



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 146 947** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **A 61 L 2/04, C 07 K 1/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **98117859/13, 29.09.1998**

(24) Дата начала действия патента: **29.09.1998**

(46) Опубликовано: **27.03.2000**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Сочава И.В. и др. Денатурационный скачок теплоемкости в глобулярных белках и его связь с процессом стеклования, - М.: Биофизика, 1991, т.36, с. 432. RU 2059417 C1, 10.05.96. EP 0142059 A2, 22.05.85. EP 0196761 A2, 08.10.86. US 5599909 A, 04.02.97.**

Адрес для переписки:

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, Межвузовский патентно-лицензионный отдел, Университет, Леонову И.Ф.

(71) Заявитель(и):

Санкт-Петербургский государственный университет

(72) Автор(ы):

**Белопольская Т.В.,
Церители Г.И.,
Грунина Н.А.**

(73) Патентообладатель(ли):

Санкт-Петербургский государственный университет

(54) СПОСОБ ТЕПЛООВОГО НЕОБРАТИМОГО РАЗРУШЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА СО СВЯЗАННОЙ ВОДОЙ ПРИ СОХРАНЕНИИ ХИМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ

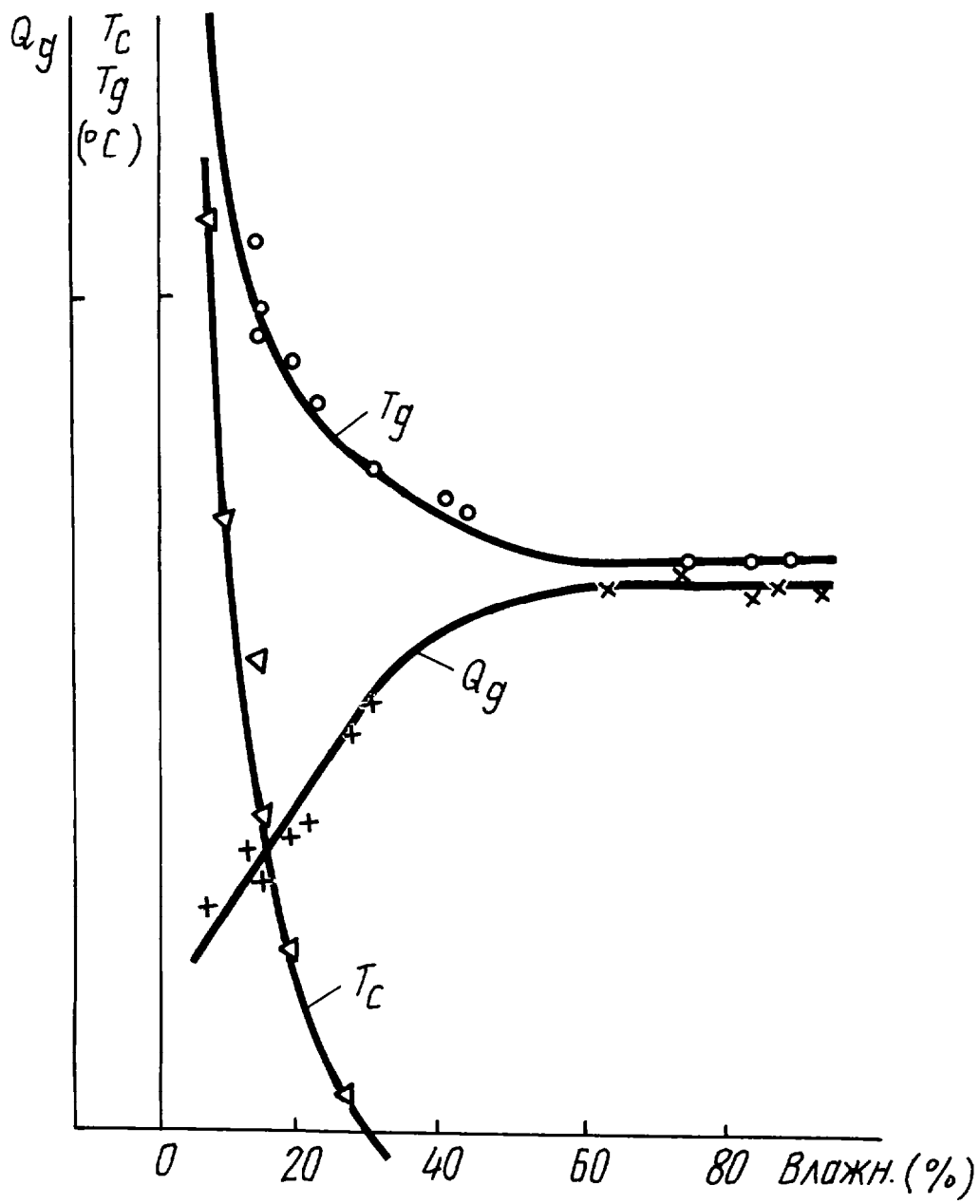
(57) Реферат:

