



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **116750**

(13) **U**

(51) МПК

C12P 19/04 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 09134	(72) Винахідник(и): Черно Наталія Кирилівна (UA), Бурдо Олег Григорович (UA), Науменко Кристина Ігорівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 31.08.2016	(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: 12.06.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.06.2017, Бюл.№ 11	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СТРУКТУРНОГО β -ГЛЮКАНУ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

(57) Реферат:

Спосіб одержання структурного β -глюкану дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* включає руйнування клітинних оболонок і подальше очищення цільового продукту. Свіжі пресовані хлібопекарські дріжджі роду *Saccharomyces cerevisiae*, обробляють 6-% розчином натрію гідроксиду, отриману суспензію піддають обробці НВЧ - променями в надвисокочастотному електричному полі з частотою 2,45 ГГц протягом 120...360 секунд. Після цього центрифугуванням відокремлюють осад, який обробляють 3 % розчином оцтової кислоти, при гідромодулі 1:(1-3) і температурі 75 °С, отриманий осад відокремлюють від супернатанту і сушать етиловим спиртом.

UA 116750 U

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема до технології одержання структурного β -глюкану клітинних стінок хлібопекарських дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae*, який призначений для профілактики імунного стану здоров'я людини.

Відомий спосіб одержання β -глюкану дріжджів (Kim, Y.T. Structural characterization of [beta]-D-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-linked glucans using NMR spectroscopy / Y.T. Kim, E.H. Kim, D.L. Williams, S.T. Lim // Carbohydrate research. - 2000. - 328 (3) - P. 331-341), який широко застосовується в експериментах по дослідженню біологічної активності цього полісахариду. Спосіб трудомісткий і багатостадійний. Він полягає в обробці свіжих пресованих пекарських дріжджів 6 %-им розчином NaOH при 60 °C з подальшим суспендуванням твердої фази у 3 %-ому розчині NaOH і її нагріванні протягом трьох годин при 80 °C (цю операцію повторюють двічі), далі залишок суспендують в 0,5 н розчині оцтової кислоти при 75 °C. Після охолодження суспензії залишок промивають гарячою водою і двічі автоклавують при 135 °C. Отриманий продукт багаторазово промивають водою для остаточного видалення глікогену і сушать. Спосіб дозволяє одержати цільовий продукт, який має високий ступінь чистоти (вміст полісахариду 90,3 %, білок - 3,8 %, золи - 0,4 %; вихід - 2,6 % від сухої маси дріжджів).

Відомий спосіб виділення β -глюкану з дріжджів у вигляді "цілих" частинок глюкану чи β -глюканових сфер (WGP) (U.S. Patent 7566704 Jamas S. (USA), Patchen M.L. (USA), Ostroff G. R. (USA), Easson D.D. (USA) - 11/333765; Filing Date 17.01.2006; Public. Date 02.11.2006. - P. 19. (Very high molecular weight β -glucans).), який полягає у витримуванні клітин дріжджів у цитрат-фосфатному буфері при pH 5,5. Далі клітинну масу обробляють розчином NaOH (концентрація 0,1...10 г при температурі 80...100 °C) протягом трьох годин. Цю операцію повторюють двічі. Отриману суспензію витримують при кімнатній температурі 16 годин. Для очищення отриманого продукту додатково використовують ферменти. Отриманий продукт являє собою порошок, частинки якого мають сферичну форму (діаметр 2...4 мкм). Цей спосіб більш простий у виконанні, проте тривалий, а одержуваний відповідно до нього препарат β -глюкану має низький ступінь чистоти (вміст глюкану 85 %, хітин і глікоген біля 10 %, він містить 1 % білка, вихід 10...15 % від сухої маси дріжджів).

