



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **83942** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61K 31/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 02680	(72) Винахідник(и): Черно Наталія Кирилівна (UA), Гураль Лариса Сергіївна (UA), Ломака Олена Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 04.03.2013	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2013, Бюл.№ 19	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСУ БРОМЕЛАЙНУ З АРАБІНОГАЛАКТАНОМ

(57) Реферат:

Спосіб одержання комплексу бромелайну з арабіногалактаном включає приготування водних розчинів з масовою часткою бромелайну від 0,1 до 1,0 % та арабіногалактану від 0,1 до 2,5 %, змішування отриманих водних розчинів при співвідношенні (1-2):(2:1), витримування суміші протягом 15-60 хв при 20-35 °С і наступне сушіння при 30-60 °С.

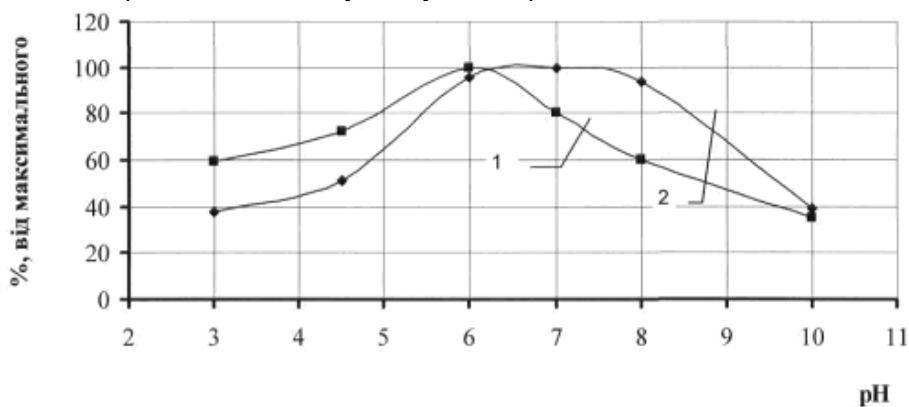


Fig. 1

UA 83942 U

Корисна модель належить до харчової промисловості, зокрема до способу одержання комплексу бромелайну з арабіногалактаном, який має протеолітичну активність. Даний комплекс може бути використано як дієтична добавка.

Відома дієтична добавка, що містить у складі арабіногалактан із дигідрокверцетином та аскорбіною кислотою - препарат Діквертокс. За рахунок такого компонентного складу препарат має комплексний механізм захисної дії при грипі та ГРВІ, у тому числі імуностимулюючу, і ангіопротекторну дію. Останнє особливо важливо у випадку грипозної інфекції, оскільки головною ланкою в патогенезі грипу є ураження судинної системи, що приводить до геморагічних проявів та набряку легень (Заявка РФ на изобретение № 2008135221/15).

Відомий також наноструктурований напівсинтетичний гепариноід - "Агсулар", що представляє собою сульфатований арабіногалактан у вигляді калієвої солі. Препарат є антикоагулянтом прямої дії і гіполіпідемічним засобом. "Агсулар" володіє не тільки гіполіпідемічною дією, а й антиатеросклеротичним ефектом, що полягає в профілактиці утворення атеросклеротичних бляшок в аорті (Заявка РФ на изобретение № 2008738075) Одержують сульфатований похідний арабіногалактан шляхом взаємодії арабіногалактану в диметилсульфоксиді при співвідношенні 1:3 із сульфатуючим агентом - комплексом SO_3 -диметилформамід із концентрацією SO_3 18 %. Спосіб проводять при безперервному перемішуванні і постійній температурі 20 °С протягом 30 хв. Після цього реакційну суміш нейтралізували 10 % водним розчином КОН і висаджували в етиловий спирт. Отриману сіль сульфатованого похідного арабіногалактану очищали діалізом проти дистильованої води. Потім розчин упарювали до мінімального об'єму і осаджували етиловим спиртом.