Изобретение относится к удовлетворению жизненных потребностей человека, связанных с уничтожением жизнеспособности белковых препаратов при использовании теплового воздействия, в том числе в составе многокомпонентных сред. Способ основан на тепловой денатурации с последующим разворачиванием глобулы. Глобулярный белок со

связанной водой нагревают до температуры, которая превышает температуру денатурации. Нагретый белок выдерживают в течение времени полного разрушения структур. Способ увеличивает вероятность получения нежизнеспособного белка после его тепловой обработки, позволяет сократить время обработки и сэкономить электрические ресурсы, требующиеся для обработки. 1 з.п. ф-лы, 3 ил.

RU 2 1 4 6 9 4 7 C 1

RU 2 1 4 6 9 4 7 C 1



Фиг.1



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 146 947** (13) **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 L 2/04, C 07 K 1/00**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **98117859/13, 29.09.1998**

(24) Effective date for property rights: **29.09.1998**

(46) Date of publication: **27.03.2000**

Mail address:

199034, Sankt-Peterburg, Universitetskaja nab., 7/9, Mezhvuzovskij patentno-litsenzyonnyj otdel, Universitet, Leonovu I.F.

(71) Applicant(s):

Sankt-Peterburgskij gosudarstvennyj universitet

(72) Inventor(s):

**Belopol'skaja T.V.,
Tseriteli G.I.,
Grunina N.A.**

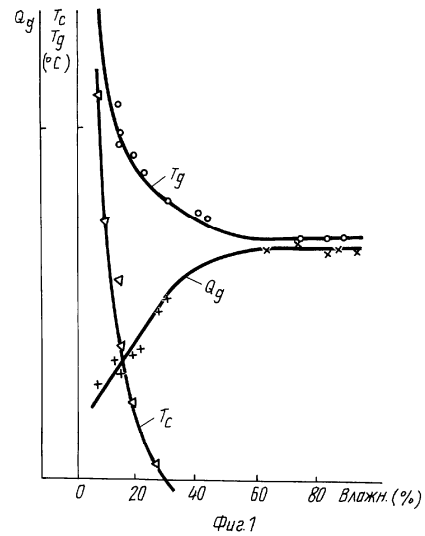
(73) Proprietor(s):

Sankt-Peterburgskij gosudarstvennyj universitet

(54) **METHOD OF IRREVERSIBLE THERMAL DESTRUCTION OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF GLOBULAR PROTEIN WITH BOUND WATER AND CHEMICAL STRUCTURE PRESERVED**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE: invention relates to satisfaction of vital necessities of man by way of thermally destroying vitality of protein preparations, including those in multicomponent medium compositions. Globular protein with bound water is heated to temperature above denaturation temperature and held at this temperature so long as to completely destroy protein structures. EFFECT: increased probability for protein to lose its vitality, reduced treatment time. 2 cl, 3 dwg, 3 ex



RU 2 146 947 C1

RU 2 146 947 C1

Изобретение относится к области удовлетворения жизненных потребностей человека, в частности к разделам, связанным с уничтожением жизнеспособности белковых препаратов при использовании теплового воздействия, в том числе в составе многокомпонентных сред, а именно к медицине и ее разделам, включающим дезинфекцию или стерилизацию веществ, материалов и предметов, а также отраслям промышленности, связанным с производством лекарств, биопрепаратов и пищевых продуктов.

Известен способ теплового необратимого разрушения глобулярного белка со связанной водой (1), включающий нагревание белка до температур, превышающих температуру денатурации. Способ позволяет уничтожить жизнеспособность глобулярного белка, но к его недостаткам следует отнести недостоверность необратимости процесса разрушения, т.к. в нем не учитывалась необходимость выдержки биопрепарата при температурах полного разрушения структур, промежуточных между нативным и денатурированным состояниями, которые способны сохраняться в белке со связанной водой при температурах, превышающих температуру денатурации белка.

