



УКРАЇНА

(19) UA (11) 66757 (13) U
(51) МПК (2011.01)
C12N 11/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТУ В ПОЛІЕЛЕКТРОЛІТНУ МІКРОКАПСУЛУ

1

2

(21) u201111177

(22) 20.09.2011

(24) 10.01.2012

(46) 10.01.2012, Бюл.№ 1, 2012 р.

(72) ЧЕРНО НАТАЛІЯ КИРИЛІВНА, ОЗОЛІНА СО-
ФІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, КАПУСТЯН АНТОНІНА
ІВАНІВНА(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ(57) Спосіб іммобілізації ферменту в поліелектро-
літну мікрокапсулу, що включає отримання CaCO_3 -

частинок з інкапсульованим ферментом, формування мікрокапсул шляхом почергової адсорбції на вказані компоненти протилежно заряджених поліелектролітів і видалення CaCO_3 із отриманих таким чином капсул, який **відрізняється** тим, що як інкапсульований білок використовують трипсин, який беруть в кількості 1-10 мг/мл, а як протилежно заряджені поліелектроліти - пектин і хітозан в кількості 2-5 мг/мл кожного.

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема до способу отримання іммобілізованих ферментів, і може бути використана в харчовій, промисловості, а також в медичній та лабораторній практиці.

Літературні дані свідчать, що широкого використання набувають полімерні нано- і мікрокапсули (ПНМК) у ряді галузей техніки, хімії, фізики, біотехнології та фармакології (Möhwald H., Donath E. and Sukhorukov G.B. In book: Multilayer Thin Films. Sequential Assembly of Nanocomposite Materials (Ed. By G. Decher and JBSchlenoff). Wiley-VCH, 2002, P. 363-392; Fery A. Möhwald H., Sukhorukov G.B. // Progr. Polymer. Sci. 2005. V. 30 (8-9). P. 885).

Існує ряд підходів для завантаження білків у поліелектролітні мікрочастинки. Перший з них був запропонований у 1999 році (Бобрешова М.Є., Сабурова Е.А. та ін. Лактатдегідрогеназа в інтерполіелектролітному комплексі. Функція і стабільність // Біофізика. - 1999. - Т. 44, №5. - С. 813-820). Цей спосіб включає в себе стадію утворення мікроагрегатів білка в процесі його висолування і наступну стадію почергової адсорбції протилежно заряджених поліелектролітів на ці мікроагрегати. Включення ферменту в поліелектролітні мікрочастинки становило ~ 70 % від кількості агрегатів білка, але його активність була помітно знижена і залежала від ряду факторів. Основний недолік цього способу полягає в тому, що мікрочастинки, які містять фермент, мають неправильну форму і їх розмір неможливо проконтролювати.

Відомий спосіб включення білка безпосередньо в порожнисті ПНМК, в оболонках яких спеціально створювалися "пори" (оболонка розпушується) додаванням органічного розчинника, зміною сольового складу та рН середовища для проникнення білка крізь оболонку в капсулу. Але кількість включеного таким способом в капсулу білка становила менше 10 % і при цьому його велика частина зосереджувалася в оболонці мікрокапсули (Lvov Y., Antipov A.A., Mamedov A. et al. Ureas encapsulation in nanoorganized microshells // Nanoletters 2001. V. 1. 3. P. 125-128).

Найбільш близьким до корисної моделі, що заявляється, є спосіб іммобілізації білків у поліелектролітну мікрокапсулу, основними стадіями якого є попереднє формування ядра капсули - "кора", у вигляді мікросфероліта CaCO_3 з включеним в нього білком з подальшою пошаровою адсорбцією поліелектролітів на такий "кор". Остаточною стадією капсулювання білка є видалення CaCO_3 з капсули додаванням етилендіамідтетрацетату (ЕДТА) або іншого хелатного агента.

Цим методом може включатися більше 60 % від доданого в розчин білка. Докладно спосіб викладений у роботі A. Petrov, D. Volodkin, G. Sukhorukov. Protein-Calcium Carbonate Coprecipitation: A tool for protein encapsulation. // Biotechnol. Progr., 2005, v. 27, p. 918-925.

