



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112625** (13) **C2**
(51) МПК**A61K 45/08** (2006.01)**A61K 9/10** (2006.01)**A61K 125/00** (2006.01)**A61P 3/10** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД****(21)** Номер заявки: **а 2015 13092****(22)** Дата подання заявки: **30.12.2015****(24)** Дата, з якої є чинними
права на винахід: **26.09.2016****(41)** Публікація відомостей
про заявку: **10.06.2016, Бюл.№ 11****(46)** Публікація відомостей
про видачу патенту: **26.09.2016, Бюл.№ 18****(72)** Винахідник(и):**Сибірна Наталія Олександрівна (UA),
Горбулінська Олександра Вікторівна
(UA),****Хохла Марія Романівна (UA),
Вільданова Роза Іскандерівна (UA),
Шульга Олександр Миколайович (UA),
Карпенко Олена Володимирівна (UA),
Щеглова Наталія Степанівна (UA)****(73)** Власник(и):**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА,
вул. Університетська, 1, м. Львів, 79000
(UA)****(56)** Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

RU 2381692 C1, 20.02.2010 (8 стор.)

RU 2388491 C2, 10.05.2010 (10 стор.)

UA 71792 A, 15.12.2004 (3 стор.)

Єрохів В.А. Біотехнологія поверхнево-
активних рамноліпідів штаму *Pseudomonas*
sp. PS-17 у ферментері: автореф. дис...
канд. тех. наук: 03.00.20/ В.А. Єрохін: НУХТ.
- К.: 2014. - 21 с. (12 арк.)Наукові здобутки молоді – вирішенню
проблем харчування людства у XXI столітті
/ О.В. Філіпова // Розроблення способу
виробництва пшеничного хліба, збагаченого
порошком якона та вівсяним борошном:
матеріали 78 міжнародної наукової
конференції молодих учених, аспірантів і
студентів. К.: 2-3 квітня 2012 р. / НУХТ. - К. -
С. 14-15 (2 арк.)**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ СТАБІЛІЗОВАНОГО ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ХАРЧОВОГО ПРОДУКТУ НА
ОСНОВІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН КОРЕНЕВИХ БУЛЬБ ЯКОНА (SMALLANTHUS
SONCHIFOLIUS POEPP. & ENDL.)****(57)** Реферат:Винахід належить до способу отримання стабілізованого функціонального харчового продукту
на основі біологічно активних речовин кореневих бульб якона (*Smallanthus Sonchifolius* Poepp. &

UA 112625 C2

Endl.), причому використовують подрібнені сухі субстанції кореневих бульб якона. Порошок з кореневих бульб якона, у кількості, що в перерахунку дорівнює дозі 0,5 г/кг маси тіла, розчиняють у воді, після чого до отриманої суспензії додають поверхнево-активний біокомплекс на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. 17 (PS-17) у концентрації 0,00001 г/мл.

Винахід належить до фармацевтичної промисловості та біотехнології, зокрема одержання комплексних стабілізованих функціональних харчових продуктів на основі біологічно активних сполук рослинного походження та біогенних поверхнево активних речовин з антидіабетичною дією.

Відомий спосіб, за яким отримують водні та водно-спиртові суспензії, а також надкритичний флюїдний екстракт з надземної частини рослини сосюреї (*Saussurea*) родини айстрові (*Asteraceae*) (патент RU № 2464036, МПК А61К, А61Р, 2012). Спосіб одержання полягає в подрібненні надземної частини сосюреї до одержання однорідного порошку, який додають до води з розрахунку 0,2-2,5 г/кг маси тіла тварини. Для стабілізації одержаних суспензій додають 1 % розчин крохмалю.

Спосіб має ряд недоліків. Крохмаль має низьку термолабільність, внаслідок чого відбувається сильне пошкодження нативної структури крохмальних зерен, що призводить до утворення клейстеру і в кінцевому результаті погіршує всмоктування біологічно активних речовин. Використання 1 % розчину крохмалю може викликати алергічні реакції внаслідок індивідуальної непереносимості даного компонента.

