhail Vladimirovich (RU)

(54) ENZYMATIC PROTEIN STABILISER

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: there are offered five versions of enzyme stabilisers in the form of alkylphenols. The stabilisers represent mixed alkylphenols taken in the amount of 1% to 99% of total alkylphenols in any proportions.

EFFECT: invention provides higher enzyme resistance to an inactivated effect of heat, pH and other adverse factors, maintained high enzyme activity in the non-optimal parameters of catalytic reactions and in the non-optimal storage environment.

5 cl, 3 dwg, 7 tbl, 7 ex

R U 2 4 4 1 0 6 9 C 2

Изобретение относится к биотехнологической, медицинской, пищевой, комбикормовой и легкой промышленности.

Ферменты - биологические катализаторы, широко используются в различных областях хозяйственной деятельности человека. Одной из отрицательных сторон использования ферментов является свойственная им нестабильность в денатурирующих условиях. Активность ферментных белков зависит от сохранения нативной структуры, которая может быть нарушена физическими, химическими и биологическими воздействиями, такими как нагревание, замораживание, окисление, восстановление, действием растворителей, ионов металлов, ионной силой растворов, ферментативной модификацией и деградацией. Применение ферментов в различных областях человеческой практики предполагает сохранение ими активности в широком диапазоне температур, pH, высоких концентраций солей и других параметров среды, выходящих за пределы оптимальных для катализа.

Обеспечить стабилизацию белковой молекулы можно следующими способами:

1. иммобилизацией ферментов на твердых носителях;
2. использованием добавок, стабилизирующих конформацию белка;
3. химической модификацией молекулы;
4. приемами белковой инженерии через сайт - направленный мутагенез.

Добавление стабилизирующих веществ в растворы белков является наиболее простым способом сохранения активности ферментов в денатурирующих или неоптимальных для катализа условиях.

Известно использование для стабилизации аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы водных растворов аминокислот - валина или пролина или их комбинации (EP 1136550, 2001).

Эффект стабилизации выражается в сохранении достаточно высокой остаточной активности после хранения ферментных растворов при 45°C в течение 4 дней.

В патенте RU 2008354, 1994 для сохранения водных растворов протеиназ используют диметилсульфоксид (20-30% об.). В патенте RU 2020154, 1991 при хранении дезоксирибонуклеазы в ее растворе в качестве стабилизатора вносят смесь гидрохлорида пиридоксина (5-10% вес.) и борной кислоты (1-2% вес.). Недостатком этих известных стабилизирующих веществ является необходимость их использования в высокой концентрации.

Известно использование для стабилизации протеолитических ферментов водорастворимых полиолов (US 4169817, 1979). Эффективность применения полиолов выражается в увеличении остаточной активности при хранении ферментов в течение года, а также в повышении совместимости протеаз с различными детергентами.

В патенте EP 0821058, 2002 для сохранения высокой ферментативной активности деполимераз и рестриктаз при высоких значениях температуры используют стабилизирующие вещества, обладающие функциями химических шаперонов, к которым относят сахара, полиольные спирты, аминокислоты и их производные, а также используют белки-шапероны. Недостатком известных веществ является то, что стабильность ферментативной активности проявляется лишь при супраоптимальных температурах.

Известно применение C₇-алкилоксибензола в виде его раствора в этаноле в качестве стабилизатора ферментов, в частности, его использование для стабилизации и активации РНКазы и химотрипсина ("Микробиология", 2000, том 69, №2, 224-230).

Ближайшим аналогом настоящего изобретения является патент EP 0189838 1996, в котором для термостабилизации водного раствора α-амилазы применяют некоторые

амифильные соединения.

Действие описанных в патенте стабилизаторов позволяет сохранять высокую ферментативную активность при воздействии высоких, в том числе денатурирующих, значений температуры. Однако действие этих стабилизаторов сопровождается снижением каталитической активности.

Недостатками известных технических решений является то, что стабилизация ферментов ориентирована в основном на их хранение, т.е. обеспечивается функциональная стабильность, но эффекты стабилизации, как правило, сопровождаются снижением каталитической активности. Кроме того, известные стабилизаторы не обеспечивают расширения рабочего диапазона катализа с сохранением высокой активности в области неоптимальных (высоких или низких) значений температуры и pH.