Даний спосіб вибрано прототипом. Прототип і корисна модель, що заявляється, мають наступні спільні ознаки (операції):

(13) U
(11) 66757
(19) UA

- отримання CaCO_3 -частинок з інкапсульованим ферментом;
- формування капсул шляхом почергової адсорбції на вказані компоненти протилежно заряджених поліелектролітів;
- видалення CaCO_3 з отриманих капсул.

Але способу за прототипом притаманний такий недолік, як нехтування вивчення впливу стехіометрії під час комплексоутворення між поліелектролітами. Слід зазначити, що стехіометрія виступає як одна з найважливіших характеристик поліелектролітного комплексоутворення, що визначає заряд, структуру, розчинність та інші властивості, які необхідно враховувати, застосовуючи інтерполіелектролітні комплекси (ІПЕК) в технології лікувально-профілактичних та лікарських форм, зокрема для отримання препаратів пролонгованої дії. Зміну стехіометрії комплексів можна розглядати як один із способів регулювання швидкості вивільнення біологічно активних речовин.

Таким чином, спосіб, прийнятий як прототип, в тому вигляді, як він представлений авторами, має недолік, який полягає в тому, що спосіб не передбачає попереднього вивчення стехіометрії при комплексоутворенні між аніоно- і катіоногенними поліелектролітами, що формують оболонку капсул.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити удосконалений спосіб іммобілізації ферменту в поліелектролітну мікрокапсулу, в якому шляхом заміни поліелектролітів та підбору співвідношень компонентів забезпечити збереження активності та пролонговане вивільнення ферменту трипсину, при його інкапсулюванні в поліелектролітну оболонку в умовах агресивної дії середовища шлунково-кишкового тракту.

Поставлена задача вирішена в способі іммобілізації ферменту в поліелектролітну мікрокапсулу, що передбачає отримання CaCO_3 -частинок з інкапсулюванням ферментом, формування мікрокапсул шляхом почергової адсорбції на вказані компоненти протилежно заряджених поліелектролітів і видалення CaCO_3 із отриманих таким чином капсул тим, що як інкапсульований білок використовують трипсин, котрий беруть в кількості 1-10 мг/мл, а як протилежно заряджені поліелектроліти - пектин і хітозан в кількості 2-5 мг/мл кожного.

Новизна способу, що заявляється, полягає в тому, що експериментально підібрані аніоно- і ка-

тіоногенні поліелектроліти для формування оболонки мікрокапсул, кількість функціональних груп у молекулах яких має становити 1:1, що відповідає утворенню нерозчинних стехіометричних ІПЕК, стійких до дії кислих значень рН-середовища. Складовими поліелектролітної оболонки вибрано природні полісахариди хітозан та пектин, які є біосумісними з активною складовою, не викликають алергічних реакцій, а також підлягають біодеградації.

Приклад 1

2,5 мл 1 М розчину CaCl_2 в 80 мМ Трис-буфері (рН=8) змішували з 5 мл розчину трипсину з концентрацією 1-10 мг/мл в тому ж буфері. До суміші, що перемішувалась на магнітній мішалці (650 об./хв.), швидко додавали 7,5 мл 0,33 М водного розчину Na_2CO_3 . Після 30 с перемішування суспензію залишали на 5-7 хв. Осад (CaCO_3) центрифугували (2000 об./хв., 3 хв.), супернатант відокремлювали, додавали 15 мл 40 мМ Трис-буфера і перемішували суспензію частинок 20 хв. при 250-350 об./хв.

Капсули отримували на CaCO_3 частинках послідовною адсорбцією хітозану (3 мг/мл) і пектину (3 мг/мл) в 0,02 N NaCl . Нанесення кожного шару поліелектролітів проводили протягом 5 хв., потім частинки центрифугували і промивали в 0,02 N NaCl . Після нанесення двох шарів хітозану і двох шарів пектину, CaCO_3 -частинки розчиняли в 0,2 М розчині ЕДТА (рН 7,0). Після повного розчинення карбонатної матриці, мікросфери промивали у воді 3 рази і зберігали у вигляді суспензії при 4 °С.