Найближчим за технічною суттю - прототипом є спосіб отримання стабільних водорозчинних препаратів, збагачених біологічно активними речовинами, з певною спеціально підбраною комбінацією молекул поверхнево-активних речовин (RU № 2388491, МПК А61К, 2009). Як вихідний матеріал використовують неводні екстракти або сухі субстанції природних об'єктів, а саме: концентрату *Xotrien*, який, складається з багатокомпонентної суміші токоферолів і токотриєнолів і суміші хлорофілів, отриманої із субстанції морепродуктів, подрібнених до нанорозмірів, а також водорозчинних форм біологічно активних препаратів, отриманих гомогенізацією біологічно активних компонентів у поверхнево-активних речовинах з подальшим внесенням отриманої композиції у водну фазу. Як поверхнево-активні речовини використовують полівініловий спирт і поліетиленгліколі ПЕГ-35 та ПЕГ-40. Стабілізацію проводять при температурах 60-100 °С.

Недоліком способу є використання таких поверхнево-активних речовин, як поліетиленгліколі та полівініловий спирт, парентеральне введення яких не завжди є індиферентне для організму, викликає ураження нирок та органів зору, діарею, метеоризм, нудоту, алергічні реакції тощо.

В основу винаходу поставлена задача удосконалити спосіб отримання стабілізованого функціонального харчового продукту на основі біологічно активних речовин кореневих бульб якона (*Smallanthus sonchifolius* Poir. & Endl.) шляхом додавання до порошку кореневих бульб якона поверхнево активного біокомплексу на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. 17 (біоПАР, PS-17), що дасть змогу одержати стабілізовану дрібнодисперсну суспензію, яку легко вводити через зонд дослідним тваринам та підвищити точність дозування і біодоступність діючих речовин.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі отримання стабілізованого функціонального харчового продукту на основі біологічно активних речовин кореневих бульб якона (*Smallanthus Sonchifolius* Poir. & Endl.), за яким як вихідний матеріал використовують подрібнені сухі субстанції природних об'єктів, причому як природний об'єкт використовують кореневі бульби якона, порошок, з якого у кількості, що в перерахунку дорівнює дозі 0,5 г/кг маси тіла тварини, розчиняють в 1 мл води, після чого до отриманої суспензії додають поверхнево-активний біокомплекс на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. 17 (PS-17) у концентрації 0,00001 г/мл або порошок кореневих бульб якона, обробляють біокомплексом PS-17 з розрахунку 0,00001 г на 0,075 г порошку якона, після чого його додають у воду.

З літературних джерел (Ledur Alles M. J., Tessaro I. C. Physicochemical characterization of Saccharides Powder Obtained from Yacon Roots (*Smallanthus sonchifolius*) by Membrane Technology // Braz. Arch. Biol. Technol. 2013. vol. 56. n.6: P. 1024-1033), відомо використання біологічно активних речовин кореневих бульб якона як функціонального харчового продукту, проте автори вперше запропонували використати кореневі бульби якона у формі стабілізованої суспензії, як основи для створення функціонального харчового продукту, що відповідає критерію "Новизна".

Суттєвими відмінностями винаходу є:

- використання порошку із висушених кореневих бульб якона як вихідної речовини;
- використання біокомплексу на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. 17 (PS-17).

Переваги способу:

- 1) простий і нетривалий процес виготовлення;

2) рослинна сировинна є невибагливою та добре пристосованою до росту в кліматичних умовах України;

3) стабілізація препарату проводиться при кімнатній температурі, що дозволяє уникнути руйнування біологічно активних речовин;

5 4) біокомплекс PS-17 є екологічно безпечним, не токсичним та стабільний у широкому діапазоні pH і температури;

Отриманий продукт можна використовувати як монотерапію цукрового діабету у поєднанні з дієтотерапією та як допоміжний засіб у поєднанні з пероральними та парентеральними засобами.

10 Фіг. 1. Водні суспензії порошку якона через 15 хвилин після приготування: 1 - контроль (водна суспензія); 2 - водна суспензія порошку якона, до якої додано біокомплекс PS-17 у концентрації 0,00001 г/мл; 3 - водна суспензія порошку якона, до якої додано біокомплекс PS-17 у концентрації 0,00002 г/мл; 3 - водна суспензія порошку якона, до якої додано біокомплекс PS-17 у концентрації 0,00003 г/мл.

15 Фіг. 2. Налипання суспензій порошку якона на стінках пробірок: 1 - контроль (водна суспензія); 2 - водна суспензія порошку якона, до якої додано біокомплекс PS-17 у концентрації 0,00001 г/мл; 3 - водна суспензія порошку якону, до якої додано біокомплекс PS-17 у концентрації 0,00002 г/мл; 3 - водна суспензія порошку якона, до якої додано біокомплекс PS-17 у концентрації 0,00003 г/мл.

