



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

264 992

(11) (B1)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

C 08 H 1/00

(22) Prihlášené 19 02 88

(21) PV 1072-88.U

(40) Zverejnené 17 10 88

(45) Vydané 15 12 89

(75)

Autor vynálezu

ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE, FLOCH LUBOMÍR ing. CSc.,
BEJDOVÁ MÁRIA ing., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy sieťovaného proteínu

(57) Riešenie sa týka prípravy sieťovaného proteínu pre účely prípravy štandardných chromolytických substrátov. Podstata riešenia spočíva v tom, že proteín sa sieťuje za použitia homobifunkčného činidla odvodeného od L-aminokyselinových zložiek primárnej štruktúry proteínu, akým je L-etyl-ester kyseliny 2,6-diizotiokyanátohexánovej v množstve 0,5 až 10 % hmot. vztiahnuté na hmotnosť suchého proteínu, pri pH 7 až 12 upraveném pomocou roztokov zriedených lúhov alebo kyselín alebo tlmivých roztokov 1 až 50 mmol.l⁻¹, s výhodou fosfátových alebo borátových, pri teplote 10 až 50 °C po dobu 10 až 120 min.

Vynález sa týka spôsobu prípravy sieťovaných proteínov a to tak pre účely prípravy štandardných chromolytických substrátov, afinantov proteolytických enzýmov obecného typu, hydrogélů proteínového typu, alebo nosičů k imobilizácii enzýmov a buniek.

Doteraz známe spôsoby sieťovania proteínov využívajú prevažne homobifunkčné látky typu glutaraldehydu (S. Avrameas, *Immunochimistry*, 6/1969/43), alebo heterobifunkčné látky typu 2-chlormetyloxiránu (AO 194 592; AO 218 709). Zatiaľ čo v príprave sieťovania glutaraldehydom vznikajú nedefinované oligomérne a polymérne štruktúry, obsahujúce alfa-nenasýtené aldehydy, ktoré taktiež sa zúčastňujú reakcie sieťovania (F. M. Richards, J. R. Knowles, *J. Mol. Biol.* 37/1968) (231) Schiffove bázy, ktoré v priebehu sieťovania vznikajú, nezaručujú stabilitu výsledného produktu. V prípade sieťovania 2-chlorometyl-oxiránom je potrebná pomerne vysoká alkalita (pH 14) na premenu intermediárneho chlorohydrínu na oxiránovú skupinu, čo je sprevádzané degradačnými reakciami v primárnej štruktúre proteínu. Navyše uvedená reakcia sieťovania je sprevádzaná vysokou tvorbou solí, čo negatívne ovplyvňuje hydrodynamické vlastnosti pripravovaného proteínového gélu. Pri príprave väčších množstiev sieťovaného proteínu za použitia 2-chlorometyloxiránu vznikajú technologické problémy s homogénnou distribúciou láhu v priereze reakčnej zmesi, čo má za následok nerovnomernosť zosieťovania gélu na jednej strane a lokálnu degradáciu proteínu na vodorozpustné fragmenty v dôsledku vysokej alkality na strane druhej.

Uvedené nedostatky odstraňuje postup podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že v prvom stupni sa proteín sieťuje za použitia homobifunkčného činidla odvodeného od L-aminokyselinových zložiek primárnej štruktúry proteínu akým je L-etyléster kyseliny 2,6-diizotiokyanátovýchexánovej, v množstve 0,5 až 10 % hmot. vztiahnuté na hmotnosť suchého proteínu, v prostredí roztoku o pH 7 až 12, s výhodou borátového alebo fosfátového pufru, pri teplote 10 až 50 °C po dobu 10 až 120 minút. V druhom stupni sa sieťovaný proteín vyperie od zložiek tlmivého roztoku a adjustuje pre ďalšie použitie. Hydrogél sieťovaného proteínu možno použiť ako selekčnú pôdu k sledovaniu mikrobiálnych producentov enzýmov proteolytického typu alebo v suchom stave po defibrácii v rýchlootáčkovom mixéri a následnom vysušení a vysítovaní ako afinant k izolácii proteolytických enzýmov zo zmesi enzýmov, alebo ako nerozpustný proteín k príprave štandardných chromolytických substrátov k stanoveniu aktivít proteolytických enzýmov v chemickej úprave so zlúčeninami obsahujúcimi chromofórové skupiny.

Výhodou uvedeného postupu je skutočnosť, že v priebehu reakcie nedochádza k tvorbe vedľajších produktov, reakcia sieťovania prebieha kontrolovane v jednom smere bez tvorby sprievodných solí, umožňuje prípravu nových proteínových gélov v širokom rozsahu fyzikálnych a chemických vlastností pre špecifické potreby ich využívania. Vysušený sieťovaný proteín sa dobre skladuje. Podľa reakčných podmienok možno reakciu sieťovania viesť tak, aby prednostne reagovali len tiolové skupiny proteínu, alebo tak tiolové, ako aj primárne amino-skupiny proteínu.

P r í k l a d 1

Lyofilizovaný albumín hoväzieho séra (5 g) sa rozpúšťa za miešania na elektromagnetickej miešačke v 100 ml borátového pufru (10 mmol.l^{-1} ; pH 12) za prídavku 0,01 ml n-oktanolu. K rozpustnému proteínu sa pridá 0,5 g etylesteru 2,6-diizokyanátu lyzínu za rýchleho premiešania a reakčná zmes sa vyleje do formy (40x40 cm) o výške 0,5 cm. Reakcia sieťovania sa ukončí po 10 minútach pri 50 °C. Vzniknutý hydrogél sieťovaného proteínu sa vyperie v destilovanej vode od zvyškov borátového pufru. Získaný produkt po vymytí a ďalšom napučaní vo vode má suchú hmotnosť 1,1 % a modul elasticity penetrometricky 26 mm.

P r í k l a d 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako proteín sa použije ovalbumín. Získaný produkt má suchú hmotnosť 1,8 % a modul elasticity penetrometricky 24 mm.

P r í k l a d 3

Postup podľa príkladu 1, s tým rozdielom, že ako protein sa použije kazeín. Reakcia sieťovania sa uskotoční v prostredí fosfátového pufru (40 mmol.l^{-1} ; pH 7) a za prídavku 25 mg etylesteru 2,6-diizotiokyanátu L-lyzínu. Reakcia sieťovania sa ukončí po 10 minútach pri 10°C . Získaný produkt sa za mokra defibruje vo vysokootáčkovom mixéri, premýva destilovanou vodou a etanolom a suší za izbovej teploty (20°C). Získaný suchý gél sa sítuje na veľkosť častíc 0,06 až 0,3 mm napučací objem 33 ml.g^{-1} a použije ako afinant proteolytických enzýmov (pepsín, trypsín, chymotrypsín) obecného typu.

Vynález má široké uplatnenie predovšetkým v enzýmovom inžinierstve, potravinárstve a v obecnej aplikovanej mikrobiológii.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy sieťovaného proteínu vyznačený tým, že protein sa sieťuje za použitia homobifunkčného činidla odvodeného od L-aminokyselinových zložiek primárnej štruktúry proteínu akým je L-etylester kyseliny 2,6-diizotiokynátohexánovej v množstve 0,5 až 10 % hmot. vzťahnuté na hmotnosť suchého proteínu, pri pH 7 až 12 upraveném pomocou roztokov zriedených lúhov alebo kyselín, alebo pomocou tlmivých roztokov $1 \text{ až } 50 \text{ mmol.l}^{-1}$, s výhodou fosfátových alebo borátových, pri teplote $10 \text{ až } 50^\circ\text{C}$ po dobu 10 až 120 minút.