Задачей настоящего изобретения является разработка стабилизаторов ферментов, которые способны повысить устойчивость ферментов к инактивирующему воздействиям температуры, pH и других неблагоприятных факторов и сохранить высокую активность ферментов при неоптимальных для катализа параметрах реакции.

Поставленная задача решается применением описываемых пяти вариантов стабилизаторов ферментных белков на основе алкилфенолов, которые содержат смесь следующих соединений в количестве от 1% до 99%:

1. смесь 3-гидрокси-4-гексилфенола и 2,2'-дигидрокси-5,5'-дигексил-4,4'-бифенола.
2. смесь 2,2'-дигидрокси-5,5'-дигексил-4,4'-бифенола и бициклогексадиена-3,5.
3. смесь 3-гидрокси-5-метилфенола и 2,2'-дигидрокси-6,6'-диметил-4,4'-бифенола.
4. смесь 2,2'-дигидрокси-6,6'-диметил-4,4'-бифенола и бициклогексадиена-3,5.
5. смесь гидроксиэтилфенола и 5,5'-дигидроксиэтил-2,2'-бифенола.

Все пять заявленных вариантов стабилизаторов ферментных белков позволяют обеспечить достижение технического результата, заключающегося в том, что за счет модификации пространственной структуры ферментных белков (как моно-, так и полисубъединичных) обеспечивается их устойчивость к инактивирующему воздействиям химической, физической и биологической природы и сохранение высокой активности при неоптимальных для катализа значениях температуры и pH.

По химической природе все химические соединения, входящие в состав заявленных стабилизаторов, являются соединениями с одним или несколькими шестиатомными углеродными циклами с различными заместителями, не менее чем один из которых является гидроксилом или оксигруппой.

Заявленные варианты композиций АФ1-АФ5 могут быть получены например, путем смешения компонентов I-VIII, входящих в их состав приобретенных коммерчески (например: <http://www.reaxys.com>; <http://mntc.ru/synthesis.html> и <http://chemexpress.fatal.ru/Navigator/Deliver.html>). Активность модифицирующих композиций проявляется при наличии указанных выше АФ I-VIII в количествах от 1% до 99% от суммарного содержания АФ при любом их соотношении.

В таблице 1 представлены заявленные варианты стабилизаторов (далее используется условное обозначение АФ) и входящие в их состав химические соединения, при этом радикалы R1-R5 относятся к первому кольцу, радикалы R'1-R'5 - ко второму, R"1-R"5 - к третьему.

Таблица 1

Стабилизаторы, использованные в настоящем патенте				
№ варианта стабилизатора	Состав стабилизатора	№	Название соединений, входящих в состав стабилизатора	Природа заместителей ядра
АФ-1	Смесь веществ I, II	I	3-гидрокси-4-гексилфенол	R3 - гидроксил; R4 - гексил, остальные R - водород
		II	2,2'-дигидрокси-5,5'-дигексил-4,4'-бифенол	R2,R2',R4,R4' - гидроксил, R5,R5' - гексил, остальные R - водород
АФ-2	Смесь веществ II, III,	III	Бициклогексадиен-3,5	R2,R2' - оксигруппа, R4,R4' - гидроксил, R5,R5' - гексил, остальные R - водород
		IV	3-гидрокси-5-метилфенол	R3 - гидроксил, R5 - метил, остальные R - водород
АФ-3	Смесь веществ IV, V	V	2,2'-дигидрокси-6,6'-диметил-4,4'-бифенол	R2,R2',R4,R4' - гидроксил, R6,R6' - метил, остальные R - водород
		VI	Бициклогексадиен-3,5	R2,R2' - оксигруппа, R4,R4' - гидроксил, R6,R6' - этил, остальные R - водород
АФ-4	Смесь веществ V, VI,	VII	Гидроксиэтилфенол	R2,R3,R4 - H или 2-гидроксиэтил; R5,R6 - H
		VIII	5,5'-дигидроксиэтил-2,2'-бифенол	R2,R2' - гидроксил, R5,R5' - 2-гидроксиэтил, остальные R - H

Применение предлагаемых стабилизаторов можно осуществить двумя способами:

- 1) смешивая растворы ферментов и стабилизаторов; 2) путем введения растворов стабилизаторов в реакционную смесь одновременно с растворами фермента и субстрата.

Заявленные стабилизаторы не обладают токсическим действием и могут

- 15) действовать на ферменты даже в составе живых организмов.

Достижение технического результата продемонстрировано с помощью конкретных примеров и проиллюстрировано на представленных фиг.1-3.