Известен способ теплового необратимого разрушения пространственной структуры глобулярного белка со связанной водой при сохранении химического строения, выбранный в качестве прототипа (2), включающий нагревание белка до температур, превышающих температуру денатурации, с последующим разворачиванием глобулы, следствием чего явилось превращение системы белок-вода в стеклующуюся.

Способ позволяет разрушить нативную пространственную структуру глобулярного белка, однако к недостатку способа относится недостоверность необратимости процесса этого разрушения, т.к. время выдержки нагретого белка при температурах выше температуры денатурации не гарантировало полного разрушения структур, промежуточных между нативным и денатурированным состояниями, которые способны сохраняться в белке со связанной водой при температурах, превышающих температуру денатурации белка.

Решаемой задачей и положительным результатом настоящего изобретения является создание способа теплового необратимого разрушения пространственной структуры глобулярного белка со связанной водой при сохранении химического строения, существенно увеличивающего вероятность получения нежизнеспособного белка после его тепловой обработки.

Способ представляет собой процесс теплового необратимого разрушения пространственной структуры глобулярного белка со связанной водой при сохранении его химического строения путем тепловой денатурации белка с последующим разворачиванием глобулы и отличается тем, что глобулярный белок со связанной водой нагревают до температуры обработки, которая при сохранении его химического строения превышает его температуру денатурации в водном растворе на величину, соответствующую превращению системы белок-вода в стеклующуюся и которая увеличивается при уменьшении влажности белка, и затем выдерживают нагретый белок при ней в течение времени полного разрушения структур промежуточных между нативным и денатурированным состояниями, которые способны сохраняться в белке со связанной водой при температурах, превышающих температуры денатурации белка. В частном конкретном случае способ теплового необратимого разрушения пространственной структуры глобулярного белка со связанной водой при сохранении его химического строения, основанный на тепловой денатурации с последующим разворачиванием глобулы, отличающийся тем, что температуру обработки, т.е. температуру, максимально необходимую для необратимого разрушения пространственной структуры глобулярного белка со связанной водой, выбирают при влажности белка в пределах от 3% до 5% в диапазоне соответственно от 180°C до 150°C, при влажности белка в пределах от 5% до 10% в диапазоне соответственно от 150°C до 120°C, при влажности в пределах от 10% до 15% в диапазоне соответственно от 120°C до 100°C, при влажности от 15% до 20% в диапазоне соответственно от 100°C до 90°C, а продолжительность выдержки нагретого белка выбирают при влажности белка в пределах от 3% до 5% соответственно не менее 15 мин, при влажности в пределах от 5% до 10% соответственно не менее 10 мин, при

влажности белка в пределах от 10% до 15% соответственно не менее 5 мин, при влажности в пределах от 15% до 20% соответственно не менее 2 мин.

При нагревании белка происходит его тепловая денатурация. Параметры тепловой денатурации (температура и теплота), т. е. разрушения нативной пространственной структуры белка зависят от весового соотношения компонентов в системе белок-вода. Температура денатурации белка со связанной водой выше его температуры денатурации в растворе, что связано с изменением молекулярной подвижности белка, мерой которой является значение теплоемкости, при переходе раствор - стеклющаяся система при удалении свободной воды. При уменьшении содержания связанной воды в белке происходит дальнейшее повышение его температуры денатурации, составляющее несколько десятков градусов. Такое увеличение, происходящее одновременно с уменьшением теплоты денатурации, обусловлено существованием состояний глобулы, являющихся промежуточными между нативным и денатурированным состояниями. При охлаждении белка до комнатной температуры эти состояния могут сохраняться сколь угодно долго, поскольку переходят в стеклообразное состояние, что и определяет жизнеспособность белка при последующем растворении. В то же время для их разрушения при нагревании выше температуры денатурации требуется выдерживание белка в течение некоторого времени, увеличивающегося при уменьшении влажности, что обусловлено соответствующим уменьшением молекулярной подвижности белка при высушивании.

