



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 90939

(13) U

(51) МПК

C12N 9/10 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 01090**

(22) Дата подання заявки: **05.02.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.06.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.06.2014, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):

**Баль-Прилипко Лариса Вацлавівна (UA),
Віннов Олексій Сергійович (UA),
Леонова Богдана Ігорівна (UA),
Гармаш Олександра Михайлівна (UA),
Александров Роман Вікторович (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ-41, 03041
(UA)**

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КАТАЛІТИЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТУ ТРАНСГЛЮТАМІНАЗИ

(57) Реферат:

Спосіб визначення каталітичної ефективності препарату транsgлютамінази передбачає, що до розчину дипептиду N-CZ-GLN-GLY у суміші з рН в інтервалі 6,00-6,10, що містить NaOH, гідроксиламіну і відновленого глутатіоту у співвідношенні 1:2:2 загальним обсягом 15 мл, додають 0,1 мг зразка трасглютамінази. Суміш термостатують при 37° С протягом 10 хвилин, охолоджують і додають 15 мл суміші 3 % розчину в 0,1 N HCl, 12 % розчину трихлороцтової кислоти і HCl у співвідношенні у рівній кількості, центрифугують. У рідкій частині визначають величину оптичної пильності при 525нм, використовуючи як порівняння аналогічний розчин без транеглутамінази, розраховують величини активності щодо калібрувального графіка, побудованого з використанням хімічно чистої транеглутамінази. Каталітичну активність визначають за величиною penetрації гелю стандартизованого 10 %-вого розчину харчового желатину з рН 7,4. Оцінювання в широкому діапазоні значень показника масова частка ферментного препарату в фермент-субстратній системі становить 0,5 %, тривалість ферментування за температури 50 °С - 24 години, а тривалість формування гелю за температури 25 °С - 12 годин.

UA 90939 U

Корисна модель належить до біотехнології і може бути використана у харчовій промисловості.

Відомий спосіб визначення протеазної активності ферменту трансклутамінази (патент № WO2007026921A1 "Method for determination of protease activity in transglutaminase-containing matter and adhesive transglutaminase preparation", Rikiya Ishida, Hiroyuki Nakagoshi, від 05.11.2008), який передбачає, що до розчину дипептиду N-CZ-GLN-GLY у суміші з рН в інтервалі 6,00-6,10, що складається з NaOH, гідроксиламіну, і відновленого глутатіоту у співвідношенні 1:2:2 загальним обсягом 15 мл, додають 0,1 мг зразка трасклутамінази, суміш термостатують при 37 °С протягом 10 хвилин, охолоджують і додають 15 мл суміші 3 % розчину в 0,1 N HCl, 12 % розчину трихлороцтової кислоти і HCl у співвідношенні у рівній кількості, центрифугують, у рідкій частині визначають величину оптичної щільності при 525nm, використовуючи як порівняння аналогічний розчин без трансклутамінази, розраховують величини активності щодо калібрувального графіка, побудованого з використанням хімічно чистої трансклутамінази.

Недоліком відомого способу є необхідність застосування стандартизованого ферменту протеази високого ступеня очищення, внаслідок чого можлива взаємна інактивація протеази і трансклутамінази в процесі ферментації

В основу корисної моделі поставлена задача розробка простого у використанні способу визначення каталітичної ефективності трансклутамінази, як індикатору якості продукту, та обґрунтування оптимальних умов експерименту.

Поставлена задача вирішується тим, що каталітичну ефективність визначають за величиною penetрації гелю стандартизованого 10 %-ого розчину харчового желатину з рН 7,4, при цьому оцінювання в широкому діапазоні значень показника масова частка ферментного препарату в фермент-субстратній системі становить 0,5 %, тривалість ферментування за температури 50 °С-24 години, а тривалість формування гелю за температури 25 °С-12 годин. Приклад. Експериментальні розчини готують з урахуванням масової частки вологи в желатині і препараті трансклутамінази. Наважки зважують з точністю до 0,01 г. Желатин розчиняють в 75 % маси необхідного для приготування буферного розчину, попереднього розігрітого до 50 °С з інтенсивним перемішуванням. Препарат трансклутаміну розчиняють в 10-15 % буферного розчину тієї ж температури. Отримані розчини змішують і доводять буферним розчином до необхідної маси. Для всіх експериментів як зразки порівняння використовують розчини желатину без введення препарату трансклутамінази. Одержанні розчини дозують до повного заповнення у бюкси алюмінієві розміром 50 × 38 мм. Підготовлені зразки для розвитку реакції термостатують при температурі 50 °С. Кожні 2 години визначають penetрацію. Зразки розігрівають до температури 90 °С і витримують 30 хвилин для інактивації трансклутамінази. Інактивовані розчини поміщають в ексікатор і термостатують при температурі 25 °С для формування гелю. Всі експерименти виконують в п'ятикратній повторності з п'ятикратним повторенням кожного вимірювання. Таким чином, кожній експериментальній точці відповідало 25 вимірювань значення величини penetрації.

Значення ефективності каталізу препарату трансклутамінази (ЕКТ), для усунення впливу технічних особливостей вимірювального приладу (пенетрометра), доцільно розраховувати за рівнянням:

$$EKT = \frac{P_c - P_{\phi}}{P_{cm}}, g^{-1},$$

де P_c - величина penetрації 10 % гелю желатину без додавання препарату тансклутамінази (зразок порівняння), од. penetрації;

P_{ϕ} - величина penetрації 10 % гелю ферментованого желатину, од. penetрації;

m - маса препарату трансклутамінази прийнятого для ферментації 100 г 10 % розчину желатину.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб визначення каталітичної ефективності препарату трансглютамінази, який передбачає, що до розчину дипептиду N-CZ-GLN-GLY у суміші з рН в інтервалі 6,00-6,10, що складається з NaOH, гідроксиламіну і відновленого глутатіоту у співвідношенні 1:2:2 загальним обсягом 15 мл, додають 0,1 мг зразка трасглютамінази, суміш термостатують при 37° С протягом 10 хвилин, охолоджують і додають 15 мл суміші 3 % розчину в 0,1 N HCl, 12 % розчину трихлороцтової
- 10 кислоти і HCl у співвідношенні у рівній кількості, центрифугують, у рідкій частині визначають величину оптичної пильності при 525нм, використовуючи як порівняння аналогічний розчин без транеглютамінази, розраховують величини активності щодо калібрувального графіка, побудованого з використанням хімічно чистої транеглютамінази, який **відрізняється** тим, що каталітичну активність визначають за величиною пенетрації гелю стандартизованого 10 % розчину харчового желатину з рН 7,4, при цьому оцінювання в широкому діапазоні значень
- 15 показника масова частка ферментного препарату в фермент - субстратній системі становить 0,5 %, тривалість ферментування за температури 50 °С - 24 години, а тривалість формування гелю за температури 25 °С - 12 годин.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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