1 г арабіногалактану розчиняли при перемішуванні в 3 мл диметилсульфоксиді, потім добавляли 10 мл комплексу SO_3 - диметилформамід із концентрацією SO_3 18 %. Сульфатування проводили при інтенсивному перемішуванні при $t=20$ °С протягом 30 хв. Після цього реакційну суміш нейтралізували 17 мл 10 % водного розчину $\text{Ca}(\text{OH})_2$, осаджуючи в 500 мл етилового спирту. Отриманий осад фільтрували на скляному фільтрі № 40, розчиняли в 50 мл дистильованої води і проводили діаліз проти дистильованої води протягом 6 діб. Розчин упарювали до 30 мл і осаджували в 150 мл етилового спирту. Вихід отриманого продукту склав 98 %.

Окрім цього, відомий комплекс ніфедипіну з арабіногалактаном (див. патент РФ № 2391980). Комплекс ніфедипіну (диметиловий ефір 2,6-диметил-4-(2'-нітрофеніл)-1,4-дигідропіридин-3,5-дикарбонової кислоти) з полісахаридом арабіногалактаном, отримували методом механохімічної активації у планетарному млині (при прискоренні 60g); суміш твердих компонентів при ваговому співвідношенні ніфедипін:арабіногалактан 1:(10-40).

Але відомий комплекс не має протеолітичної активності.

З науково-технічної і патентної літератури заявнику невідомо комплекс бромелайну з арабіногалактаном, а також спосіб його одержання.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб одержання раніше невідомого комплексу бромелайну з арабіногалактаном, який має протеолітичну активність.

Поставлена задача вирішена способом одержання комплексу бромелайну з арабіногалактаном сосни *Pinus silvestris*, що включає приготування водних розчинів з масовою часткою бромелайну від 0,1 до 1,0 % та арабіногалактану від 0,1 до 2,5 %, змішування отриманих водних розчинів при співвідношенні (1-2):(2:1), витримання суміші протягом 15-60 хв при 20-35 °С і наступне сушіння при 30-60 °С.

Як в Україні так і за її межами такий комплекс з протеолітичною активністю та спосіб його одержання не описано.

Комплекс арабіногалактану з протеолітичним ферментом бромелайном одержували, варіюючи масову частку бромелайну в розчині від 0,1 до 1,0 %, арабіногалактану - від 0,1 до 2,5 % при співвідношенні об'ємів водних розчинів ферменту та полісахариду (1-2):(2:1), при $t=20-35$ °С. Отримані зразки висушували. Для визначення тривалості процесу комплексоутворення контролювали активність ферменту в складі комплексу через кожні 15 хвилин протягом години.

Арабіногалактан одержували біотехнологічним способом із тирси сосни *Pinus silvestris*.

Приклад.

Готували 0,5 %-ні розчини арабіногалактану й бромелайну шляхом розчинення наважок у дистильованій воді при 22 °С і перемішуванні. До розчину арабіногалактану 100 см³ додавали при перемішуванні 100 см³ розчин бромелайну. Суміш витримували при температурі 22 °С протягом 30 хвилин. Комплекс висушували при температурі 40 °С, використовуючи конвекційну сушку. Отримано 0,975 г. В отриманому комплексі співвідношення арабіногалактану:бромелайн

1:1 (на суху речовину). Активність ферментної складової комплексу сягає 80 % від активності нативного ферменту (див. табл.).

pH оптимум вільного бромелайну знаходиться біля 6 од. Оптимальне значення pH для бромелайну в складі комплексу знаходиться в межах 6-8 (фіг. 1). Термооптимум складає 50 °C (фіг. 2). Крива 1 на фіг 1,2, 3, 4 - вільний фермент; крива 2 - фермент у складі комплексу.

Термостабільність ферменту в отриманому продукті визначали при фізіологічних значеннях температури (37 °C) та температурі 50 °C. Бромелайн при зазначених температурах має сталу активність. У комплексі з арабіногалактаном за цих умов його активність поступово зростає до максимальної (фіг. 3, 4). При 37 °C максимальної активності фермент у комплексі досягає за 4,5 год. (фіг. 3), у той час як при 50 °C - за 3 год. (фіг. 4). Це свідчить, що комплекс проявляє пролонговану дію.

Додатковим підтвердженням утворення комплексу арабіногалактан - бромелайн є результати дослідження отриманого продукту методами гель-хроматографії, ІЧ-спектроскопії, ЯМР-спектроскопії.