Аналіз описаних вище способів показує, що для отримання цільового продукту високого ступеня чистоти, потрібні значні витрати часу і матеріальних ресурсів. Використання більш простих підходів, дозволяє отримувати препарат з великим виходом, проте в цьому випадку доводиться значною мірою поступатися ступенем його чистоти.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб (Патент РФ 2216595 Тонева-Давидова Е.Г. - 2002130728/13, Заявл. 18.11.2002, Опубл. 20.11.2003-5 с. (Способ получения бета-глюканов клеточной стенки дрожжей).), в якому використовуються механічні прийоми для руйнування клітинних оболонок з подальшим видаленням речовин, супутніх β -глюкану. Даний спосіб включає руйнування клітинних оболонок дріжджів механічно в млині з бусами Баллотіні і подальше оброблення ультразвуком частотою 18...30 кГц. Потім обробляють розчином NaOH або ферментами (вміст β -глюкану 87 %, білка 7 %, вихід препарату 10 % від сухої маси дріжджів).

Прототип і спосіб, що заявляється, мають наступні спільні ознаки:
руйнування клітинних оболонок;
очищення цільового продукту;

Але отриманий таким чином структурний β -глюкан має низький ступінь чистоти.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб одержання структурного β -глюкану клітинних стінок хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, в якому шляхом заміни хімічного реагенту, яким обробляють свіжі пресовані дріжджі, а також додаткової операції - обробки суспензії НВЧ-променями при заданих режимах, забезпечити збільшення виходу продукту і спрощення способу при зменшенні витрат.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі одержання структурного β -глюкану дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що включає руйнування клітинних оболонок і подальше очищення цільового продукту, згідно з корисною моделлю, на відміну від прототипу, свіжі пресовані хлібопекарські дріжджі роду *Saccharomyces cerevisiae* обробляють 6 %-им розчином натрію гідроксиду, отриману суспензію піддають обробці НВЧ-променями в надвисокочастотному електричному полі з частотою 2,45 ГГц протягом 120...360 сек, після чого центрифугуванням відокремлюють осад, який обробляють 3 %-им розчином оцтової кислоти, при гідромодулі 1:(1-3) і температурі 75 °C, отриманий осад відокремлюють від супернатанту і сушать етиловим спиртом. Суспензію обробляють НВЧ-променями циклічно з наступною періодичністю: 30 сек обробка, 30 сек пауза, або 18 сек обробка, 42 сек пауза, або 42сек обробка, 18 сек пауза.

Режими обробки НВЧ-променями для руйнації клітинної оболонки дріжджів, видалення білка, манану та глікогену підібрані експериментально.

Отриманий таким способом препарат являє собою структурний β -глюкан клітинної стінки дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae*. Хімічний склад препарату наведено у таблиці 1. Для підтвердження належності препаратів до категорії β -глюканів використовували метод поляриметрії (визначення питомої оптичного обертання) і ферментативні методи.

Величини питомої оптичного обертання зразків знаходяться в інтервалі $8,4^\circ \dots 9,1^\circ$ і відповідають літературним даними ($[\alpha]^{20}_D$ глюкану дріжджів $8,7^\circ$). Полісахариди дають негативну реакцію з йодом, що вказує на відсутність в них домішок глікогену, що входить до складу дріжджів. Крім цього, при обробці досліджуваних зразків α -амілазою, яка розщеплює глікоген і крохмаль, утворення водорозчинних вуглеводів - продуктів гідролізу глюканів - виявлено не було. І навпаки, ці полісахариди розщеплюються ферментними препаратами з β - (1 $\rightarrow$ 3) та β - (1 $\rightarrow$ 6)-глюканазною активністю.

Отриманий таким способом препарат дає можливість одержати структурний β -глюкан дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae* простим способом з високим виходом цільового продукту і ступенем очищення, що є не менш значущим для отримання β -глюкану, який призначений для профілактики імунного стану здоров'я людини (Лукьянчук, В.Д. Бета-глюканы как основа создания средств иммуномодулирующего действия. / В.Д. Лукьянчук, Е.М. Мищенко, М.Н. Бабенко, Врачу-практику. - 2011. - № 5 (85). - IX-X. - 92-93 с.).

