



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16992 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A61K 36/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО КОМПЛЕКСУ З НАСІННЯ ЛЬОНУ

1

2

(21) u200600146

(22) 05.01.2006

(24) 15.09.2006

(46) 15.09.2006, Бюл. № 9, 2006 р.

(72) Черно Наталія Кирилівна, Лось Ольга  
Олександрівна(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ  
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

(57) 1. Спосіб отримання біологічно активного  
комплексу з насіння льону, який полягає в  
екстракції водою подрібненого насіння льону,  
фільтрації, центрифугуванні, діалізі, концентрації,  
який **відрізняється** тим, що перед екстракцією  
насіння льону водою попередньо проводять його  
знежирення гексаном або етиловим ефіром

протягом 8-12 годин, далі ведуть трикратну  
обробку знежиреного залишку 75-85 %- ним  
етанолом (співвідношення твердого матеріалу і  
розчинника 1:20) при температурі 70-80 °С по 30  
хв., після чого його обробляють панкреатином і  
проводять трикратну екстракцію водою  
(співвідношення твердого матеріалу і води 1:20)  
при температурі екстракції 40-60 °С по 15-30 хв.,  
після чого екстракти об'єднують, діалізують,  
висушують у вакуум-ротаційному випарнику при  
температурі 50-60 °С до вмісту вологи 5-10 %.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що  
центрифугування проводять при частоті обертів  
5000 об/хв. протягом 10-20 хв.

Корисна модель відноситься до області  
харчової біотехнології, а саме до отримання  
біологічно активних речовин і може бути  
використана для отримання біологічно активного  
комплексу вуглеводної природи, що проявляє  
інгібіторну активність відносно травних  
протеолітичних ферментів, таких як трипсин,  
хімотрипсин, пепсин і ін.

В медицині відомий спосіб отримання слизів з  
насіння льону [1] в якому не подрібнене насіння  
льону обливають холодною водою, одразу  
додають гарячу воду (близько 95°C) у  
співвідношенні 1:30 і збовтують протягом 15хв.,  
проціджують через тканину.

Також в медицині відомий спосіб отримання  
водних витяжок з насіння льону [2], в якому 2 чайні  
ложки насіння льону заливають 1 стаканом  
киплячої води, кип'ятять на "водяній бані"  
протягом 10 хв, проціджують.

Недоліками даних способів є маленький вихід  
слизистих речовин; відсутність строку зберігання,  
оскільки застосовувати такі витяжки  
рекомендується одразу ж після приготування.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб  
виділення водорозчинних полісахаридів з насіння  
льону [3], який включає екстракцію водою  
подрібненого насіння льону при температурі 85°C  
протягом 3 годин з гідромодулем рівним 25,

фільтрацію через нейлонову тканину,  
центрифугування при частоті обертів рівним 8000  
об/хв протягом 30хв. при температурі 4°C, діаліз  
за допомогою целофану протягом 96 годин при  
температурі 4°C, концентрацію під вакуумом при  
температурі 60°C.

Проте приведений спосіб має ряд недоліків.  
Відсутність попереднього знежирення насіння  
льону (рослинна сировина з високим вмістом жиру  
- порядку 30-40%) негативно позначається на  
повноті вилучення водорозчинних полісахаридів і  
їх якісному складі. Тривалий час і висока  
температура екстракції водою призводить до зміни  
будови (термічної деструкції) водорозчинних  
полісахаридів і переходу в екстракт небажаних  
супутніх компонентів білкової і фенольної  
природи, які згодом не видаляються. Перераховані  
недоліки призводять до зниження інгібіторної  
активності водорозчинних полісахаридів відносно  
протеолітичних ферментів.

У основу корисної моделі покладена задача  
отримання біологічно активного комплексу  
вуглеводної природи з насіння льону, що має  
інгібіторну активність відносно травних  
протеолітичних ферментів.

Поставлена задача досягається тим, що у  
способі отримання біологічно активного комплексу  
з насіння льону, що полягає в екстракції водою