Примеры использования заявленных стабилизаторов

Пример 1. Влияние АФ-5 и АФ-1 на активность жидкого ФП α -амилазы (α -malt-LKu5038, Германия) при различных значениях температуры (операционная стабильность)

Ферментативную активность α -амилазы определяют по количеству редуцирующих веществ (метод с 3,5-динитросалициловой кислотой), образующихся при гидролизе крахмала. Реакционная смесь включает 2.5 мл раствора фермента (5 ед./мл), 1.5 мл раствора АФ №5 или АФ №1 с концентрацией 0.04 г/л и с концентрацией 0.3 г/л, соответственно, 5 мл 1% раствора крахмала. Гидролиз проводят в течение 10 мин при pH 6.0. Реакцию останавливают добавлением равного объема 0.2 н. HCl.

Гидролиз ведут при различных температурах в интервале 20-80°C. Результаты представлены в табл.2. Активность стабилизированного АФ №5 (0.3 г/л) фермента больше чем в 2 раза при всех температурах реакции, стабилизированного АФ №1 (0.04 г/л) - в 1,5 раза. Температурный оптимум гидролиза не изменяется, но существенно расширяется рабочий Т-диапазон катализа. Активность стабилизированного фермента в интервале температур 35-75°C равна или больше, чем максимальная активность нестабилизированной амилазы при $T_{опт}=60^\circ\text{C}$.

Таблица 2

Активность стабилизированного АФ-5 и АФ-1 жидкого ФП α -амилазы α -malt-LKu5038 при различных температурах (операционная стабильность)

Temperatura гидролиза, °C	Концентрация глюкозы в гидролизате, г/л				
	без АФ	с АФ-5, 0,3 г/л	с АФ-5, 1,5 г/л	с АФ-1, 0,04 г/л	с АФ-1, 0,15 г/л
20	0.20	0.66	0.47	0.32	0.25
30	0.27	0.71	0.64	0.46	0.35
40	0.34	0.87	0.82	0.82	0.63
50	0.62	1.25	1.17	0.93	0.81
60	0.77	1.38	1.27	1.05	0.90
70	0.56	1.15	1.03	1.0	0.91
80	0.23	0.60	0.40	0.51	0.38

Пример 2. Влияние АФ-4 на активность жидкого ФП α -амилазы (α -malt-LKu5038, Германия) при различных значениях pH (операционная стабильность)

Опыты проводят, как описано в примере 1, за исключением того, что гидролиз ведут в интервале pH 2.5-7.5. Результаты представлены в табл.3. Активность

стабилизированного АФ-4 (0.2 и 1.5 г/л) фермента при различных значениях рН реакционной смеси существенно выше по сравнению с контролем при рН_{опт} 3.5-4.0 (более чем в 2 раза). Это указывает на повышение стабильности модифицированного фермента в широком диапазоне неоптимальных значений рН.

5

Таблица 3 Активность стабилизированного АФ-4 жидкого ФП α -амилазы при различных значениях рН (операционная стабильность)		
рН гидролиза	Концентрация глюкозы в гидролизате, г/л	
	без АФ	с АФ-4, 0,2 (1,5)г/л
2.5	0.30	0.73 (0.77)
3.5	0.37	0.81 (0.85)
4.7	0.33	0.76 (0.81)
5.5	0.27	0.70 (0.75)
6.5	0.14	0.61 (0.70)
7.5	0	0.47 (0.50)

15

Пример 3. Влияние АФ-2, 3, 5 на термостабильность диоксигеназ (функциональная стабильность)

Активность метилпирокатехин - 1,2-диоксигеназы (МПК - 1,2-ДО) определяют

20

модифицированным методом Хаяси. Реакционная смесь содержит в 50 мМ буфере Tris-HCl (рН 7.2) 0.25 мМ пирокатехин или замещенный пирокатехин, 1.3 мМ ЭДТА и фермент. Реакцию начинают добавлением фермента. Активность фермента рассчитывают по скорости образования продукта (цис, цис-муконовой кислоты или замещенных муконатов) спектрофотометрически при длине волны 260 нм. При расчете активностей используют коэффициенты молярной экстинкции, определенные Дорном и Кнакмуссом: 16800 М⁻¹ · см⁻¹ для пирокатехина; 17100 М⁻¹ · см⁻¹ для 3-хлорпирокатехина; 12400 М⁻¹ · см⁻¹ для 4-хлорпирокатехина; 12000 М⁻¹ · см⁻¹ для 3,5-хлорпирокатехина; 18000 М⁻¹ · см⁻¹ для 3-метилпирокатехина; 13900 М⁻¹ · см⁻¹ для 4-метилпирокатехина. Единицу активности определяют как количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоля субстрата или образование 1 мкмоля продукта в минуту. Термостабильность ферментов определяют при использовании АФ в концентрациях, которые максимально увеличивают скорость протекания реакции ферментов с пирокатехином: АФ-2 - 0.36 г/л; АФ-3 - 0.42 г/л; АФ-5 - 0.8 г/л.