Спосіб одержання структурного β -глюкану дріжджів здійснюють у наступному порядку. Пресовані хлібопекарські дріжджі роду *Saccharomyces cerevisiae* суспендують у 6 %-ому розчині NaOH при гідромодулі 1:(1-3) та обробляють НВЧ-променями в надвисокочастотному електричному полі з частотою 2,45 ГГц. Тривалість обробки - 120...360 сек. Суспензію обробляють циклічно з періодичністю: 30 сек. обробка, 30 сек. - пауза, або 18 сек. обробка, 42 сек. - пауза, або 42 сек. обробка, 18 сек. - пауза. Після цього суміш центрифугують при 8000 хв^{-1} 15 хвилин. Отриманий осад обробляють 3 %-им розчином оцтової кислоти при гідромодулі 1:(1-3) та нагрівають до 75°C для видалення глікогену, центрифугують при 8000 хв^{-1} , 15 хвилин при кімнатній температурі для відділення осаду від супернатанту. Осад сушать етиловим спиртом. Отриманий препарат являє собою дрібний порошок світлого кольору. Вихід препарату складає 11,1-15,9 % від сухої маси дріжджів.

Приклад № 1

При одержанні структурного β -глюкану 50 г свіжих пресованих хлібопекарських дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae* суспендують у 50 см^3 розчині NaOH масовою долею 6 % та обробляють НВЧ-променями в надвисокочастотному електричному полі з частотою 2,45 ГГц циклічною 30 сек. обробка, 30 сек. - пауза, тривалість обробки 120 сек., після чого суміш центрифугують при 8000 хв^{-1} 15 хвилин. Отриманий осад обробляють розчином оцтової кислоти масовою долею 3 % при гідромодулі 1:2 та нагрівають до 75°C для видалення глікогену, центрифугують при 8000 хв^{-1} 15 хвилин при кімнатній температурі для відділення осаду від супернатанту. Осад сушать етиловим спиртом. Отриманий препарат являє собою дрібний порошок світлого кольору. Характеристика і вихід цільового продукту наведено в таблиці 2.

Приклад №2

При одержанні структурного β -глюкану 50 г свіжих пресованих хлібопекарських дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae* суспендують у 100 см^3 розчині NaOH масовою долею 6 % та обробляють НВЧ-променями в надвисокочастотному електричному полі з частотою 2,45 ГГц циклічною 30 сек. обробка, 30 сек. - пауза, тривалість обробки 180 сек, після чого суміш центрифугують при 8000 хв^{-1} 15 хвилин. Отриманий осад обробляють розчином оцтової кислоти масовою долею 3 % при гідромодулі 1:1 та нагрівають до 75°C для видалення глікогену, центрифугують при 8000 хв^{-1} , 15 хвилин при кімнатній температурі для відділення осаду від супернатанту. Осад сушать етиловим спиртом. Отриманий препарат являє собою дрібний порошок світлого кольору. Характеристика і вихід цільового продукту наведено в таблиці 2.

Приклад №3

При одержанні структурного β -глюкану 50 г свіжих пресованих хлібопекарських дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae* суспендують у 150 см^3 розчині NaOH масовою долею 6 % та обробляють НВЧ-променями в надвисокочастотному електричному полі з частотою 2,45 ГГц циклічною 18 сек обробка, 42 сек - пауза, тривалість обробки 360 сек, після чого суміш центрифугують при 8000 хв^{-1} 15 хвилин. Отриманий осад обробляють розчином оцтової кислоти масовою долею 3 % при гідромодулі 1:3 та нагрівають до 75°C для видалення глікогену, центрифугують при 8000 хв^{-1} , 15 хвилин при кімнатній температурі для відділення осаду від супернатанту. Осад сушать етиловим спиртом. Отриманий препарат являє собою дрібний порошок світлого кольору. Характеристика і вихід цільового продукту наведено в таблиці 2.

