



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76072** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
C12N 11/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2012 06283	(72) Винахідник(и):	Черно Наталія Кирилівна (UA), Капустян Антоніна Іванівна (UA), Саблістюк Олена Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	24.05.2012	(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:	25.12.2012		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.12.2012, Бюл.№ 24		

(54) СПОСІБ ІММОБІЛІЗАЦІЇ α -АМІЛАЗИ

(57) Реферат:

Спосіб іммобілізації α -амілази передбачає включення ферменту в полімерну поліелектролітну матрицю. Спочатку змішують водні розчини пектину і CaCl_2 , потім додають водний розчин α -амілази та витримують 10...15 хв. Після цього додають розчин хітозану в 1 % оцтовій кислоті, суміш витримують 10...15 хвилин і піддають ліофільному сушінню. При цьому розчини пектину, CaCl_2 , α -амілази і хітозану беруть в масовому співвідношенні (1-2):(0,1-1):(0,1-1):(1-2) відповідно.

UA 76072 U

UA 76072 U

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.

Відомий спосіб іммобілізації комплексу ферментів, до складу яких входить ліпаза, на харчових волокнах з використанням як середовища насиченого 20 % розчину поліетиленоксиду (ПЕО) та 10 % полівінілового спирту (ПВС), приготованих на 5 % розчині бури (тетраборату натрію) (див. Кравченко І.А. та ін. Іммобілізація ферментів замісної терапії на харчових волокнах. Доповіді НАН України, 1997, № 3, с. 182-186). Але відомий спосіб має суттєві недоліки: при іммобілізації на харчових волокнах втрачається 69-78 % вихідної ліполітичної активності; складність способу, пов'язана з подрібненням до порошкоподібного стану іммобілізованого препарату, отриманого шляхом насичення харчових волокон 20 %-им розчином ПЕО.

Існує спосіб іммобілізації ліполітичних ферментів, який передбачає включення ферменту в полівініловий спирт і подальше нанесення його на матрицю, попередньо насичену 2 % розчином бури. Як матрицю використовують активованій вуглецево-волокнистий матеріал з сумарним об'ємом пор 0,41-1,3 см³/г, а процес ведуть при співвідношенні фермент: полівініловий спирт: матриця - (0,8-1,2):(0,11-0,17):(24-72) відповідно (див. патент України № 7861 (51) МПК (2005): C12N 11/00 Спосіб іммобілізації ліполітичних ферментів). Недоліком даного способу є використання полівінілового спирту для включення ферменту. Даний компонент являється синтетичним матеріалом і не підлягає біодеградації.

Відомий спосіб іммобілізації протеази С (див. патент України на корисну модель № 31802), в якому включення ферменту проводять наступним чином: готують суспендований розчин протеази С, для чого 35 мг ферменту розчиняють в 5 см³ натрій-фосфатного буферного розчину (0,033 моль/дм³, рН 7, 4). Отриману суспензію при температурі 37 °С і ретельному перемішуванні повільно вливають в 3 см³ гелеподібного продукту з бурих морських водоростей "Ламідан". В результаті включення отримують іммобілізовану протеазу С у вигляді суміші, якій надалі в залежності від потреб можна надати необхідну форму. Зберігають іммобілізований препарат у холодильнику при температурі 0-4 °С. Але спосіб має суттєві недоліки: наявність великої йонної сили розчину, що створюється в гелі, унеможливорює ймовірність іммобілізації на ньому лужних травних ферментів, збереження активності трипсину у складі гелеподібного продукту з бурих морських водоростей "Ламідан" зберігається всього на 19,5 %. Другим недоліком є те, що іммобілізована протеаза С у вигляді продукту гелеподібної структури деяким чином є несприятною за органолептичними показниками для вживання перорально. Окрім того, проведення процесу іммобілізації ферменту при температурі 37 °С передбачає додаткові затрати енергії.

Існує спосіб іммобілізації трипсину, що передбачає включення ферменту в полімерну матрицю гелеподібної структури (див. патент України на корисну модель № 66429). Іммобілізацію трипсину проводять наступним чином: спочатку змішують водні розчини пектину і трипсину та витримують 10-15 хвилин, після цього додають розчин хітозану в 1 % оцтовій кислоті. Суміш витримують 10-15 хвилин і піддають ліофільному сушінню. Розчин пектину, трипсину і хітозану беруть в масовому співвідношенні, рівному (1-2):(0,5-1):(1-2) відповідно. Пектин і хітозан беруть в концентрації 0,25-1 %. Але недолік даного способу полягає в тому, що максимальне збереження активності характерно тільки для іммобілізованих травних протеаз, а активність, наприклад, α -амілази в комплексі з полісахаридами значно знижується (на 80...90 % від вихідної активності) порівняно з вільним ферментом.