(19) UA (11) 16992 (13) U

подрібненого насіння льону, фільтрації через нейлонову тканину, центрифугуванні екстракту, діалізі, концентрації під вакуумом проводять попереднє знежирення гексаном або діетиловим ефіром подрібненого насіння льону протягом 8-12 годин і три кратну обробку 75-85%-ним етанолом протягом 30хв. при температурі 70-80°C (співвідношення твердого матеріалу і розчинника 1:20), після нагрівання дають витягці відстоятися 10-15хв. і фільтрують через пористий скляний фільтр. Обробку спиртом проводять з метою видалення спирторозчинних моно- і олігосахаридів, а також речовин фенольної природи - небажаних домішок, здатних переходити у водний екстракт. Оброблений спиртом матеріал висушують в сушильній шафі при температурі 40-50°C для видалення спирту. Для видалення білкової складової знежирений і оброблений спиртом залишок піддають ферментативній обробці панкреатином (рН=8,4). Після ферментативної обробки насіння льону піддають три кратній екстракції водою при температурі екстракції 40-60°C по 15-30хв., при цьому в розчин переходять малорухливі вуглеводи - водорозчинні полісахариди. Після фільтрації через сито d=635 мкм екстракт центрифугують при частоті обертів 5000 об/хв протягом 10-20хв. Після діалізу центрифугат висушують у вакуум-ротаційному випарнику при температурі 50-60°C до вмісту вологи в матеріалі 5-10%.

Заявлений спосіб виконується таким чином (Приклад 1).

Насіння льону подрібнюється у лабораторному млині. 10г подрібненого насіння (узятого з точністю до 0,0001г) поміщають в паперовий пакетик з фільтрувального паперу. Пакетик з матеріалом поміщають в екстрактор апарату Сокслета. Екстракцію проводять гексаном або етиловим ефіром протягом 10 годин. Після екстракції пакетик кладуть в бюкс і видаляють розчинник в сушильній шафі при температурі 105°C. Висушений знежирений матеріал поміщають у круглодонну колбу, заливають 80%-ним етиловим спиртом (20мл спирту на 1г сухої речовини) і нагрівають на водяній бані зі зворотнім холодильником при температурі 75°C протягом 30хв. Після нагрівання дають витягці відстоятися 12хв. і фільтрують через пористий скляний фільтр.

Після фільтрації залишок з фільтру переносять в колбу, в якій проводилася обробка. Обробку сировини спиртом повторюють три рази. Після трьох обробок матеріалу спиртом при температурі 75°C спирторозчинні моно- і олігосахариди, а також речовини фенольної природи вилучаються повністю. Оброблений спиртом матеріал звільняють від спирту, висушуючи фільтр в сушильній шафі при температурі 45°C. Знежирений і оброблений спиртом залишок переносять в колбу на 100-200мл, додають 25мл цитратного буферу з рН=8,4, нагрітого в термостаті до температури 37°C і 25мг панкреатину, збовтують і витримують в термостаті при температурі 37°C протягом 3 год. Після інкубації матеріал фільтрують через пористий фільтр і висушують в сушильній шафі при температурі 45°C. Залишок після ферментативної обробки переносять в круглодонну колбу і екстрагують 3 рази водою зі зворотнім холодильником при температурі 50°C по 22хв. При цьому в екстракт переходять водорозчинні полісахариди. При температурі вище 60°C відбуваються зміни в будові водорозчинних полісахаридів насіння льону, за рахунок чого відбувається різке зниження їх інгібіторної активності на 15-20%, при температурі нижче 40°C - знижується вихід водорозчинних полісахаридів до 3-5% при збільшенні їх інгібіторної активності всього на 2-3%. Екстракти об'єднують і фільтрують через одне і теж нейлонове сито з діаметром отворів 635 мкм. Після фільтрації екстракт охолоджують до температури 4°C і центрифугують в лабораторній центрифугі при частоті обертів 5000 об/хв протягом 15хв. Параметри центрифугування були одержані в результаті оптимізації даного процесу, критерієм оптимізації служила інгібіторна активність екстракту. Діаліз проводять через целофан при температурі 4°C протягом 96 годин. Після діалізу екстракт висушують у вакуум-ротаційному випарнику при температурі 55°C до вмісту вологи близько 7%.

Одержаний даним способом біологічно активний комплекс має наступний хімічний склад, представлений в Табл.1.

Приклади 2 і 3 виконуються аналогічно прикладу 1. У прикладі 2 брали мінімальні значення заявлені у формулі корисної моделі, у прикладі 3 брали максимальні заявлені значення.

Таблиця 1

Хімічний склад біологічно активного комплексу з насіння льону, %

	Найближчий аналог	Приклад 2	Приклад 1.	Приклад 3
Вихід слизистих речовин, %	7,8-8,3	6,3-6,7	9,5-9,8	10,8-11,2
Вологість, %	5,1-5,4	6,5-7,5	6,3-7,3	6,3-7,3
Вуглеводи, %	84,7-86,4	90,5-89,1	90,2-89,0	89,3-87,9
Білок, %	4,8-5,8	0,001	0,001	0,001
Зола, %	3,6-4,1	3,0-3,4	3,5-3,7	4,4-4,8

Моносахаридний склад вуглеводної складової

представлений в Табл.2.