20 Фіг. 3. Порошок якона: 1 - без обробки розчином біоПАР; 2 - після попередньої обробки розчином біоПАР.

Фіг. 4. Порівняння водних суспензій якону без попередньої обробки порошку якону та з нею: 1 - порошок якона у воді (контроль); 2 - порошок якона у воді з додаванням розчину біоПАР у концентрації 0,00001 г/мл; 3 - порошок якона у воді з додаванням біокомплексу PS-17 у концентрації 0,00002 г/мл; 4 - порошок якона у воді з додаванням біокомплексу PS-17 у концентрації 0,00003 г/мл; 5 - порошок якона, який був попередньо оброблений біокомплексом PS-17 з розрахунку 0,00001 г на 0,075 г порошку якона після чого була приготована водна суспензія.

Використання водних розчинів порошку, отриманих з рослинної сировини, для різних досліджень вимагає отримання стійких суспензій, що дасть змогу вирішити проблему їх перорального уведення і чіткого дотримування дозування. Отримані водні суспензії порошку якона належать до грубих суспензій з розміром часток $5 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-2}$ см. Така суспензія є неструктурованою та нестійкою. Для неї характерна швидка седиментація. Відносно великі частинки порошку якона не здатні протистояти дії сили тяжіння і відповідно суспензія швидко розпадається та утворюється осад. Така система є седиментаційно кінетично нестійкою. У таких агрегативно нестійких суспензіях осідання відбувається значно швидше внаслідок утворення великих агрегатів частинок, що між собою злипаються, тобто відбувається їхня коагуляція. Сили зчеплення між ними є співрозмірні з їх силою тяжіння. З фіг. 1 видно, що контрольний препарат швидко розшаровується і частинки порошку якона осідають.

40 Серед широкого спектра перспективних мікроорганізмів-продуцентів поверхнево-активних речовин великої уваги заслуговують представники роду *Pseudomonas*, які синтезують позаклітинні рамноліпіди з високою поверхневою, емульгувальною та піноутворювальною активністю.

45 Біогенні поверхнево-активні речовини PS-17 є продуктом біосинтезу культури *Pseudomonas* sp. PS-17 з колекції мікроорганізмів відділення фізико-хімії ГК ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України, одержання якого описано в патенті (патент UA № 71792 A, C12R 1/38, C12N 1/02, 2004). Штам-продуцент культивують у колбах Ерленмейєра (750 мл), з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об./хв) при температурі 30 °C на рідкому поживному середовищі (г/л): NaNO_3 -4,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -2,0; KH_2PO_4 -1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5; цитрат Na-2,0. Джерело вуглецю-гліцерин-30 г/л. Термін культивування - 5 діб. Поверхнево-активний біокомплекс PS виділяють із супернатанту культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 кислотним осадженням (10 % HCl) при pH 3,0. Отриманий осад витримують при 4 °C протягом ночі, відділяють центрифугуванням (8000 об./хв., 20 хв.), сушать у вакуумі до постійної маси.

55 Згідно з токсикологічним паспортом середньосмертельна доза (ЛД₅₀) біокомплексу PS за умови внутрішньошлункового уведення культуральної рідини для білих щурів і мишей складає 10 г/кг, і належить до речовин 4 класу небезпеки [Токсиколого-гігієнічний паспорт біопрепарату PS (біоПАР PS). - Львів, 2004. – 11 с. (Протокол експертизи Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, кафедра гігієни та профілактичної токсикології № 01 від 27.01.2004 р.)]. З огляду на це застосовують біокомплекс PS у концентраціях 0,00001-60 0,00003 г/мл, що є нетоксичними для тварин і людини.

З метою отримання стабілізованого функціонального харчового продукту на основі біологічно активних речовин кореневих бульб якона водну суспензію порошку якона змішують з біокомплексом PS-17 в різних концентраціях: 0,00001 г/мл, 0,00002 г/мл, 0,00003 г/мл, що сприяє підвищенню агрегаційної стійкості даної системи. Біогенні поверхнево активні речовини широко застосовуються у фармацевтиці, оскільки є екологічно безпечні, не токсичні, стабільні у широкому діапазоні рН і температурі, здатні емульгувати, солюбілізувати, міцелоутворювати. Завдяки дифільній будові молекули ПАР і здатності приєднуватися як до гідрофільних, так і до гідрофобних поверхонь, поверхня часток порошку якона стає більш змочуваною, а отримана суспензія стабілізованою (фіг. 1 (2-4)). Водна суспензія кореневих бульб якона, до якої додають біокомплекс PS-17 у концентрації 0,00001 г/мл, утворює стійку суспензію, яка залишається стабільною упродовж 15 хв. При застосуванні біокомплексу PS-17 у концентраціях 0,00002 г/мл і 0,00003 г/мл виявлено аналогічний ефект. Такий час є абсолютно достатнім для введення фітопрепарату тварині через зонд.