20 Пример 1

В условиях экспериментальной биофизической лаборатории способ теплового необратимого разрушения пространственной структуры глобулярного белка со связанной водой при сохранении химического строения осуществлялся следующим образом. Использовалась стандартная методика определения тепловых характеристик глобулярного белка миоглобина. Препараты лиофилизированного миоглобина, полученного по стандартной методике из скелетных мышц лошади, после задания процента влажности в пределах 3%-25% массой 100 миллиграммов помещали в стандартную металлическую герметичную ампулу. Абсолютные значения теплоемкости тестируемого препарата определялись на стандартном прокалиброванном дифференциальном сканирующем калориметре, обеспечивающем ошибки в определении теплоемкости и теплоты не более 3%, а температуры не более 0,1°C. Максимум на термограмме образца при первом нагревании соответствовал процессу денатурации белка, площадь под кривой - теплоте перехода, а температура максимума - температуре перехода. Скачок на термограмме при втором нагревании тестируемого препарата обусловлен процессом стеклования денатурированного теплом белка. При исследовании образцов миоглобина с различной влажностью в пределах 3%-25% с шагом измерения 1% было установлено, что при потере белком связанной воды происходит повышение температуры денатурации T_g , от 75°C до 185°C, сопровождаемое уменьшением теплоты перехода Q_g от 7,5 кал/г до 2,0 кал/г (фиг. 1). Конкретные значения измеренных величин температуры денатурации приведены на фиг. 2, кривая 1. После денатурации при охлаждении белок переходит в стеклообразное состояние (кривая 1 фиг. 3). В миоглобине с влажностью 20%, прогревом до температуры 95°C и выдержанном при ней в течение 2 минут, утрачивалась нативная пространственная структура полностью, что было зафиксировано отсутствием теплоты денатурации. В то же время в миоглобине с влажностью 15% при нагревании до 115°C и выдержанном при этой температуре в течение также 2 минут при последующем растворении в воде пространственная нативная структура также не восстанавливалась. Прогревание миоглобина с влажностью в 10% при температуре 127°C и выдерживание при этой температуре в течение 2 минут привело к тому, что при последующем растворении пространственная нативная структура частично восстанавливалась. При прогревании образца в течение 5 минут восстановления структуры не происходило. Прогревание миоглобина с влажностью в 5% при температуре 155°C и выдерживание при этой температуре в течение 5 минут привело к тому, что при последующем растворении пространственная нативная структура частично восстанавливалась. При прогревании

образца в течение 10 минут восстановления структуры не происходило. Прогревание миоглобина с влажностью 3% при температуре 175°C и выдерживание при этой температуре в течение 10 минут привело к тому, что при последующем растворении пространственная нативная структура частично восстановилась. При прогревании образца в течение 15 минут восстановления структуры не происходило.

Пример 2

В условиях примера 1 повторяли исследования для препарата глобулярного белка рибонуклеазы. Измеренные значения температур денатурации приведены на фиг. 2 кривая 2. Значения измеренных временных интервалов разрушения пространственной структуры полностью совпали с соответствующими значениями для конкретных величин влажности, полученных для миоглобина, указанных в примере 1. Температура стеклования рибонуклеазы совпадает с соответствующими значениями, измеренными для миоглобина и указанными на фиг. 3, кривая 1.

Пример 3

В условиях примера 1 повторяли исследования для препарата глобулярного белка лизоцима. Измеренные значения температур денатурации приведены на фиг. 2, кривая 3. Значения измеренных временных интервалов разрушения пространственной структуры полностью совпали с соответствующими значениями для конкретных величин влажности, полученных для миоглобина, указанных в примере 1. Температуры стеклования лизоцима совпадают с соответствующими значениями, измеренными для миоглобина и указанными на фиг. 3, кривая 1. Таким образом, при осуществлении способа теплового необратимого разрушения пространственной структуры глобулярного белка со связанной водой при сохранении химического строения предельные значения температур нагревания белка, взятые из измерения для рибонуклеазы, являются достаточными для необратимого разрушения пространственной структуры всех глобулярных белков, включая лизоцим и миоглобин, относящихся к ферментам и транспортным белкам. Использование способа в конкретных производственных условиях позволяет гарантировать с большой степенью вероятности необратимое разрушение глобулярных белков при одновременном сокращении времени обработки и экономии энергетических ресурсов, требующихся для обработки.

Источники информации:

1. Рапли Дж., Янг П., Толпин Г. Вода в полимерах (под ред. С.Роуланда). М, Мир, 1984, С.555.
2. Сочава И.В., Церетели Г.И., Смирнова О.И. Денатурационный скачок теплоемкости в глобулярных белках и его связь с процессом стеклования. Биофизика, 1991. т.36. с.432.

