



УКРАЇНА

(19) UA (11) 71103 (13) A

(51) 7 A61K33/18,A23J3/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЙОДУВАННЯ ОРГАНІЧНИХ МОЛЕКУЛ

1

(21) 2003054493

(22) 20.05.2003

(24) 15.11.2004

(46) 15.11.2004, Бюл. № 11, 2004 р.

(72) Кременчуцький Геннадій Миколайович, Вальчук Сергій Іванович, Риженко Сергій Анатолійович

(73) Кременчуцький Геннадій Миколайович, Вальчук Сергій Іванович, Риженко Сергій Анатолійович

(57) 1. Спосіб йодування органічних молекул, який відрізняється тим, що в рідке середовище, наприклад у воду або фізіологічний розчин, вводять мікроорганізми з KI-пероксидазною активністю в концентрації 1×10^6 - 1×10^{12} кл/мл, біологічне джерело - водню пероксид або хімічний водню пероксид, до кінцевої концентрації від 6 до 1000 мкМ H_2O_2 і органічні молекули, наприклад тирозин, гістидин, казеїн, отриману суміш інкубують при $15^\circ C$ - $40^\circ C$ протягом 8-72 годин.

2. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що як мікроорганізми з KI-пероксидазною активністю використовують представників родів бактерій Aereococcus або Pediococcus.

2

3. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що як біологічне джерело водню пероксиду використовують мікроорганізми та/або субстрати, що окислюються ними, наприклад молочну кислоту, а-гліцерофосфат, піруват, глюкозу.

4. Спосіб за п.3, який відрізняється тим, що використовують мікроорганізми родів Streptococcus, Aureobasidium, Pediococcus, Aereococcus.

5. Спосіб йодування органічних молекул, який відрізняється тим, що в організм як пробіотики перорально вводять мікроорганізми з KI-пероксидазною активністю в дозуванні 1-5 доз на прийом 3 рази на день протягом 3-14 днів спільно з фізіологічними дозами йодного калію, йодного натрію або білкових сполук йоду у вигляді препаратів.

6. Спосіб за п.5, який відрізняється тим, що вказана фізіологічна доза складає від 50 до 400 мкг на день.

7. Спосіб за п.5 або 6, який відрізняється тим, що як мікроорганізми з KI-пероксидазною активністю використовують представників родів бактерій Aereococcus або Pediococcus.

Винахід відноситься до медицини і біотехнології і стосується варіантів способу йодування органічних молекул "in vivo" і "in vitro".

Терміном "йододефіцитні захворювання" (ЙДЗ) називають різні патологічні процеси, що вражають великі групи населення (Hetzel, 1983). Зоб, найбільш очевидний клінічний вияв йодного дефіциту в окремих людей, відомий дуже давно, а збагачення дієти додатковою кількістю йоду у вигляді морських водоростей для швидкого лікування зобу практикувалося китайськими лікарями ще до Різдва Христового. Проте тільки в нашому сторіччі учені, що займаються питаннями харчування, почали систематично вивчати цю проблему і з'ясували фундаментальне значення йоду для здоров'я і розвитку людини. В останнє десятиріччя вдалося отримати більш реальне уявлення як про спектр патологічних станів, що викликаються в людини йодною недостатністю, так і про багатомільйонні жертви цієї форми порушення харчування

у всьому світі (WHO, 1991).

ЙДЗ виникають там, де в навколишньому середовищі міститься мало йоду і де населення одержує недостатню його кількість із звичними продуктами харчування і напоями. Кількість людей, уражених зобом, оцінюється в 655 мільйонів, а число страждаючих явним кретинізмом перевищує 11 мільйонів. Таке велике число осіб з явними порушеннями робить йодну недостатність однією з самих найважливіших світових проблем, пов'язаних з харчуванням населення.

Принада йодної недостатності в людини відносно проста. Вона розвивається там, де в ґрунті мало йоду, місцеві харчові продукти містять недостатню кількість цього елемента, і люди не одержують йод додатково. Звідси слідує і простий шлях розв'язання проблеми - додавання йоду. Основний метод забезпечення великих груп населення додатковою кількістю йоду - це йодування солі.