25

Влияние АФ на термостабильность ферментов изучена после их прогревания при 50°C. Остаточную активность определяют в районе значений температурного максимума. Ферменты инкубируют с АФ при 50°C в течение 9 час, пробы отбирают каждые 10-30 мин, реакцию начинают добавлением пирокатехина. В контрольном варианте фермент инкубируют без добавления АФ в тех же условиях.

30

Метилпирокатехин - 1,2-диоксигеназа (МПК1,2-ДО), инкубируемая при 50°C в отсутствие АФ (контрольный вариант), практически инактивируется через 1.5 ч (фиг.1). АФ-2, 3, 5 повышают термостабильность МПК 1,2-ДО при 50°C: в присутствии АФ-2 фермент инактивируется через 2 ч; в присутствии АФ-3 - через 2.5 ч, а в присутствии АФ-5 - только через 3 ч.

35

Данный пример показывает, что использование заявленных вариантов АФ значительно удлиняет время активности ферментов за счет увеличения их функциональной стабильности (сохранения функции после денатурирующих воздействий).

40

Пример 4. Влияние АФ-4 на термостабильность пероксидазы (функциональная стабильность).

Термостабильность пероксидазы определяют при ее модификации АФ №4 в

концентрациях 0.05-2.0 г/л. Фермент, модифицированный и контрольный (без АФ), подвергают прогреванию при температурах 60°C, 20 минут и 70°C, 10 минут, охлаждают до комнатной температуры и проводят ферментативную реакцию. Для окисления субстрата, о-дианизидингидрохlorida, готовят на фосфатном буфере 0.05 М (рН 7.0) растворы: субстрата - о-дианизидингидрохlorida - 5 мг/мл; АФ - с диапазоном концентраций от 0.018 до 0.36 мг/л, ферментного препарата - 0.002 мг/мл. Реакционная смесь включает 840 мкл 0.05 М К-фосфатного буфера (рН 7.0); 10 мкл 3% H₂O₂; 100 мкл субстрата, по 25 мкл ферментного препарата и раствора определенных концентраций АФ. В течение 5 мин измеряют изменение поглощения при 436 нм. В контрольных вариантах вместо раствора АФ вносят 25 мкл 0.05 М К-фосфатного буфера. Активность в контроле принимают за 100%. Результаты представлены в таблице 4.

Модифицированный фермент (0.05 г/л) сохраняет функциональную активность после термообработки 60°C 20 минут практически полностью (98%), тогда как у контрольного фермента она снижается на 27%. Термообработка при 70°C в течение 10 минут модифицированного фермента при всех концентрациях АФ-4 показала сохранение активности на 13-19% выше контрольного.

Таблица 4

Термостабильность пероксидазы, модифицированной АФ-4			
Концентрация АФ, г/л	Активность пероксидазы, % от активности до термообработки		
	До термообработки	60° 20 мин	70° 10 мин
0	100	73	32
0.05	100	98	45
0.12	100	77	40
2.0	100	76	41

Пример 5. Влияние АФ-3 на стабильность дезоксирибонуклеазы при хранении
Одной из проблем в практике применения фермента ДНКазы является быстрая потеря ее активности в растворах. Исследовали сохранение активности ДНКазы, модифицированной АФ-3, в растворах, хранившихся в течение 24, 48 и 144 часов в стеклянной или пластмассовой посуде при температурах 25°C и 4°C. Фермент стабилизируют АФ-3 в концентрациях 0.05-0.5 г/л.

