



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80387** (13) **U**
(51) МПК

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 13982	(72) Винахідник(и): Вовчук Ірина Леонідівна (UA), Оришака Олеся Василівна (UA), Петров Сергій Анатолійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 07.12.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.05.2013	(73) Власник(и): ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.05.2013, Бюл.№ 10	

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ТІАМІНПІРОФОСФОКІНАЗИ

(57) Реферат:

Спосіб отримання тіамінпірофосфокінази, який полягає в тому, що з сировини, яка містить тіамінпірофосфокіназу її екстрагують, і додатково очищують від домішок, причому як сировину використовують тканину тваринного походження - міометрій тварин.

UA 80387 U

Корисна модель належить до галузі отримання ферментів і може бути використана для отримання тіамінпірофосфокінази (КФ 2.7.6.2) з сировини тваринного походження на підприємствах хімічної та хіміко-фармацевтичної промисловості. Отриманий за пропонуванням методом препарат тіамінпірофосфокінази може бути використаний для створення біотехнологічного процесу здобуття тіамінтрифосфата.

Досягнутий рівень в даній галузі ілюструється наступними прикладами.

На даний час використовують коштовний спосіб отримання тіамінпірофосфокінази із насіння сої *Glycine max* [Molin W. T., Fites R. C. Isolation and characterization of Thiamin Pyrophosphotransterase from *Glycine max* Seedlings. - *Plant Physiol.* - 1980. - Vol. 66. - P. 308 - 312]. Боби сої пророщують 48 годин, потім висушують за кімнатних умов, стерилізують з 10 % хлоролом протягом 1 хв., гомогенізують в буфері, який містить 50 мМ Трис-HCL (pH 7,6), 10 мМ β-меркаптоетанолу та 1,0 мМ ЕДТА. Гомогенат тіамінпірофосфокінази центрифугують 20 хв. при 20 000 g, потім отриманий супернатант, що містить тіамінпірофосфокіназу хроматофокусують на колонці на Сефадексе G-25 і колонці на Сефадексе G-150 та елюють буфером, який містить 50 мМ Трис-HCL (pH 7,6) і 10 мМ β-меркаптоетанолу

Недоліками відомого способу є додаткове пророщування бобів сої, використання комерційних Трис-HCL, β-меркаптоетанолу, ЕДТА та Сефадексу G-25 і Сефадексу G-150, що призводить до збільшення трудомісткості процесу та подорожчання тіамінпірофосфокінази (1 г β-меркаптоетанолу коштує понад 450 євро, 1 г Сефадекса G-150 коштує 150 євро).

Відомий спосіб отримання тіамінпірофосфокінази з пивних дріжджів [Воскобоев А. И., Островский Ю. М., Черникович И. П. Очистка и характеристика тиаминпирофосфокиназы из пивных дрожжей. *Биоорганическая химия.* - 1975. - Т. 1., № 10. - С. 1489-1496]. Спосіб полягає в тому, що півні дріжджі автолізують при 37 °С протягом 3 годин, потім центрифугують при 105 000 g протягом 60 хв. Надосадкову рідину прогрівують при 50 °С протягом 10 хв., потім охолоджують та повторно центрифугують при 105 000 g протягом 60 хв. Надосадкову рідину, яка містить тіамінпірофосфокіназу фракціонують охолодженням ацетоном та сульфатом амонію при 50-60 % насиченні. Отриманий осад діалізують проти 0,01 М трис-HCL буфера pH 7,3 при + 4 °С протягом 12 годин, після чого ферментний препарат центрифугують при 20 000 g протягом 20 хв. Отриману надосадкову рідину хроматографують на сефадексі G-25 і DEAE-сефадексі A-50 з елюцією 0,01 М трис-HCL буфером pH 7,3. Вихід ферменту становить 17 %.

Даний спосіб обрано в якості прототипу.

Недоліками відомого способу є невисокий процент виходу ферменту (17 %) та многостадійність способу, що передбачає тривалість процесу (5-6 діб).

В основу корисної моделі поставлена задача: створити спосіб отримання тіамінпірофосфокінази з технічним ефектом, який полягає в спрощенні трудомісткості процесу і збільшенні виходу ферменту.

Поставлена задача досягається способом отримання тіамінпірофосфокінази, який полягає в тому, що з сировини, яка містить тіамінпірофосфокіназу її екстрагують, і додатково очищують від домішок, і який відрізняється тим, що як сировину використовують тканину тваринного походження - міометрій тварин.

Загальними ознаками прототипу та способу, який пропонується, є те, що в обох випадках тіамінпірофосфокіназу екстрагують дистильованою водою з осаду, який був отриманий після фракціонування, потім тіамінпірофосфокіназу додатково очищують від білкових та небілкових домішок.

Відмінними ознаками способу, який пропонується, є те, що як сировину для виділення тіамінпірофосфокінази використовують не півні дріжджі, а тканину міометрія тварин.

Запропонований спосіб отримання тіамінпірофосфокінази реалізується наступним чином. Тканину міометрія тварин (наприклад великої рогатої худоби) гомогенізують в дистильованій воді у співвідношенні 1:10, потім гомогенат центрифугують при 12000 g протягом 45 хв., потім осад ресуспендують дистильованою водою у співвідношенні 1:5, екстрагують та повторно центрифугують при 12000 g протягом 45 хв., після чого осади об'єднують і висушують при кімнатній температурі. Із отриманих осадів готують екстракт в дистильованій воді у співвідношенні 1:10, який очищують від білкових та небілкових домішок відомими способами.

Пропонований спосіб отримання тіамінпірофосфокінази багаторазово випробувався в лабораторії біохімії ОНУ імені І. І. Мечникова з доброю відтворюваністю результатів.

Результати досліджень з найкращою відтворюваністю результатів наведені в таблиці 1, в якій відображено активність та % виходу тіамінпірофосфокінази з пивних дріжджів та немалігнізованої і пухлинних тканин міометрія.

Таблиця 1

Пивні дріжджі		Міометрій (M±m, n=7)					
		Немалігнізована тканина		Доброякісна пухлина		Злоякісна пухлина	
ПА	% виходу	ПА	% виходу	ПА	% виходу	ПА	% виходу
240	17,0	844,4± 82,1	27,3	482,6±44,9	39,27	501,4±48,2	31,4

Примітка: ПА - питома активність тіамінпірофосфокінази в пмоль тіаміну на 1 мг білка за 1хв.

5 Як видно з даних, наведених в таблиці 1, в тканині міометрію активність тіамінпірофосфокінази в 1,8-3,5 рази вище, ніж в пивних дріжджах. Отримані результати, щодо активності ферменту та відсотку виходу свідчать про те, що тканина міометрію є більш перспективною для виділення тіамінпірофосфокінази.

10 Таким чином, запропонований спосіб у порівнянні з прототипом забезпечує отримання препарату тіамінпірофосфокінази з 39 % виходу при незначних матеріальних витратах (150-230 грн.), трудоемкості та малостадійності процесу.

Спосіб, що пропонується, надається промисловим підприємствам для промислового використання.

15 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб отримання тіамінпірофосфокінази, який полягає в тому, що з сировини, яка містить тіамінпірофосфокіназу її екстрагують, і додатково очищують від домішок, який **відрізняється** тим, що як сировину використовують тканину тваринного походження - міометрій тварин.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601