Додавання до водних суспензій біокомплексу PS-17 за всіх досліджених концентрацій зумовлює підвищення змочуваності частинок порошку якона, що перешкоджає їхній адсорбції на стінках скляних пробірок (фіг. 2). Така властивість біокомплексу істотно полегшує введення отриманих препаратів у шлунково-кишковий тракт піддослідним тваринам без втрати активної субстанції на стінках катетерів і забезпечує відтворюваність експериментів.

Іншим способом отримання стабілізованого функціонального харчового продукту на основі біологічно активних речовин кореневих бульб якона є додавання біогенних поверхнево-активних речовин біокомплексу PS-17 до подрібненого порошку кореневих бульб якона з розрахунку 0,00001 г на 0,075 г порошку якона.

Порошок після обробки біокомплексом PS-17 не змінює свій вигляд. Це дає можливість уводити біокомплекс PS-17 не тільки до готової водної суспензії якона, але і обробляти порошок якона перед виготовленням водної суспензії. Це також має значення для виготовлення капсул порошку якона, який містить біокомплекс PS-17, з метою отримання препарату із стабільними властивостями (фіг. 3).

Обидва способи отримання стабілізованого функціонального харчового продукту на основі біологічно активних речовин кореневих бульб якону (попередня обробка порошку якона біокомплексом PS-17 та додавання біокомплексу до суспензій порошку кореневих бульб якона) дають можливість отримання водної суспензії, яка є стабільна упродовж 15 хв. Тобто, спосіб застосування біокомплексу PS-17 немає особливого значення для отримання стабілізованих суспензій (Фіг. 4). Проте, спосіб обробки порошку є зручнішим для розроблення технології отримання капсульованих форм біопрепаратів.

Спосіб можна проілюструвати прикладами:

Приклад 1.

З літературних джерел (Nascimento da F. Extraction, quantification and degree of polymerization of yacon (Smallanthus sonchifolia) fructans-Brazil. 2015. P. 1783-1789), відомо спосіб одержання водних суспензій кореневих бульб якона, а саме: кореневі бульби якона вагою від 180-500 г інтродуковані у Київській області, збирають восени, ретельно промивають водою, висушують при кімнатній температурі протягом 2 місяців, нарізають дрібними кружальцями діаметром 2-3 см і товщиною 0,2-0,3 см та подрібнюють за допомогою подрібнювача ріжучої і розпилючої дії протягом 3-5 хв. до одержання однорідного порошку. З 1 кг свіжих кореневих бульб якона вихід повітряно-сухої маси кореневих бульб становить 300 г. Отриманий порошок кореневих бульб якона поміщають у воду. Суспензію готують з розрахунку на масу однієї тварини: порошок подрібнених кореневих бульб у кількості, що в перерахунку дорівнює дозі 0,5 г/кг маси тварини поміщають в 1 мл води.

До одержаної суспензії кореневих бульб якона додають біокомплекс PS-17 у концентрації 0,00001 г/мл, струшують на вортексі упродовж 5 хв. Одержують стійку емульсію.

Приклад 2.

Проводять аналогічно першому. Відмінність у тому, що біокомплекс PS-17 додають до вихідної суспензії кореневих бульб якона у концентрації 0,00002 г/мл. Утворюється стійка емульсія.

Приклад 3.

Проводять аналогічно першому. Відмінність у тому, що біокомплекс PS-17 додають до вихідної суспензії кореневих бульб якона у концентрації 0,00003 г/мл. Утворюється стійка емульсія.

Приклад 4.

Одержують порошок з кореневих бульб якону згідно з прикладом 1. До одержаного однорідного порошку кореневих бульб якону додають біогенні поверхнево-активні речовини

біокомплексу PS-17 з розрахунку 0,00001 г на 0,075 г порошку якона, після чого одержаний порошок, у кількості, що в перерахунку дорівнює дозі 0,5 г/кг маси тварини, поміщають в 1 мл води.