Ферментативную активность ДНКазы определяют по количеству кислоторастворимых веществ, освобождаемых ферментом при гидролизе ДНК в стандартных условиях (37°C, 30 мин). В реакционную смесь вносят по 0.25 мл субстрата (ДНК, 2 мг/мл воды) и 0.15 мл 0.2 М три-буфера рН 7.0, 0.1 мл раствора стабилизированного АФ фермента. Реакцию останавливают внесением 0.5 мл 1 М раствора хлорной кислоты. В контрольном варианте фермент не стабилизируют. После охлаждения и центрифугирования из надосадочного слоя отбирают 0.5 мл раствора, прибавляют 2.5 мл воды и измеряют поглощение при 260 нм. За единицу активности фермента принимают такое его количество, которое вызывает увеличение оптической плотности на 1 ед. при 260 нм за 1 час инкубации.

На фиг.2 представлены результаты зависимости стабильности ДНКазы от концентрации АФ при хранении растворов при комнатной температуре.

Активность фермента при хранении в стеклянной посуде через 24 часа составляла до 25% от исходной и была на 21% выше, чем в контроле, а через 48 часов составляла 14% и была на 11% выше контрольной. При хранении раствора фермента в пластмассовой посуде активность фермента сохранялась на уровне 11%, тогда как в контрольном варианте была нулевой.

При хранении тех же образцов при температуре 4°C активность модифицированной ДНКазы сохранялась на более высоком уровне: при концентрации АФ 0.1 г/л через 48 ч сохранялась до 25% от исходной активности, что на 22% больше, чем в контроле. Соответствующие данные проиллюстрированы на фиг.3.

⁵ Пример 6. Влияние стабилизатора АФ-3 на стабильность амилаз зерна при осахаривании солода

Затирание готовят, смешивая 40 г дробленного солода с 450 мл воды, проводят температурную паузу при 45°C в течение 30 минут, затем поднимают температуру ¹⁰ до 55°C и выдерживают 20 минут, затем поднимают температуру до 65°C и выдерживают 20 минут. После этого затор разделяют фильтрованием на жидкую и густую часть. Жидкую часть инкубируют с препаратом АФ-3 (0.1, 0.3, 0.6, 1.2 г/л) в течение 20 минут. В это время постепенно поднимают температуру густой отварочной части до 70°C, затем охлаждают до 65°C и объединяют с жидкой частью. Поднимают ¹⁵ температуру общего затора до 70°C, доливают 20 мл воды (70°C) и проводят осахаривание затора.

В полученном заторе определяют продолжительность осахаривания по капельной ²⁰ йодной пробе. После того как йод перестает изменять цвет, затор фильтруют до появления трещин. В полученном жидким сусле определяют содержание сухих веществ (СВ) весовым методом, титруемую кислотность, pH, цветность, а также скорость фильтрования сусла.

Как видно из таблицы 5, происходит значительное снижение (на 32.0%) ²⁵ продолжительности осахаривания в варианте внесения АФ-3 в количестве 0.5% от массы зернопродуктов, скорость фильтрования при этом остается почти неизменной. Выход экстракта у всех опытных образцов лучше, чем у контрольного образца. Пример доказывает стабилизацию комплекса амилолитических ферментов, ³⁰ участвующих в процессе осахаривания солодового затора при высоких температурах (65-70°C).

Таблица 5

Влияние стабилизатора АФ-3 на активность амилаз зерна (осахаривание солода)

Концентрация АФ, г/л в/в	Технологические показатели					
	Продолжительность осахаривания, мин	Скорость фильтрования, см ³ /с	Кислотность	pH	Цветность	Выход экстракта, %
0	25	0.19	0.70	5.7	0.78	79.1
0.1	19	0.26	0.80	5.6	0.97	80.0
0.3	17	0.20	0.80	5.7	0.92	81.7
0.6	28	0.21	0.90	5.6	0.97	87.8
1.2	30	0.26	0.90	5.8	1.19	88.8

⁴⁰ Пример 7. Влияние стабилизатора АФ-3 на сохранение активности глюкоамилазы (Сан-Ультра Л, Novozyme, Дания) в денатурирующих условиях температуры и pH (функциональная стабильность).