Приклад 2

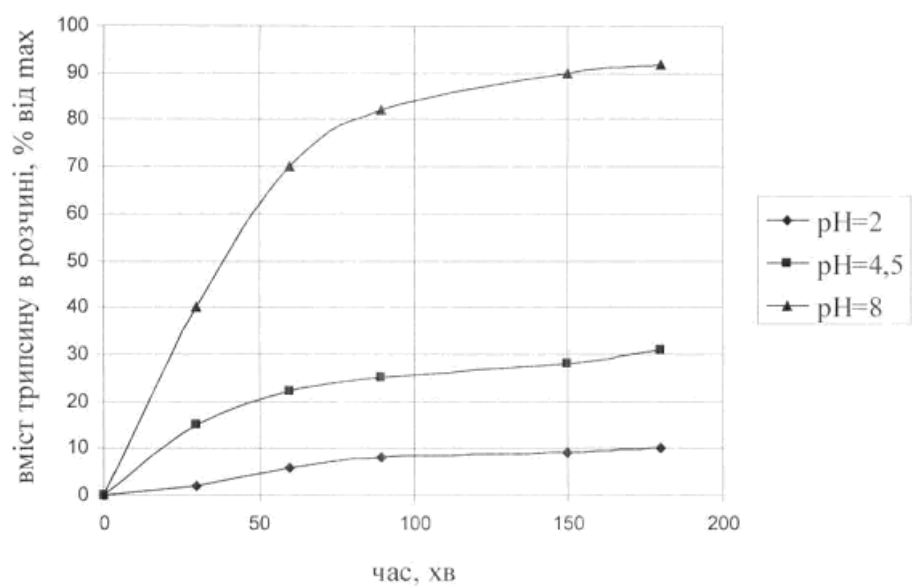
Проводили іммобілізацію трипсину в поліелектролітні мікрокапсули як наведено вище, але компоненти брали в кількості: трипсин - 1,0 мг/мл; пектин - 2,0 мг/мл; хітозан - 2,0 мг/мл.

Приклад 3

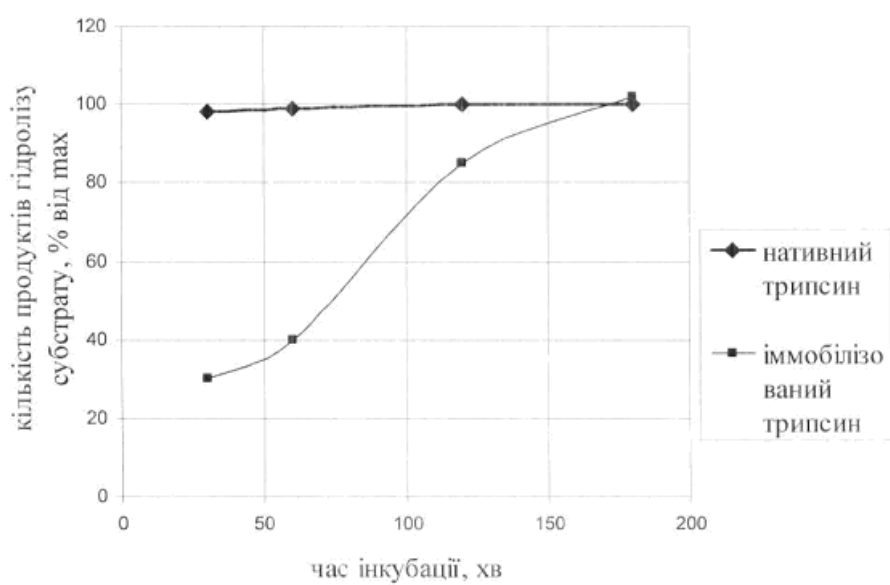
Проводили іммобілізацію трипсину в поліелектролітні мікрокапсули як наведено в п. 1, але компоненти брали в кількості: трипсин - 10,0 мг/мл; пектин - 5,0 мг/мл; хітозан - 5,0 мг/мл.

Приклад 4

Визначали активність та пролонгований вихід трипсину в умовах агресивної дії середовища шлунково-кишкового тракту. Дані наведені на кресленнях: Фіг.1 - динаміка виходу трипсину із мікрокапсули; Фіг.2 - глибина гідролізу субстрату.



Фіг. 1



Фіг. 2