



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42847 (13) U  
(51) МПК (2009)  
A61K 38/00  
A61K 36/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІНГІБІТОРА ТРИПСИНУ

1

(21) u200901282

(22) 16.02.2009

(24) 27.07.2009

(46) 27.07.2009, Бюл.№ 14, 2009 р.

(72) ЧЕРНО НАТАЛЯ КИРИЛІВНА, КРУСІР ГАЛИ-  
НА ВСЕВОЛОДІВНА, РУСЄВА ЯНА ПЕТРІВНА

(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-  
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

(57) Спосіб одержання інгібітора трипсину, що пе-  
редбачає обробку насіння зернової культури екст-

2

рагентом, відокремлення осаду, обробку осаду екстрагентом, хроматографічне очищення виділеного білка і сушіння цільового продукту, який **відрізняється** тим, що гомогенізоване насіння люцерни обробляють боратним буферним розчином при pH=6,1-9,2, відокремлюють осад і фракціонують білки подвійною обробкою сульфатом амоніаку, після чого видаляють сульфат амонію і здійснюють очищення білка афінною хроматографією.

Корисна модель відноситься до біотехнології, зокрема до технології одержання інгібітора трипсину з насіння бобових рослин.

Відомо спосіб одержання інгібітора трипсину з насіння гречихи [див. статтю: Цыбина Т.А., Дунаевский Я.Е., Мусолямов А.Х., Егоров Ц.А., Белозерский М.А. Катионные ингибиторы сериновых протеиназ из семян гречихи //Биохимия. 2001. Т. 66. вып. 9. - С.1157-1164].

Виділення проводили за такою схемою.

Насіння гречихи попередньо знежирювали 10-ма об'ємами петролейного ефіру в апараті Сокслета. Екстракцію інгібітора трипсину з насіння гречихи проводили 0,1М К,Na-фосфатним буфером, pH 6,8, при постійному перемішуванні на магнітній мішалці (число обертів 5000об/хв.) при 4°C протягом 18 години. Осад відокремлювали від супернатанту за допомогою центрифугування при швидкості 14000 обертів за хвилину впродовж 40 хвилин при 5°C. Фракціонування супернатанту проводили сульфатом амоніаку з масовою концентрацією солі між 80%. Отриманий осад розчинювали у 0,1М К,Na-фосфатному буфері, pH 6,8. Суспензію білка розміщували в пористу мембрану і діалізували проти 500мл буферу впродовж 24 годин при 4°C. Отриманий зразок центрифугували при 18000об/хв. впродовж 25 хвилин при 5°C.

Супернатант піддавали афінній хроматографії. Супернатант наносили на колонку (1×15см) з сорбентом: трипсин - сефароза 4В зі швидкістю 15мл/год. Після закінчення насичення сорбенту, яке контролювали за появою в фільтраті інгібіторної активності по відношенню до трипсину, гель промивають 0,1М К,Na-фосфатним буфером, pH 6,8, з 0,5М NaCl при 4°C протягом 4 годин. Інгібітор елюювали 10<sup>-3</sup>М розчином HCl, pH 2,7, з 0,5М NaCl. Активну фракцію концентрували та діалізували проти 10<sup>-3</sup>М К,Na-фосфатного буфера, pH 6,8, й ліофільно висушували. Активність інгібітора складала 24,6%.

Даний спосіб обрано прототипом.

Прототип і корисна модель, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

- обробка насіння зернової культури екстрагентом;

- відокремлення осаду;

- обробка осаду екстрагентом;

- хроматографічне очищення виділеного білку;

- сушіння цільового продукту.

Але, спосіб за прототипом має такі недоліки:

В прототипі в якості джерела інгібітора трипсину використовували насіння гречихи, яке містить незначну його кількість з низькими значеннями антипротеолітичної активності.

(13) U

(11) 42847

(19) UA

Активність інгібітора трипсину, який вилучено за прототипом, складала 24,6%.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити ефективний спосіб одержання інгібітора трипсину, в якому шляхом розробити оптимальних умов екстрагування та очищення білку забезпечити вилучення інгібітора трипсину з максимальною антипротеолітичною активністю.

Поставлена задача вирішена в способі одержання інгібітора трипсину, що передбачає обробку насіння зернової культури екстрагентом, відокремлення осаду, обробку осаду екстрагентом, хроматографічне очищення виділеного білка і сушку цільового продукту тим, що гомогенізоване насіння люцерни обробляють боратним буферним розчином при  $\text{pH}=6,1-9,2$ , відокремлюють осад і фракціонують білки подвійною обробкою сульфатом амоніаку, після чого видаляють сульфат амоніаку і здійснюють очищення білка афінною хроматографією.

