



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **35845** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A61K 38/00
A61K 38/43

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІНГІБІТОРА АМІЛАЗИ

1

(21) u200804747
(22) 14.04.2008
(24) 10.10.2008
(46) 10.10.2008, Бюл.№ 19, 2008 р.
(72) КРУСІР ГАЛИНА ВСЕВОЛОДІВНА, UA, КУШ-
НІР НАДІЯ АНАТОЛІЙВНА, UA
(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, UA
(57) Спосіб одержання інгібітора амілази, що вклю-
чає обробку компонента зерна вівса екстрагентом,

2

відокремлення осаду, обробку осаду екстрагентом, хроматографічне очищення виділеного білка і сушіння цільового продукту, який **відрізняється** тим, що як компонент зерна вівса використовують борошенце вівса, яке обробляють бікарбонатним буферним розчином при рН = 7,0-11,0, відокремлюють осад і фракціюють білки подвійною обробкою сульфатом амоніаку, після чого видаляють сульфат амонію і здійснюють очищення білка афінною хроматографією.

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема до технології одержання інгібітора амілази із зернових продуктів.

Найближчим до корисної моделі, що заявляється, є спосіб одержання інгібітора амілази з ендосперма вівса (див. A. Rocher, F. Colilla, M L. Ortiz and E. Mendez. Identification of the three major celiac immunoreactive proteins and one α -amylase inhibitor from oat endosperm. // FEBS 1992, v.310, №1, p.37-40.).

Виділення проводили за схемою:

Інгібітор вилучали з ендосперма зерна вівса, яке подрібнили і розтерли з 10 об'ємами петролейного ефіру (1 година, при кімнатній температурі). Білки екстрагували сумішшю хлороформ : метанол (2:1), по відношенню до осаду 3:10, 1 годину при кімнатній температурі, потім суміш видаляли під вакуумом.

Сухий осад екстрагували 20мл 0,5М бікарбонату амонію при постійному перемішуванні впродовж 12 годин при кімнатній температурі. Осад відділили від супернатанта центрифугуванням (1700об/хв., 10хв.). Осад промили двічі (по 10мл) розчином бікарбонату амонію й ліофілізували. Потім розчинений екстракт і осад піддавали високорідинної хроматографії (RP-HPLC) на колонці Nucleosil C4 (8x250мм) та елюїрували з градієнтом ацетонітрила, який містив 0,1% трихлороцтової кислоти або на колонці HPLC з Superose 6 або 12 (10x300мм). Десорбцію проводили 0,1% трихлороцтовою кислотою зі швидкістю 0,3мл/хв. Активність інгібітора складає 32%.

Даний спосіб обрано прототипом.

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

- обробка компонента зерна вівса 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 інгібітору амілаз використовували ендосперм зерна вівса, тобто цінний харчовий продукт. В нашій роботі в якості джерела інгібітора амілаз використовується побічний продукт переробки зерна вівса борошенце вівса, які утворюються як відходи виробництва при отриманні харчового продукту. Борошенце вівса є дешевим джерелом інгібітору амілаз.

Для знежирення у прототипі використовували петролейний ефір і процес вели протягом 1 години при кімнатній температурі, що не може повністю звільнити сировину від ліпідної складової, тобто таке знежирення є частковим. В способі, що пропонується, знежирення проводили в апараті Сокслета, що дозволяє багаторазово чистим розчинником (багаторазова екстракція) провести повне знежирення борошенець вівса.

В прототипі додатково використовується екстракція сумішшю хлороформ : метанол (2:1) по відношенню до осаду 3:10 при кімнатній температурі. Потім суміш розчинників видаляється під вакуумом, тобто в якості екстрагенту використовували дорогі та токсичні органічні розчинники хлороформ та метанол. Крім цього, для їх видалення необхід-

(13) **U**
(11) **35845**
(19) **UA**

но використовувати вакуумний апарат, що значно удорожчує технологію. Використання органічних розчинників при кімнатній температурі для екстракції білкових речовин, які володіють біологічною активністю, тобто ферменти та їх інгібітори, супроводжується повною втратою їх біологічної активності, тому екстракцію ферментів та їх інгібіторів необхідно проводити тільки за дуже низьких температур: $(-18 \div -20)^\circ\text{C}$ та з мінімальним часом контакту розчинника з сировиною.

Виділення інгібітору за методом прототипу вимагає використання складного приладу - високорідинного хроматографа на колонці Nucleosil C4 з використанням токсичних органічних розчинників. В спосіб, що пропонується, використовується фракціонування сульфатом амоніаку з подальшою афінною хроматографією супернатанту на колонці з дешевим сорбентом, що не потребує складного апаратурного оформлення.

Активність інгібітору, який вилучено за прототипом складає 32%, що значно менше, ніж активність інгібітору, виділеного за методом, що патентується (38%).

В основу корисної моделі поставлено задачу створити удосконалений спосіб одержання інгібітора амілази, в якому шляхом заміни вихідної сировини, а також умов екстрагування та очищення білку, забезпечити вилучення інгібітору α -амілази з максимальною антиамілолітичною активністю.