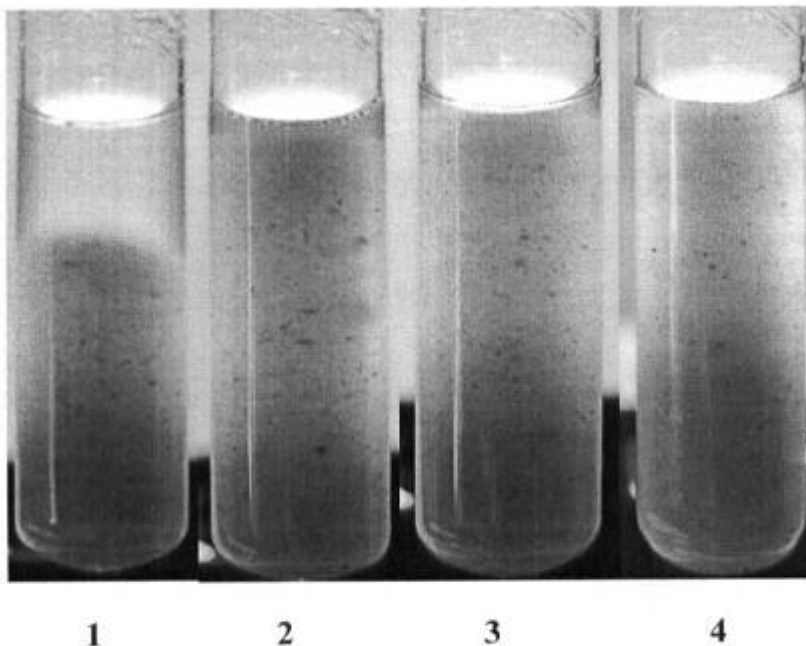
Завдяки амфіфільній будові молекул мікробні поверхнево активні речовини здатні покращувати розчинність нерозчинних і малорозчинних у воді речовин і переводити їх у більш доступну форму. Для отримання стабілізованих суспензій порошку якона краще застосовувати біокомплекс PS-17 у концентрації - 0,00001 г/ мл. Для утворення стабільної емульсії достатньо обробити порошок якона перед розчиненням у воді біокомплексом PS-17 у відповідній концентрації.

Запропонований спосіб достатньо простий, ефективний і дає змогу отримати стабілізований функціональний харчовий продукт на основі біологічно активних речовин кореневих бульб якона у вигляді водної суспензії, яку легко уводити через зонд піддослідним тваринам та підвищити точність дозування і біодоступність діючих речовин.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб отримання стабілізованого функціонального харчового продукту на основі біологічно активних речовин кореневих бульб якона (*Smallanthus Sonchifolius* Poepp. & Endl.), причому використовують подрібнені сухі субстанції кореневих бульб якона, який **відрізняється** тим, що порошок з кореневих бульб якона, у кількості, що в перерахунку дорівнює дозі 0,5 г/кг маси тіла, розчиняють у воді, після чого до отриманої суспензії додають поверхнево-активний біокомплекс на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. 17 (PS-17) у концентрації 0,00001 г/мл.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що порошок кореневих бульб якона обробляють біокомплексом PS-17 з розрахунку 0,00001 г на 0,075 г порошку, після чого його додають у воду.