Ферментативную активность определяют по количеству редуцирующих веществ (⁴⁵ с 3,5-динитросалициловой кислотой), образующихся при гидролизе крахмала, как в примере 1. Для определения термостабильности и pH-стабильности глюкоамилазы - жидкий концентрированный препарат с активностью 2.5 ед./мл, модифицируют добавлением раствора АФ-3 (1 и 20 г/л). Полученный раствор экспонируют (0-60 мин) ⁵⁰ при температуре 70°, затем охлаждают и определяют активность при стандартной температуре (30°C). В варианте определения pH-стабильности ферментный раствор экспонируют (0-60 мин) при pH 2 или 9.5, затем нейтрализуют и определяют активность при pH 6.0 (оптимуме). Из таблиц 6 и 7 видно, что активность модифицированного фермента в условиях термо- или pH-денатурации была выше, чем

немодифицированного (контроль) на протяжении всего времени экспонирования. Эффективность дозы 20 г/л была существенно выше чем 1 г/л.

Таблица 6

Влияние АФ-3 на термостабильность жидкого ФП глюкоамилазы (Сан-Ультра Л, Novozyme, Дания) (функциональная стабильность)			
Время прогревания (70°C), мин	Концентрация глюкозы в гидролизате, г/л		
	без АФ	с АФ, 20 г/л (1 г/л)	
0 (контроль)	0.3	0.38 (0.33)	
20	0.22	0.28 (0.24)	
40	0.20	0.29 (0.22)	
60	0.18	0.28 (0.20)	

Таблица 7

Влияние стабилизатора АФ - 3 на рН стабильность жидкого ФП глюкоамилазы (Сан-Ультра Л, Novozyme, Дания) (функциональная стабильность)			
Время рН-денатурации (рН 9.5)	Концентрация глюкозы в гидролизате, г/л		
	Без АФ	С АФ, 20 г/л (1 г/л)	
0	0.3	0.38 (0.32)	
30	0.25	0.38 (0.28)	
60	0.20	0.30 (0.22)	

Таким образом, заявленные варианты стабилизаторов позволяют не только повысить устойчивость макромолекул к инактивирующим воздействиям, но и обеспечивает сохранение высокой каталитической активности ферментов при неоптимальных условиях (Т°С и рН) катализа, что в свою очередь позволяет расширить рабочий температурный и рН диапазоны ферментативных реакций, включая область низких температур.

Краткое описание чертежей:

Фиг.1. Влияние АФ на термостабильность фермента МПК1,2-ДО при 50°C: 1 - контроль; 2 - АФ-3 (0.42 г/л); 3 - АФ-5 (0.8 г/л); 4 - №2 (0.36 г/л).

По оси ординат отложена остаточная активность фермента, в % от исходной, до прогрева при 50°C.

Фиг.2. Активность модифицированных АФ-3 препаратов ДНКазы после хранения в течение 24 и 48 часов при температуре 25°C.

Фиг.3. Активность модифицированных АФ-3 препаратов ДНКазы после хранения в течение 24, 48 и 144 часов при температуре 4°C.

Формула изобретения

- Стабилизатор ферментных белков на основе алкилфенолов, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой смесь 3-гидрокси-4-гексилфенола и 2,2'-дигидрокси-5,5'-дигексил-4,4'-биленола, взятых в количестве от 1% до 99% от суммарного содержания алкилфенолов при любом их соотношении.
- Стабилизатор ферментных белков на основе алкилфенолов, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой смесь 2,2'-дигидрокси-5,5'-дигексил-4,4'-биленола и бициклогексадиена-3,5, взятых в количестве от 1% до 99% от суммарного содержания алкилфенолов при любом их соотношении.
- Стабилизатор ферментных белков на основе алкилфенолов, отличающейся тем, что стабилизатор представляет собой смесь 3-гидрокси-5-метилфенола и 2,2'-дигидрокси-6,6'-диметил-4,4'-биленола, взятых в количестве от 1% до 99% от суммарного содержания алкилфенолов при любом их соотношении.
- Стабилизатор ферментных белков на основе алкилфенолов, отличающейся тем,

что стабилизатор представляет собой смесь 2,2'-дигидрокси-6,6'-диметил-4,4'-бифенола и бициклогексадиена-3,5, взятых в количестве от 1% до 99% от суммарного содержания алкилфенолов при любом их соотношении.

5. Стабилизатор ферментных белков на основе алкилфенолов, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой смесь гидроксиэтилфенола и 5,5'-дигидроксиэтил-2,2'-бифенола, взятых в количестве от 1% до 99% от суммарного содержания алкилфенолов при любом их соотношении.