Вихідні криві елюції арабіногалактану та ферменту на сефадексі G-75 представлено на фіг. 5, 6 (відповідно гель-хроматома арабіногалактану та гель-хроматома бромелайну), а продукту їх взаємодії - на фіг. 7 (гель-хроматома комплексу арабіногалактан-бромелайн, крива 1 - полісахаридна складова, крива 2 - білкова складова).

Піки полісахаридної та білкової складових сумісні і об'єм їх виходу відповідає значенню молекулярної маси блакитного декстрану 90 kDa і є адитивною величиною молекулярних мас арабіногалактану (65 kDa) та бромелайну (33 kDa).

У порівнянні з ІЧ-спектрами вихідних сполук, у спектрі продукту взаємодії арабіногалактан - бромелайн має місце зміщення смуги поглинання карбонільних груп у низькочастотну область; смуги поглинання гідроксильних груп - у високочастотну; смуга поглинання груп NH₂ у спектрі комплексу знаходиться при 3305-3345 см⁻¹ тоді як відповідна смуга поглинання в ІЧ-спектрі бромелайну складає 3290-3417 см⁻¹ (фіг. 8 - ІЧ-спектр білок-полісахаридного комплексу).

Отже інтерпретація спектрів поглинання комплексу та його складових в інфрачервоній області показала, що взаємодія арабіногалактану з бромелайном супроводжується значними змінами в ІЧ-спектрі.

Комплексоутворення білка з полісахаридом підтверджено спектрами ЯМР C¹³ (фіг. 9 - ЯМР C¹³ білок-полісахаридного комплексу).

Дієтичну добавку у вигляді комплексу бромелайну з арабіногалактаном для покращення реологічних властивостей крові вживають перорально.

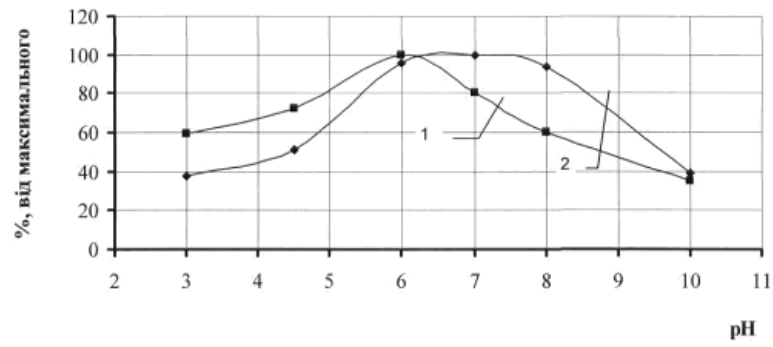
Таблиця

Активність ферменту у складі комплексу від активності нативного ферменту

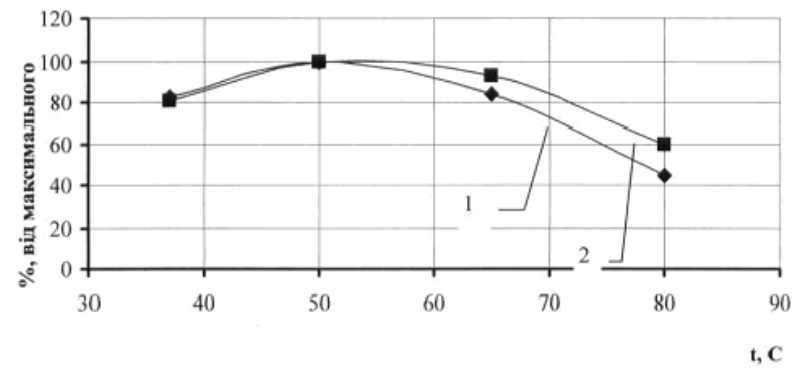
Час комплексоутворення	S:F Vs/Vf	0,2:1	0,6:1	1:1	1,4:1	2:1	3,5:1	5:1
15	1:1	61,35	72,45	75,69	75,89	75,61	75,71	75,67
	1:2	51,35	52,45	54,69	55,89	57,61	60,71	60,67
	2:1	29,05	29,67	38,54	31,45	32,43	32,30	32,06
30	1:1	67,61	78,41	80,83	80,03	79,90	79,77	79,83
	1:2	55,35	56,45	75,69	65,89	57,61	60,71	60,67
	2:1	33,45	34,53	40,23	41,56	42,07	42,56	42,43
45	1:1	65,31	77,04	79,22	78,53	77,90	78,87	78,53
	1:2	55,12	56,15	75,40	63,45	57,61	60,71	60,67
	2:1	33,52	34,70	40,05	41,76	41,89	41,70	41,50