Таблиця 2

Моносахаридний склад водорозчинних полісахаридів біологічно активного комплексу з насіння льону, % співвідношення

Моносахариди	Найближчий аналог	Приклад 2	Приклад 1	Приклад 3
Рамноза	4,4-7,9	5,2-5,4	5,0-5,3	4,8-5,6
Фукоза	2,1-3,7	2,0-2,2	1,8-2,1	1,9-2,3
Арабіноза	8,9-9,7	10,5-12,1	11,0-12,8	11,3-13,6
Ксілоза	32,6-33,1	26,9-28,1	27,0-29,3	30,2-30,8
Галактоза	13,3-14,1	13,7-16,2	14,8-16,7	15,6-18,5
Глюкоза	3,7-4,2	4,3-5,4	4,2-5,2	3,8-4,7
Галактуронова кислота	28,6-33,7	33,7-37,4	32,5-35,3	28,3-28,6

Інгібіторну активність біологічно активного комплексу відносно протеолітичних ферментів (трипсину, хімотрипсину) визначають по різниці ступеня розщеплення казеїну одним ферментом (протеолітична активність ферменту без додавання біологічно активного комплексу - ПА1) і ферментом з додаванням біологічно активного комплексу (протеолітична активність ферменту з додаванням біологічно активного комплексу при співвідношенні маси ферменту і біологічно активного комплексу 1:10 - ПА2), як еталон порівняння використовують фармацевтичний препарат контрикал:

$$IA = (PA1 - PA2) * 100 / PA1.$$

Протеолітичну активність визначають модифікованим методом Ансона. Визначення проводять таким чином. В пробірку, що містить 1мл ферментного розчину (0,1-0,5мг ферменту в натрій фосфатному буфері pH=7,4), через 5хв. інкубації при 37°C додають 2мл 2%-ного розчину казеїну у тому ж буферному розчині, доводять дистильованою водою до 4мл, струшують і інкубують при 37°C протягом 20хв. (час гідролізу казеїну). Після закінчення інкубації вносять 5мл 5%-ного розчину трихлороцтової кислоти, перемішують і витримують 20хв. при 37°C. В контрольній пробі до 1мл ферментного розчину додають 5мл розчину трихлороцтової кислоти і потім 2мл розчину казеїну. Контрольну і дослідну проби центрифугують протягом 5хв. при 5000 об/хв і фільтрують через паперовий фільтр в сухі пробірки. Для визначення відбирають 1мл прозорого фільтрату, додають 5мл 0,5 н розчину  $Na_2CO_3$  і 1мл робочого розчину реактиву Фоліна. Через 20хв. визначають оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі  $\lambda=670$  нм.

Протеолітичну активність (ПА) виражають числом протеолітичних одиниць на 1г ферменту і розраховують по формулі:

$$PA = (D * 4) / (T * 20 * m), \text{ де}$$

D - оптична густина дослідного розчину відносно контрольного;

4 - об'єм суміші, мл;

TE - тирозиновий еквівалент - оптична густина 1 мкмоль тирозину в 1 мл;

20 - час інкубації, хв;

m - маса ферменту, г.

Результати дослідження інгібіторної активності біологічно активних комплексів із насіння льону представлені в Табл.3.

Одержаний таким чином біологічно активний комплекс відповідає поставленій задачі, а саме має інгібіторну активність відносно травних протеолітичних ферментів і може бути використаний в лікувально-профілактичному харчуванні населення України, як в самостійному вигляді, так і у складі біологічно активних добавок і харчових продуктів, для корекції патологічних станів пов'язаних з підвищеною активністю травних протеолітичних ферментів.

Використана література.

1. Т.П. Гарник, Т.В. Ковальчук, р.С. Коритнюк і др. До питання ефективності водних витяжок з лікарської рослинної сировини // Фітотерапія в Україні - №1-2, 1999. - С.51-53.

2. Биологически активные добавки к пище. Полная энциклопедия / СоСт.Н.А. Натарева. - СПб.: ИД «ВЕСЬ», 2001. - С.60-61.

3. КапрельянцЛ.В., Швеи Н.А., Столярова Т. Водорастворимые полисахариды семян льна // Наукові праці ОДАХТ - вип. 24 - С.146-150.

Таблиця 3

Вплив біологічно активного комплексу з насіння льону на активність трипсину і хімотрипсину порівняно з контрикалом

Фермент	Препарат	Відношення сухих речовин препарату: фермент*	Інгібіторна активність, %
Трипсин	найближчий аналог	10:1	24
	2		53
	1		51
	3		46
	контрикал		98
Хімотрипсин	найближчий аналог	10:1	21
	2		48
	1		45
	3		43
	контрикал		97

\* - визначено дослідним шляхом і є оптимальним.