Новим у корисній моделі, що заявляється, є наявність таких ознак:

- використання насіння люцерни в якості джерела інгібітора трипсину;
- умови екстрагування.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак і досягнення технологічного результату можна пояснити наступним: в якості джерела інгібітора трипсину використовується насіння люцерни, яке характеризується значним вмістом інгібітора трипсину з високим значенням інгібіторної активності. Активність інгібітора трипсину, який вилучено за прототипом значно менше, ніж активність інгібітора трипсину, виділеного за методом, що заявляється (68,7%). Вилучення інгібітора трипсину з максимально можливою антипротеолітичною активністю базується на досягненні максимального ступеню очищення інгібітора за рахунок використання найбільш ефективного специфічного екстрагенту - боратного буферу, подвійного використання неорганічних (тобто, більш фізіологічних) реактивів та найбільш ефективної афінної хроматографії, в основу якої покладена спорідненість інгібітора до ферменту.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Гомогенізоване насіння люцерни попередньо знежирювали 10-ма об'ємами петролейного ефіру в апараті Сокслета. Екстракцію інгібітора трипсину з насіння люцерни проводять 0,05М боратним буфером,  $\text{pH}=6,1-9,2$ , який містить 0,5М NaCl (гідромодуль 100) при постійному перемішуванні на магнітній мішалці (число обертів 5000об/хв.) при кімнатній температурі протягом 1 години. Осад відокремлювали від супернатанту за допомогою центрифугування при швидкості 8000 обертів за хвилину впродовж 20 хвилин. Фракціонування супернатанту проводили сульфатом амоніаку з масовими концентраціями солі між 75 і 100%. Отриманий осад розчинювали у дистильованій воді.

Суспензію білка розміщували в пористу мембрану і діалізували проти 500мл дистильованої води впродовж 3 днів. Отриманий зразок центрифугували при 5000об/хв. впродовж 30 хвилин.

Супернатант піддавали афінній хроматографії. Супернатант наносили на колонку ( $1 \times 15 \text{ см}$ ) з сорбентом: трипсин - сефароза 4В зі швидкістю 15мл/год. Після закінчення насичення сорбенту, яке контролювали за появою в фільтраті інгібіторної активності по відношенню до трипсину підшлункової залози людини, гель промивали 0,05М трис/HCl буфером,  $\text{pH}=8,0$ . Потім гель в колонці промивали послідовно 1М розчином NaCl та 8М сечовиною в 0,05М трис/HCl буфері,  $\text{pH}=8,0$ . Десорбцію інгібітора проводили  $10^{-3} \text{ М}$  розчином HCl. Активну фракцію нейтралізували до  $\text{pH}=8,0$  1М розчином NaOH й ліофільно висушували. Активність інгібітора складала 68,7%.

Як видно з даних, наведених в таблиці, оптимальне значення  $\text{pH}$  є 7,6, при цьому екстрагується білок з найбільшою інгібіторною активністю по відношенню до трипсину підшлункової залози людини.

Приклад 1. Гомогенізоване насіння люцерни попередньо знежирювали 10-ма об'ємами петролейного ефіру в апараті Сокслета. До 5г насіння додавали 500мл 0,1М боратного буферу,  $\text{pH}=7,6$ , який містить 0,5М NaCl. Екстракцію проводили при постійному перемішуванні на магнітній мішалці (число обертів 5000об/хв.) при кімнатній температурі впродовж 1 години. Осад відокремлювали за допомогою центрифугування при швидкості 8000об/хв. впродовж 20 хвилин. До екстракту додавали 242,63г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Осад відокремлювали центрифугуванням, до супернатанту додавали 88,43г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , осад відокремлювали центрифугуванням. До одержаного осаду додавали 30мл дистильованої води. Суспензію білка розміщували в пористу мембрану і діалізували проти 500мл дистильованої води впродовж 3 днів. Проводили афінну хроматографію на колонку ( $1 \times 15 \text{ см}$ ) з сорбентом: трипсин - сефароза 4В наносять супернатант зі швидкістю 15мл/хв. Після закінчення насичення сорбенту, яке контролювали за появою в фільтраті інгібіторної активності по відношенню до трипсину, гель промивали 0,05М трис/HCl буфером,  $\text{pH}=8,0$  (50мл). Потім гель в колонці промивали послідовно 1М розчином NaCl (20мл) та 8М сечовиною в 0,05М трис/HCl буфері,  $\text{pH}=8,0$  (32мл). Десорбцію інгібітора проводили  $10^{-3} \text{ М}$  розчином HCl (80мл). Активну фракцію нейтралізували до  $\text{pH}=8,0$  1М розчином NaOH й ліофільно висушили.

Приклад 2-5. Здійснювали аналогічно прикладу 1, але екстракцію боратним буфером проводили при різних значеннях  $\text{pH}$  середовища. Отримані дані наведені в таблиці.

Таблиця

Вплив рН боратного буферу на антипротеолітичну активність інгібітора

NN прикладу	рН боратного буферу	Активність інгібітора трипсину, %
1	7,6	68,7
2	6,1	60,4
3	7,0	63,0
4	8,2	59,8
5	9,2	57,4