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

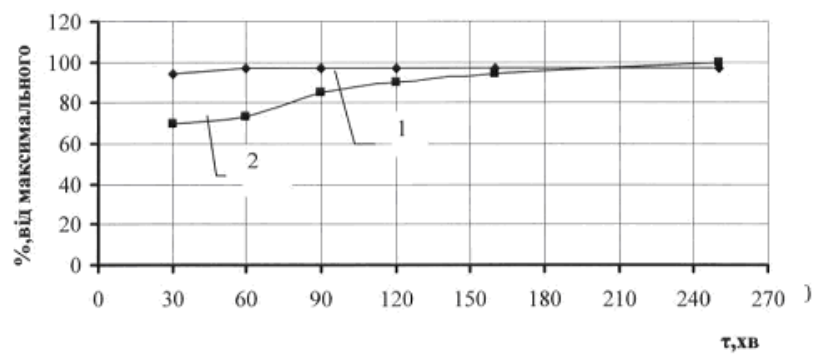
Спосіб одержання комплексу бромелайну з арабіногалактаном, який характеризується тим, що включає приготування водних розчинів з масовою часткою бромелайну від 0,1 до 1,0 % та арабіногалактану від 0,1 до 2,5 %, змішування отриманих водних розчинів при співвідношенні (1-2):(2:1), витримування суміші протягом 15-60 хв при 20-35 °C і наступне сушіння при 30-60 °C.



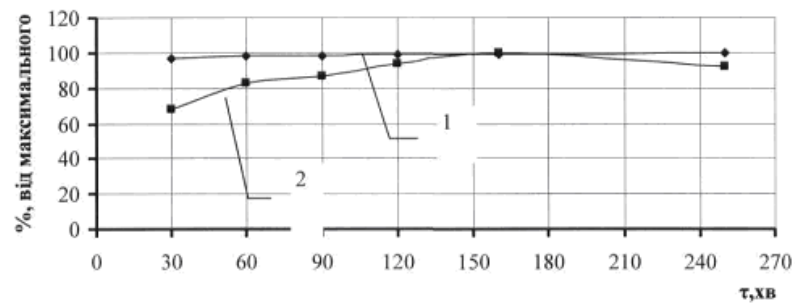
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