Формула изобретения

1. Способ теплового необратимого разрушения пространственной структуры глобулярного белка со связанной водой при сохранении химического строения, основанный на тепловой денатурации с последующим разворачиванием глобулы, отличающийся тем, что глобулярный белок со связанной водой нагревают до температуры обработки, которая при сохранении его химического строения превышает температуру его денатурации в водном растворе на величину, соответствующую превращению системы белок - вода в стеклующуюся, и которая увеличивается с уменьшением молекулярной подвижности белка при снижении его влажности, и затем выдерживают нагретый белок в течение времени полного разрушения структур, промежуточных между нативным и денатурированным состояниями, которые способны сохраняться в белке со связанной водой при температуре, превышающей температуру денатурации белка.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что температуру обработки выбирают при влажности белка в пределах от 3 до 5% соответственно в пределах от 180 до 150°C, при влажности в пределах от 5 до 10% соответственно в пределах от 150 до 120°C, при влажности от 10 до 15% соответственно в пределах от 120 до 100°C, при влажности от 15 до 20% соответственно в пределах от 100 до 90°C, а время выдерживания нагретого белка

выбирают при влажности белка в пределах от 3 до 5% соответственно не менее 15 мин, при влажности в пределах от 5 до 10% соответственно не менее 10 мин, при влажности в пределах от 10 до 15% соответственно не менее 5 мин, при влажности в пределах от 15 до 20% соответственно не менее 2 мин.