В деяких віддалених районах з важкою йод-

(13) A

(11) 71103

(19) UA

ною недостатністю, де доставка йодованої солі вимагає довгого часу, швидкої профілактики неврологічних порушень в майбутнього покоління можна добитися шляхом введення всім жінкам дітородною віку препарату йодованого масла (Pharoah & Connolly, 1987; Thilly et al., 1994). Інфекційні хвороби не є важливою причиною ІДЗ. Основними їх причинами служать недостатня увага до йодних потреб і відсутність багатих або збагачених йодом продуктів харчування.

Вживання йодованої питної води стало альтернативним методом забезпечення організму людини йодом. Цей метод має перевагу перед іншими, що використовують йодовані продукти, наприклад йодовану сіль, оскільки при приготуванні гарячої їжі з використанням йодованої солі втрачається 60% йоду. Багатьом людям за станом здоров'я обмежується споживання куховарської солі, що вимагає заміни її в щоденному раціоні. Особливо, важливо забезпечити організм йодом під час хвороби. Хвора людина часто відмовляється від їжі, але з задоволенням і у великих кількостях, вживає напої. Тому, поповнення організму йодом з питною водою зручно і надійно. Багато учених і спеціалізовані інститути затверджують, що "Одним з таких заходів по усуненню недовліку йоду може бути йодування питної води до фізіологічно нормальних концентрацій цього елемента (Водні ресурси, том 25, 1998г., с.57-61, В.К. Кашин).

Механізм обробки питної води багатоатомними позитивно зарядженими йонами йоду був ретельно вивчений, і ефективність даного процесу підтверджена.

Загальноприйнята профілактична доза йоду для людини встановлена на рівні 150-200мкг в добу, але на більшій частині України і близько 70% території Росії вона не реалізується. Це пов'язано з багатьма чинниками і, перш за все, з недостатнім асортиментом повсякденних йодопродуктів. Застосування в денному раціоні людини питної йодованої води дозволяє розширити наші можливості в боротьбі з дефіцитом йоду. Концентрація йоду в йодованій воді повинна встановлюватися з урахуванням особливостей конкретного регіону її споживання і не повинна перевищувати в столовій питній воді (напоях) 1мг/л.

Позитивними якостями продукту явилися: простота і надійність його використання, неможливість передозування йоду, добра і стабільна біологічна активність при малих концентраціях.

Клінічні показники свідчать, що брак йоду в ранньому віці супроводиться мозковими порушеннями, що виявляються олігофренією або кретинізмом. В більш легких випадках діти не справляються з шкільною програмою і вимушені навчатися в класах вирівнювання. В підлітковому віці по критеріях фізичного і розумового розвитку багато хлопців признаються непридатними для служби в армії. В дівчат наголошуються порушення дітородної функції. Розв'язання даної проблеми можливо через реалізацію програм штучного збагачення йодом продуктів харчування масового попиту.

Обов'язковому йодуванню повинні піддаватися - сіль, молоко, мука, хліб, макаронні вироби, продукти дитячого харчування. До природної (фоно-

вої) величини слідє підняти вміст йоду в яйці птаха, рослинних жирах, мороженому, прохолоджувальних напоях, мінеральній воді. Необхідно передбачити можливість виробництва мінеральних добрив, що містять йод.

При збагаченні йодом продуктів харчування масового попиту існує дві можливості: використовувати мінеральні хімічні з'єднання йоду (калію йодид - KJ або калію йодат - KJO₃), або звернутися до органічних сполук йоду, частіше всього йодказеїну. Калію йодид (йодний калій) і калію йодат - мінеральне хімічне сполучення йоду, в процесі виробництва продукції збагатила йодом не зазнають яких - або хімічних змін, поступаючи в організм в незвичному для нього «рафінованому» вигляді. В процесі еволюції організм людини не зустрічався з хімічно чистими сполученнями йоду і не виробив проти них захисту. Тому мінеральні хімічні сполучення йоду, швидко і повністю всмоктуються в кишечнику незалежно від ступеня йодної недостатності конкретної людини. Вже через деякий час весь мінеральний йод, що всмоктався, поступає в щитовидну залозу. Це може привести до надмірного накопичення йоду в щитовидній залозі (передозування), що серйозно порушує її функцію. Є численні клінічні підтвердження того, що передозування йоду може повністю блокувати функцію щитовидної залози, викликаючи важку патологію.