Поставлена задача вирішена в спосіб одержання інгібітора амілази, що включає обробку компонента зерна вівса екстрагентом, відокремлення осаду, обробку осаду екстрагентом, хроматографічне очищення виділеного білка і сушку цільового продукту тим, що як компонент зерна вівса використовують борошенеця вівса, яке обробляють бікарбонатним буферним розчином при $\text{pH} = 7,0-11,0$, відокремлюють осад і фракціонують білків 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 борошенеця вівса в якості компонента зерна вівса;
- умови екстрагування;
- очищення білку афінною хроматографією.

Причино-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак і досягнення технологічного результату можна пояснити наступним: вилучення інгібітору панкреатичної α -амілази з максимальною антиамілолітичною активністю базується на досягненні максимального ступеню очищення інгібітору за рахунок використання найбільш ефективного специфічного екстрагенту - бікарбонатного буферу, подвійного використання неорганічних (тобто, більш фізіологічних) реактивів та найбільш ефективної афінної хроматографії, в основу якої покладена спорідненість інгібітору до ферменту.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Борошенеця вівса попередньо знежирюють 10-ма об'ємами петролейного ефіру в апараті Сокслета. Екстракцію інгібітора панкреатичної амілази

з борошенеця вівса проведено 0,1М бікарбонатним буфером, $\text{pH} 7,0 - 11,0$, який містить 0,15М NaCl (гідромодуль 5) при постійному перемішуванні на магнітній мішалці (число обертів 5000об/хв) при кімнатній температурі протягом 1 години. Осад відокремлюють від супернатанту за допомогою центрифугування при швидкості 8000 обертів за хвилину впродовж 20 хвилин. Фракціонування супернатанту проводять сульфатом амоніаку з масовими концентраціями солі між 40 і 75%. Отриманий осад розчинюють у дистильованій воді. Суспензію білку поміщають в пористу мембрану і діалізують проти 500мл дистильованої води впродовж 3 днів. Отриманий зразок центрифугують при 5000об/хв впродовж 30 хвилин.

Супернатант піддають афінній хроматографії. Супернатант наносять на колонку (1x15см) з сорбентом: панкреатична амілаза - сефароза 4В зі швидкістю 15мл/год. Після закінчення насичення сорбенту, яке контролюють за появою в фільтраті інгібіторної активності по відношенню до тваринної α -амілази, гель промивають 0,05М трис/HCl буфером, $\text{pH} = 8,0$. Потім гель в колонці промивають послідовно 1М розчином NaCl та 8М сечовиною в 0,05М трис/HCl буфері, $\text{pH} = 8,0$. Десорбцію інгібітора проводять 10^{-3} М розчином HCl. Активну фракцію нейтралізують до $\text{pH} = 8,0$ 1М розчином NaOH й ліофільно висушують. Активність інгібітору складає 38%.

Приклад 1. Борошенеця вівса попередньо знежирюють 10-ма об'ємами петролейного ефіру в апараті Сокслета. До 100г борошенеця вівса додають 500мл 0,1М бікарбонатного буферу, $\text{pH} 9,2$, який містить 0,15М NaCl. Екстракцію проводять при постійному перемішуванні на магнітній мішалці (число обертів 5000об/хв) при кімнатній температурі впродовж 1 години. Осад відокремлюють за допомогою центрифугування при швидкості 8000об/хв впродовж 20 хвилин. До екстракту додають 11,56г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Осад відокремлюють центрифугуванням, до супернатанту додають 19,08г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, осад відокремлюють центрифугуванням. До одержаного осаду додають 30мл дистильованої води. Суспензію білку поміщають в пористу мембрану і діалізують проти 500мл дистильованої води впродовж 3 днів. Проводять афінну хроматографію на колонку (1x15см) з сорбентом: панкреатична амілаза - сефароза 4В наносять супернатант зі швидкістю 15мл/хв. Після закінчення насичення сорбенту, яке контролюють за появою в фільтраті інгібіторної активності по відношенню до тваринної α -амілази, гель промивають 0,05М трис/HCl буфером, $\text{pH} = 8,0$ (50мл). Потім гель в колонці промивають послідовно 1М розчином NaCl (20мл) та 8М сечовиною в 0,05М трис/HCl буфері, $\text{pH} = 8,0$ (32мл). Десорбцію інгібітора проводять 10^{-3} М розчином HCl (80мл). Активну фракцію нейтралізують до $\text{pH} = 8,0$ 1М розчином NaOH й ліофільно висушують.

Приклад 2. Здійснюють аналогічно прикладу 1, але екстракцію проводять бікарбонатним буфером з діапазоном pH середовища 7,0-11,0. Отримані дані наведені в таблиці.

Таблиця

Вплив рН бікарбонатного буферу на антиаміолітичну активність інгібітору

рН бікарбонатного буферу	Активність інгібітору амілази, %
7,0	28,5
8,0	35
9,2	38
10,0	33,8
11,0	28

Як видно з даних, наведених в таблиці, оптимальне значення рН є 9,2, при цьому екстрагується

білок з найбільшою інгібіторною активністю по відношенню до панкреатичної α -амілази.