10

15

20

25

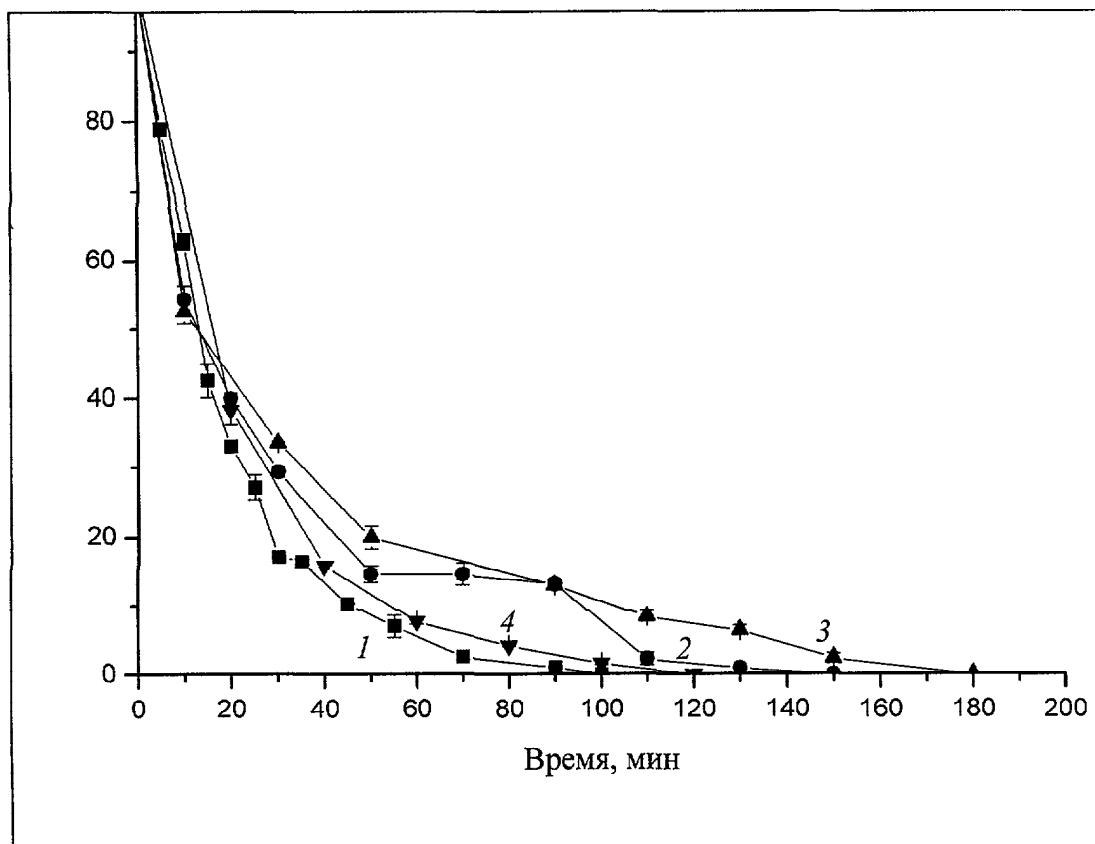
30

35

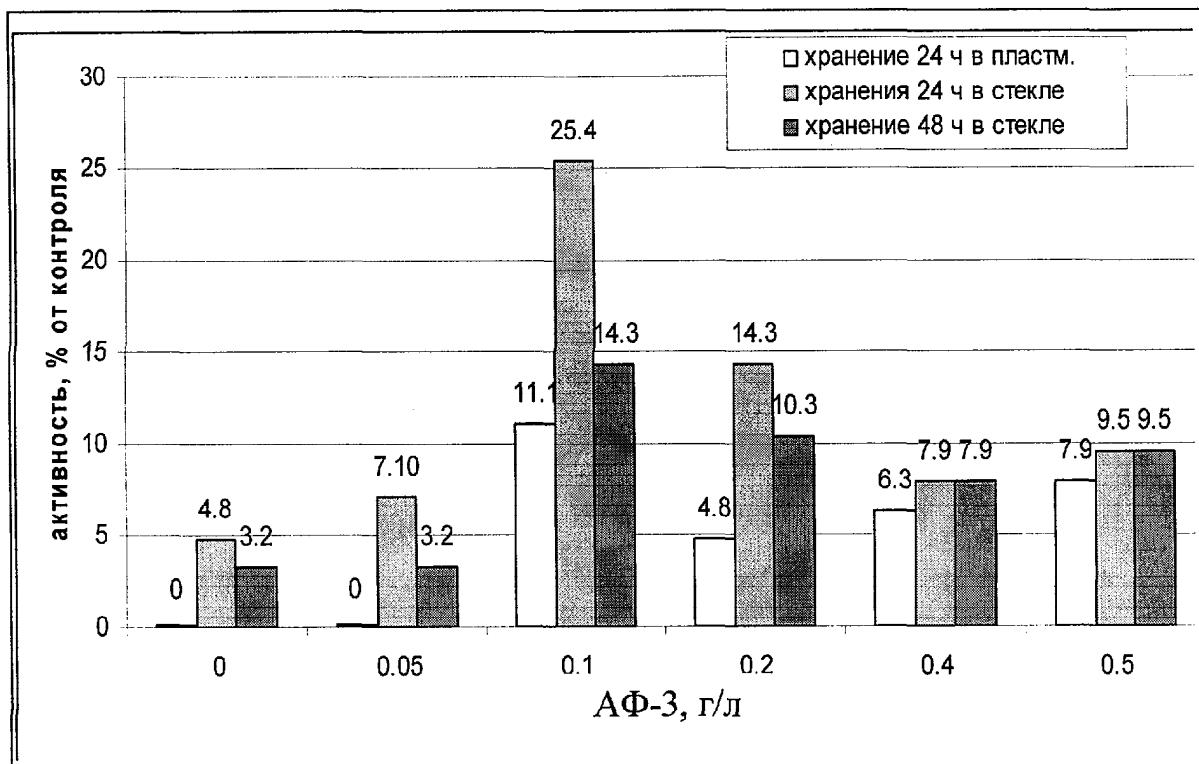