Тому від використання мінеральних препаратів йоду для збагачення харчових продуктів в даний час відмовилися (виключення складає куховарська сіль, збагачена йодатом калію).

Відомі способи збагачення харчових продуктів, що полягають у введенні в продукт добавки, що спочатку містить органічно зв'язаний йод, у вигляді хімічного комплексу з білком, наприклад, білком молока - казеїном. (См., наприклад заявку України, 2001021088 (PCT/RU00/00230) опубл. 17.09.2001, бюл.8).

На відміну від мінерального йоду, засвоєння організмом його органічних сполук, в яких йод знаходиться в зв'язаному стані з тваринними або рослинними білками, відбувається строго індивідуально, залежно від ступеня йодної недостатності конкретної людини. Спеціальними дослідженнями показано, що засвоєння організмом йодованих білків супроводиться відщеплюванням від них йоду під дією спеціальних ферментів. Активність цих ферментів знаходиться в прямій залежності від ступеня йодної недостатності організму і дозволяє засвоювати строго необхідну для конкретної людини кількість йоду. Передозування органічних сполук йоду виключено, оскільки їх зайва кількість просто виводиться з організму.

У зв'язку з цим існує необхідність в розробці способів йодування органічних молекул.

З патенту RU, 2134520, 20.08.99 відомий спосіб йодування органічних молекул, який є найбільш близьким до запропонованої групи винаходів. Як органічні молекули використовують тваринні та/або рослинні білки, та/або білки мікробіологічного походження або амінокислоти, отримані з них. Йодування здійснюють ферментативним шляхом з використанням рослинної або тиреоїдної пероксидази.

Вказаний спосіб вирішує проблему трансформції мінерального йоду, використовуюваного для збагачення продуктів харчування в органічний йод, безпосередньо в процесі виробництва йодованих продуктів.

Проте, здійснення йодування елементів з використанням рослинної або тиреоїдної пероксидази є трудомістким і дорогим. В основу групи винаходів поставлена задача вдосконалити відомий спосіб йодування органічних молекул шляхом використання як ферментів пероксидази мікроорганізмів, що дозволить зробити спосіб менш трудомістким і здешевить його.

При цьому іон йоду з йодного калію або інших продуктів, що містять йод, хімічно зв'язується з органічними молекулами збагаченого йодом продукту, утворюючи стійкі комплекси, здатні включатися в обмін речовин під час потрапляння до макроорганізму.

Йодування органічних молекул може бути здійснено як "in vitro", так і "in vivo".

Згідно першому варіанту спосіб йодування органічних молекул полягає в тому, що в певний об'єм рідкого середовища, наприклад у воду або фізіологічний розчин, вводять мікроорганізми з К_Т-пероксидазною активністю в концентрації 1×10^6 - 1×10^{12} кл/мл, біологічне джерело водню пероксида або хімічний водню пероксид до кінцевої концентрації від 6 до 1000 мкМ H₂O₂ і органічні молекули, наприклад, тирозин, гистидин, казеїн, отриману суміш інкубують при 15°C-40°C протягом 8-72 годин.

При цьому доцільно використовувати як мікроорганізми з К_Т-пероксидазною активністю представників родів бактерій *Aerococcus* або *Pediococcus*.

Як біологічне джерело водню пероксид вико-

ристовують мікроорганізми та/або субстрати, що окислюються ними, наприклад, молочну кислоту α -гліцерофосфат, піруват, глюкозу. Мікроорганізми бактерій родів *Streptococcus*, *Aureobasidium*, *Pediococcus*, *Aerococcus* дуже добре підходять для цих цілей.