Фиг. 1

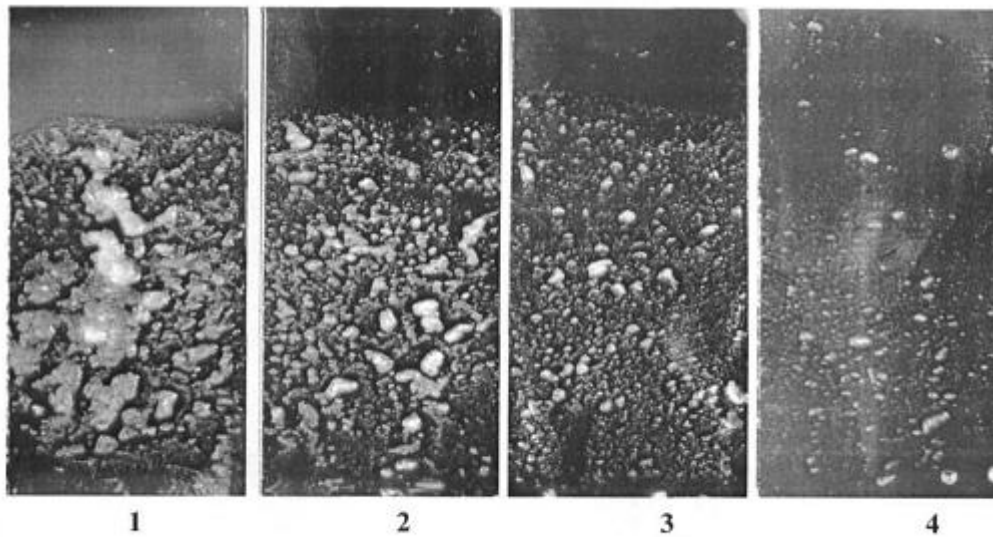


Fig. 2

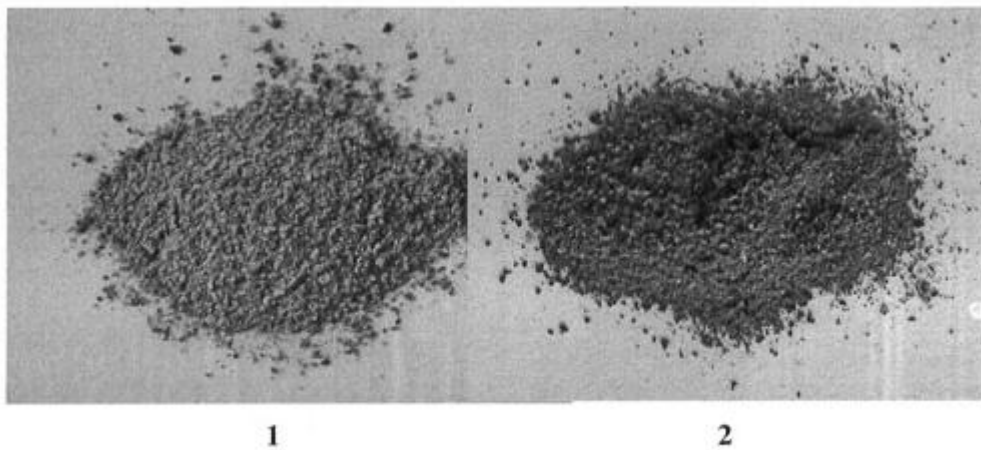


Fig. 3

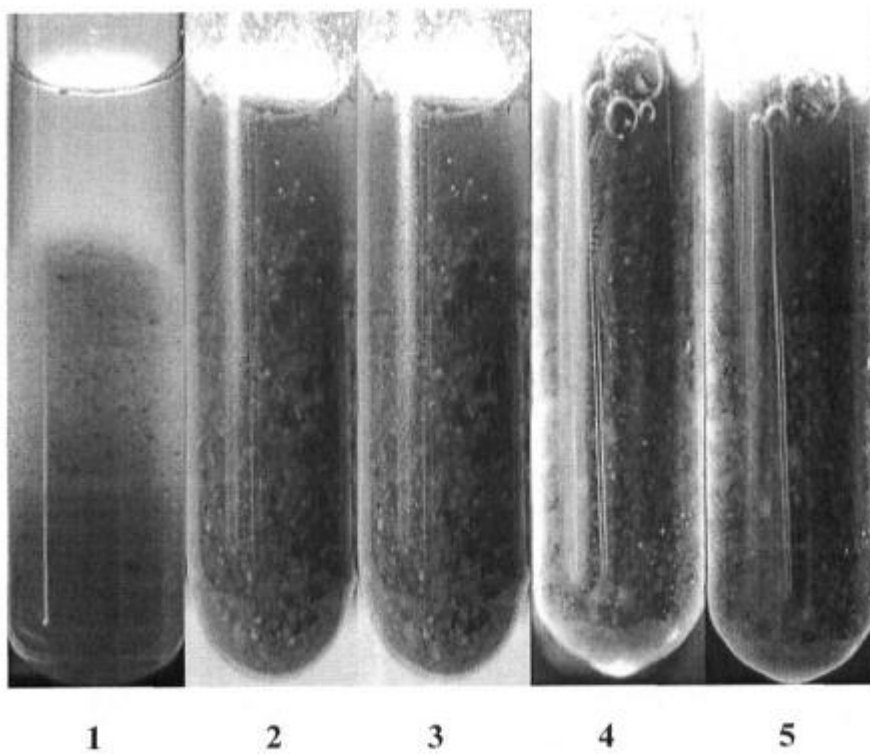


Fig. 4

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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

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