5

10

15

20

25

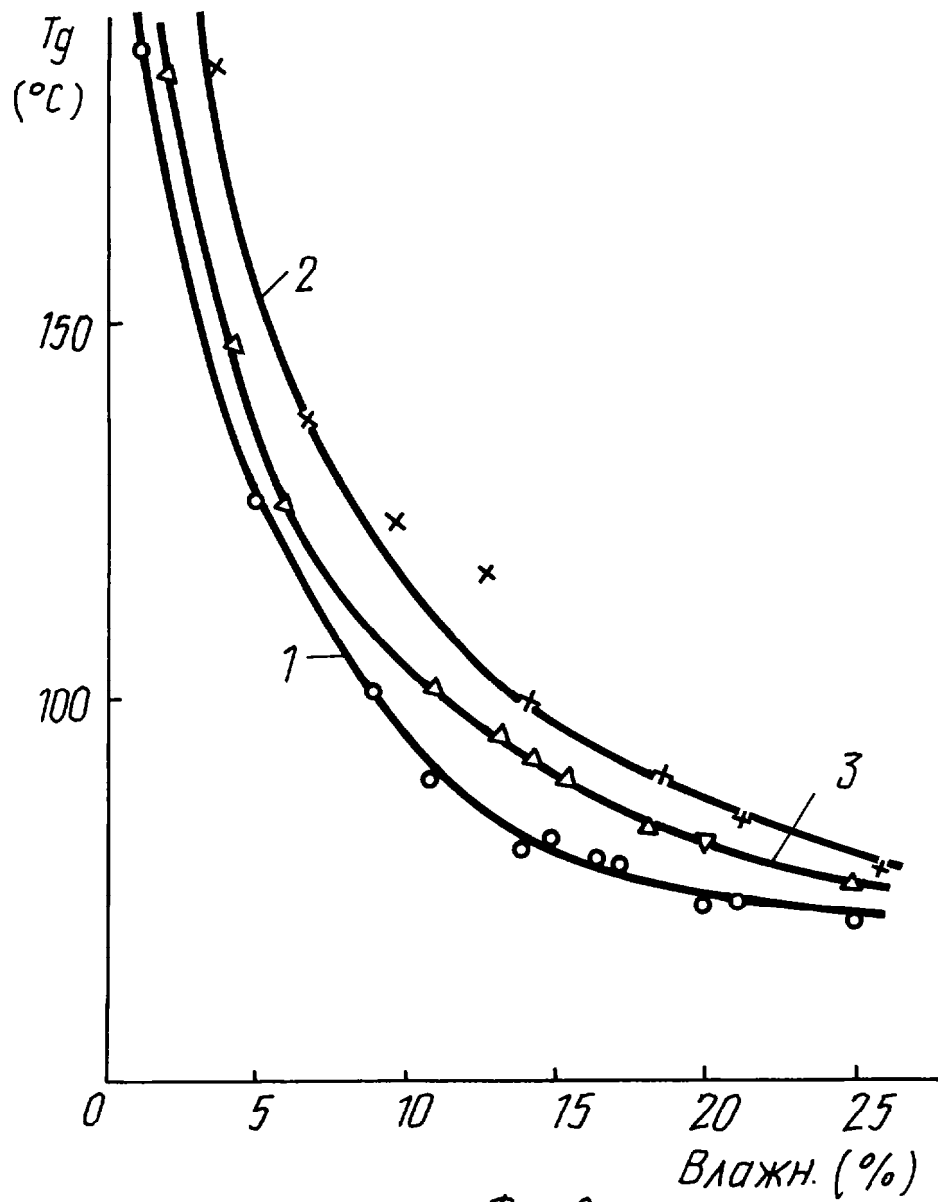
30

35

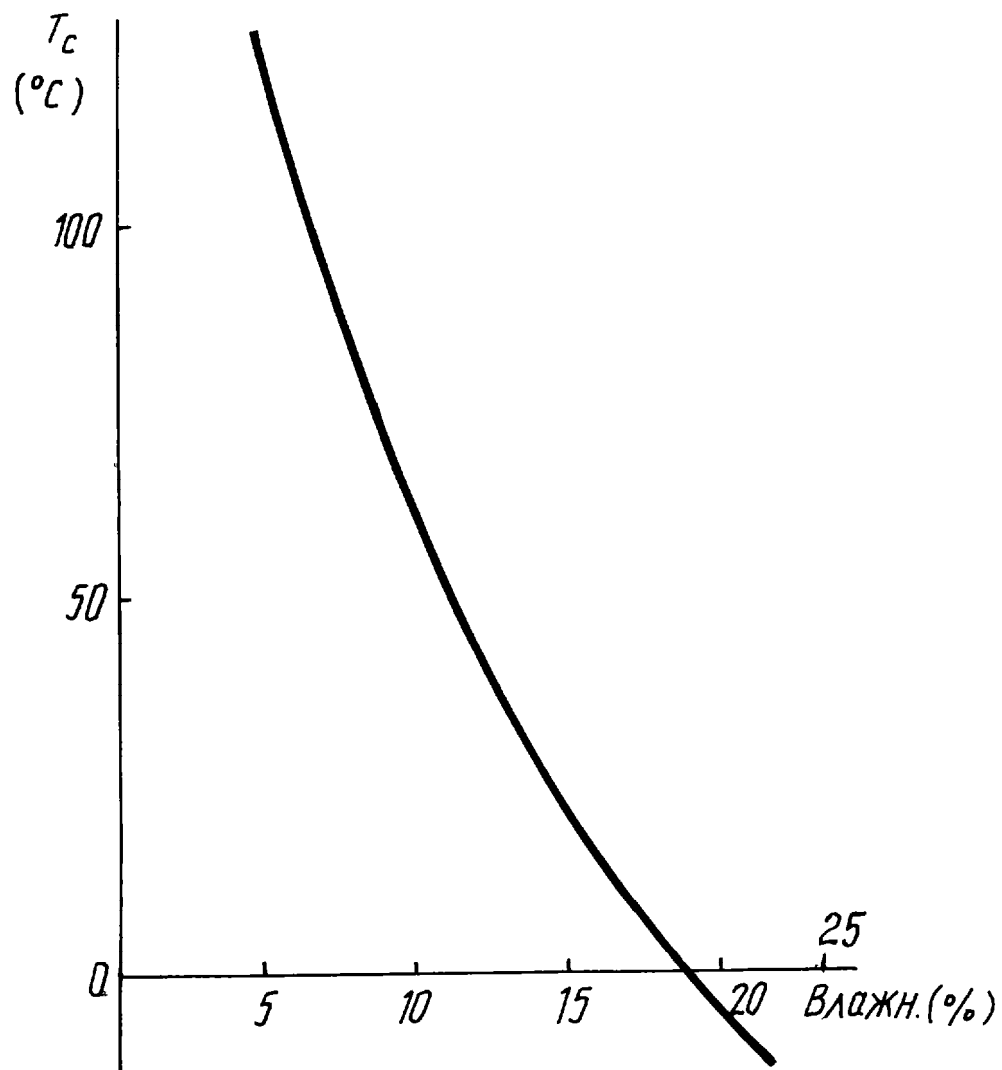
40

45

50



Фиг. 2



Фиг. 3