40

45

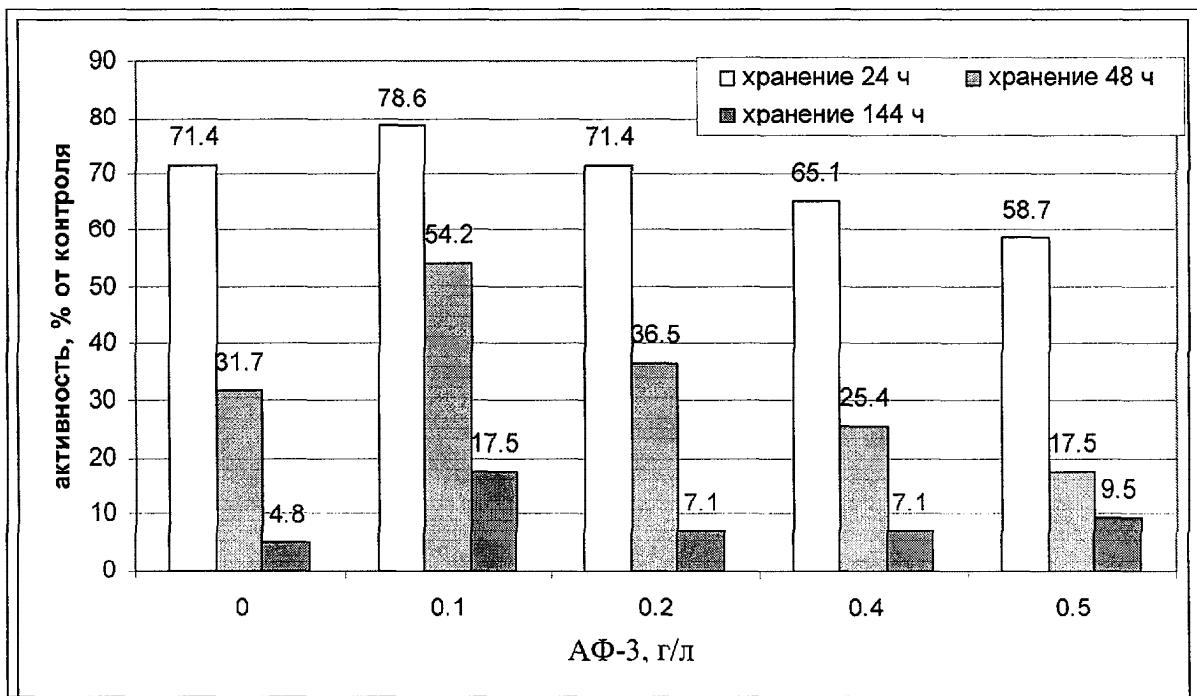
50



Фиг.1



Фиг.2



Фиг.3