Приклад № 4

При одержанні структурного β -глюкану 50 г свіжих пресованих хлібопекарських дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae* суспендують у 150 см³ розчині NaOH масовою долею 6 % та обробляють НВЧ-променями в надвисокочастотному електричному полі з частотою 2,45 ГГц циклічністю 30 сек. обробка, 30 сек. - пауза, тривалість обробки 120 сек., після чого суміш центрифугують при 8000 хв⁻¹ 15 хвилин. Отриманий осад обробляють розчином оцтової кислоти масовою долею 3 % при гідромодулі 1:3 та нагрівають до 75 °С для видалення глікогену, центрифугують при 8000 хв⁻¹, 15 хвилин при кімнатній температурі для відділення осаду від супернатанту. Осад сушать етиловим спиртом. Отриманий препарат являє собою дрібний порошок світлого кольору. Характеристика і вихід цільового продукту наведено в таблиці 2.

Приклад № 5

При одержанні структурного β -глюкану 50 г свіжих пресованих хлібопекарських дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae* суспендують у 50 см³ розчині NaOH масовою долею 6 % та обробляють НВЧ-променями в надвисокочастотному електричному полі з частотою 2,45 ГГц циклічністю 42 сек. обробка, 18 сек. - пауза, тривалість обробки 360 сек., після чого суміш центрифугують при 8000 хв⁻¹ 15 хвилин. Отриманий осад обробляють розчином оцтової кислоти масовою долею 3 % при гідромодулі 1:1 та нагрівають до 75 °С для видалення глікогену, центрифугують при 8000 хв⁻¹, 15 хвилин при кімнатній температурі для відділення осаду від супернатанту. Осад сушать етиловим спиртом. Отриманий препарат являє собою дрібний порошок світлого кольору. Характеристика і вихід цільового продукту наведено в таблиці 2.

Таблиця 1

Хімічний склад препарату

Показники	Вміст, %
Полісахаридна складова, в т.ч.	88,0-94,0
Легкогідролізовані полісахариди	сліди
Важкогідролізовані полісахариди	88,0-94,0
Глікоген	відсутній
Білкова складова	0,7-5,4
Ліпіди	сліди

Таблиця 2

Характеристика і вихід цільового продукту, отриманого за прикладами № 1-5

№ прикладу	Вихід препарату, % від маси свіжих дріжджів	Вміст полісахариду, %	Вміст білка, %
1	14,2	90,6	3,4
2	11,1	94,0	0,7
3	15,0	88,0	5,4
4	13,2	92,8	2,6
5	15,9	89,5	4,4

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб одержання структурного β -глюкану дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що включає руйнування клітинних оболонок і подальше очищення цільового продукту, який **відрізняється** тим, що свіжі пресовані хлібопекарські дріжджі роду *Saccharomyces cerevisiae*, обробляють 6-% розчином натрію гідроксиду, отриману суспензію піддають обробці НВЧ-променями в надвисокочастотному електричному полі з частотою 2,45 ГГц протягом 120...360 секунд, після чого центрифугуванням відокремлюють осад, який обробляють 3 % розчином оцтової кислоти, при гідромодулі 1:(1-3) і температурі 75 °С, отриманий осад відокремлюють від супернатанту і сушать етиловим спиртом.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що суспензію обробляють НВЧ-променями циклічно з наступною періодичністю: 30 сек. обробка, 30 сек. пауза.

3. Спосіб п. 1, який **відрізняється** тим, що суспензію обробляють НВЧ-променями циклічно з наступною періодичністю: 18 сек. обробка, 42 сек. пауза.

4. Спосіб п. 1, який **відрізняється** тим, що суспензію обробляють НВЧ-променями циклічно з наступною періодичністю: 42 сек. обробка, 18 сек. пауза.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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