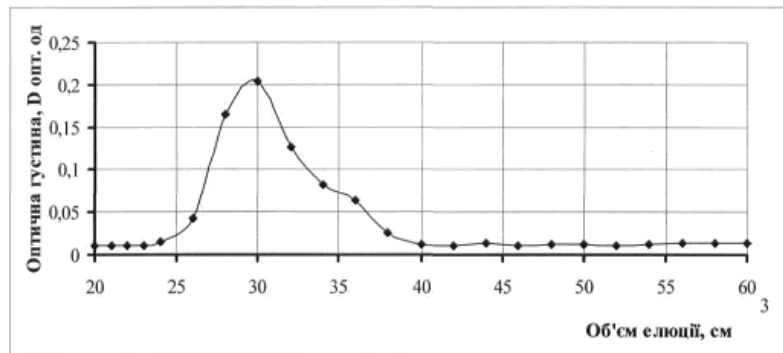


Fig. 5

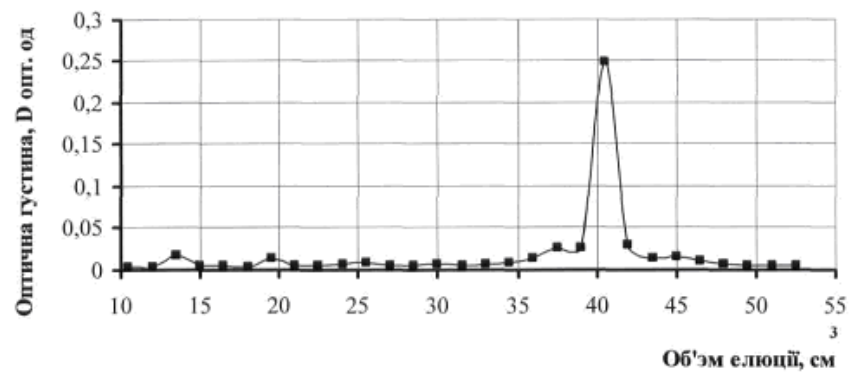


Fig. 6

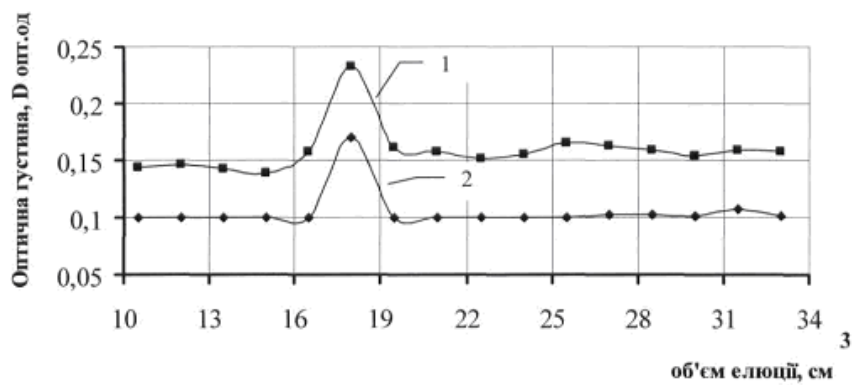


Fig. 7

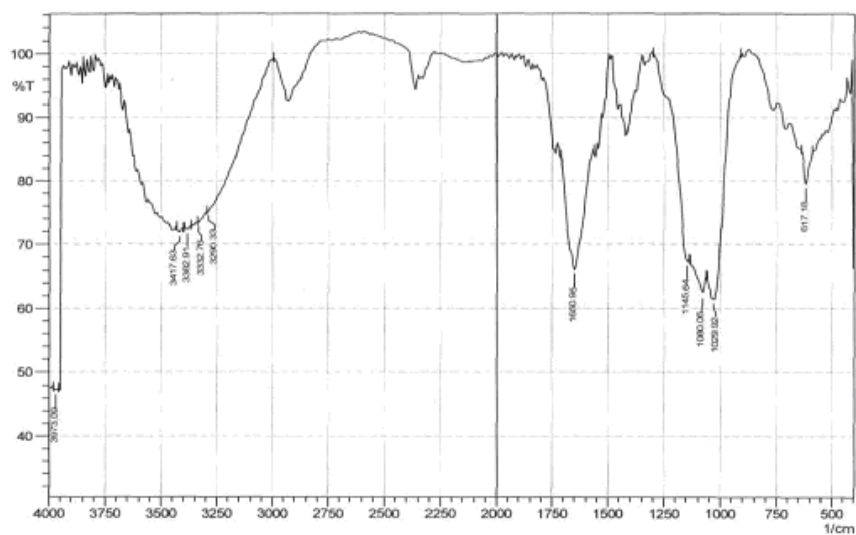


Fig. 8

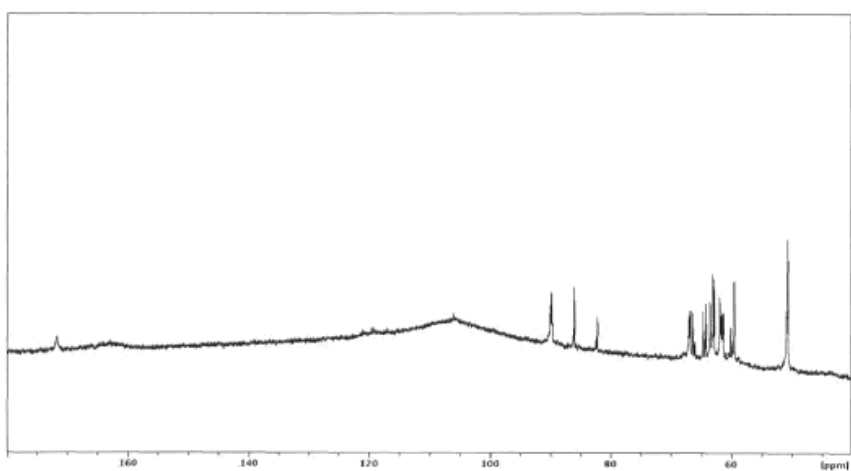


Fig. 9

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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

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