Згідно другому варіанту спосіб йодування органічних молекул полягає в тому, що в організм як пробіотики перорально вводять мікроорганізми з К_Т-пероксидазною активністю в дозуванні 1-5 доз на прийом 3 рази на день протягом 3-14 днів спільно з фізіологічними дозами йодного калію, йодного натрію, або білкових сполучень йоду у вигляді препаратів.

Частіше всього вказана фізіологічна доза складає від 50 до 400 мкг на день.

Як і в першому варіанті, як мікроорганізми з К_Т-пероксидазною активністю використовують представників родів бактерій *Aerococcus* або *Pediococcus*. Саме цим мікроорганізмам притаманна пероксидазна активність, одночасно із здатністю утворювати водню пероксид при окисленні різноманітних субстратів.

Можливість здійснення винаходів підтверджується прикладами.

Результати йодування органічних молекул in vitro за допомогою *Aerococcus veridans* наведені в таблиці 1. У всіх випадках в 3л фізіологічного розчину NaCl вводили мікроорганізми *Aerococcus veridans* в концентрації 1×10^2 - 1×10^{18} кл/мл, які одночасно служили джерелом водню пероксида, і органічні молекули казеїну. Суміш інкубувалася при 18°C-22°C протягом 48 годин. На кінцевій стадії одержували кінцевий продукт у вигляді йодованих органічних молекул.

Таблиця 1

Ступінь йодування органічних молекул % "in vitro"

Концентрація бактерійних кліток <i>Aerococcus veridans</i>				
10^2	10^6	10^8	10^{12}	10^{18}
Відсоток йодованих органічних молекул				
12%	16%	80%	100%	100%

Результати йодування органічних молекул in vitro за допомогою *Pediococcus damnosus* наведені в таблиці 2. У всіх випадках в 3л води вводили мікроорганізми *Pediococcus damnosus* в концентрації їх 1×10^2 - 1×10^{18} кл/мл, які одночасно служили

джерелом водню пероксида, і органічні молекули казеїну. Суміш інкубувалася при 40°C -45°C протягом 36 годин. На кінцевій стадії інкубації одержували кінцевий продукт у вигляді йодованих органічних молекул.

Таблиця 2

Ступінь йодування органічних молекул % "in vitro"

Концентрація бактерійних кліток <i>Pediococcus damnosus</i>				
10^2	10^6	10^8	10^{12}	10^{18}
Відсоток йодованих органічних молекул				
10,5%	14%	75%	100%	100%

Результати йодування органічних молекул in vivo з використанням *Aerococcus veridans* наведені в таблиці 3. У всіх випадках в організм групи хво-

рих (10 чоловіків, вік 23-45 років) перорально вводили мікроорганізми *Aerococcus veridans* у вигляді пробіотиків в дозуванні 2 дози на прийом 3 рази на

день протягом 10 днів спільно з фізіологічними дозами препарату Йодактив в дозі від 150мкг в день. Йодування органічних молекул починалося з

ротової порожнини і продовжувалося в кишечнику. Періодично визначалася концентрація йодних сполучень органічних молекул в крові.

Таблиця 3

Ступінь йодування органічних молекул % "in vitro" (мікроорганізм *Aerococcus viridans*)

Концентрація йодосодержащих препаратів мкг/мл				
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Відсоток йодування органічних молекул				
1,1%	1,5%	8,0%	10,0%	10,0%

Результати йодування органічних молекул in vivo з використанням *Pediococcus damnosus* наведені в таблиці 4. В організм групи хворих (10 чоловіків, вік 23-45 років) перорально вводили мікроорганізми *Pediococcus damnosus* у вигляді пробіотиків в дозуванні 3 дози на прийом 3 рази на

день протягом 7 днів спільно з фізіологічними дозами препарату Біойод в дозі від 150мкг в день. Йодування органічних молекул починалося з ротової порожнини і продовжувалося в кишечнику. Періодично визначалася концентрація йодних сполучень органічних молекул в крові.

Таблиця 4

Ступінь йодування органічних молекул % "in vitro" (мікроорганізм *Pediococcus damnosus*)

Концентрація йодосодержащих препаратів мкг/мл				
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Відсоток йодування органічних молекул				
1,2%	1,7%	9,0%	10,0%	10,0%