Найбільш близьким до заявлюваного є спосіб іммобілізації α -амілази на поліетерсульфонових мембранах методом "Layer by Layer" (див. Наукові записки. - Т. 79. Хімічні науки і технології Національного університету "Києво-Могилянська академія" - 2008 р. - С. 40-44). Поліетерсульфонові мембрани попередньо відмивали в дистильованій воді протягом 1 год. Модифікування проводили з боку селективного шару мембрани. Розчин полістиренсульфонату (PSS) з концентрацією 0,02 М в 0,5 М NaCl наносили на селективний шар мембрани першим та витримували протягом 5 хв. Перед і після нанесення шару α -амілази поверхню мембрани інтенсивно відмивали дистильованою водою. Концентрацію ферменту змінювали від 25 до 1000 од. акт./мл, рН модифікуючого розчину в діапазоні 2-6. Процедуру повторювали до нанесення необхідної кількості шарів.

Даний спосіб обрано прототипом. Прототип і спосіб, що заявляється, співпадають в наявності операції включення α -амілази в полімерні структури за принципом поліелектролітної взаємодії протилежно заряджених функціональних груп молекул полімерів.

Але спосіб за прототипом має суттєвий недолік: додаткові операції модифікування поліетерсульфонові мембрани розчином полістиренсульфонату ускладнюють технологічний

процес, крім того використання синтетичного полімерного носія для іммобілізації α -амілази унеможливорює його біодеградацію та може викликати алергічні реакції.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити удосконалений спосіб іммобілізації α -амілази, в якому шляхом включення ферменту в полісахаридну біополімерну матрицю при додаванні хлориду кальцію забезпечити значне збереження активності ферменту, біосумісність з активною складовою та біодеградацію матриці для іммобілізації.

Поставлена задача вирішена в способі іммобілізації α -амілази, що передбачає включення ферменту в полімерну матрицю, тим, що спочатку змішують водні розчини пектину і та хлориду кальцію, після цього додають розчин α -амілази, витримують 10-15 хвилин, потім до вказаної суміші додають розчин хітозану в 1 % оцтовій кислоті, суміш витримують 10-15 хвилин і піддають ліофільній сушці. Розчини пектину, хлориду кальцію, α -амілази і хітозану беруть в масових співвідношеннях (1-2):(0,1-1):(0, 1-1):(1-2) відповідно.

Новим у корисній моделі, що заявляється, є включення α -амілази до поліелектролітного комплексу хітозан-пектин, який є біодеградовним та виконує функціонально-фізіологічні функції природних ентеросорбентів.

Комплекси хітозан- α -амілаза-пектин мають високу амілолітичну активність. Відмінною особливістю такого способу іммобілізації ферментів є відсутність контакту ферменту з розчинниками, які спричиняють денатуруючу дію на білки. Показано, що зв'язування ферменту з матрицею відбувається в основному за рахунок електростатичних взаємодій. Такий характер взаємодії дозволяє зберегти третинну структуру білка і, отже, його активність. Використання полісахаридів як полімерної матриці дозволяє зберегти 80-85 % активності іммобілізованої таким чином α -амілази, що має пролонговану дію.

Невідома технологія іммобілізації ферменту, зокрема α -амілази, в якій як полімерні складові використовуються пектин, CaCl_2 і хітозан в суміші. Вказані компоненти полімерної матриці підібрані експериментально. Як аніонні комплексоутворювачі, крім пектину, використовували також агар та карагінан, а як катіонний комплексоутворювач - казеїн. При змішуванні розчинів пектину з казеїном або хітозану з карагінаном, або хітозану з агаром - утворення гелеподібної структури не спостерігалось. Відмічалось деяке збільшення в'язкісних характеристик даних сумішей, на відміну від суміші хітозану з пектином.

Змішування розчинів хітозану з пектином супроводжувалось гелеутворенням та замутненням системи, які спостерігали протягом 30 хвилин. Спектрофотометричне дослідження показало, що оптична щільність дисперсій, яку визначали через кожні 5 хвилин ($\lambda=345$ нм) досягала постійного значення ($D=0,82$ опт. од) через 10-15 хвилин від початку поєднання компонентів комплексу, що вказує на закінчення процесу комплексоутворення. Тому в режимі вибрано час витримки саме 10-15 хвилин.

Співвідношення пектину, CaCl_2 , α -амілази та хітозану також підібрано експериментально. Комплекс отримували послідовним змішуванням розчинів пектину з CaCl_2 , α -амілази і хітозану. Використовували хітозан з молекулярною масою 245 кДа і ступенем деацетилювання 67,2 %, яблучний пектин з молекулярною масою 12 кДа і ступенем метоксилювання 66,4 %, α -амілазу з активністю 120 од/мг.

Масове співвідношення компонентів у комплексі (пектин: CaCl_2 : α -амілаза: хітозан) становило (1-2):(0,1-1):(0,1-1):(1-2). Концентрацію 5 полісахаридів-комплексоутворювачів варіювали в інтервалі від 0,25 до 1 %, α -амілази - від 0,1 до 1 %, CaCl_2 - від 0,1 до 1 %. Процес взаємодії компонентів супроводжувався гелеутворенням, в той час як кожен з полісахаридів окремо при взаємодії з α -амілазою в даних умовах не здатен до утворення гелю. Процес комплексоутворення завершується через 10-15 хв з моменту з'єднання компонентів комплексу. Включення ферменту в матрицю становило 100 %. ІПЕК з амілолітичною активністю піддавали ліофільному сушінню при 37 °С, після чого визначали активність ферменту.

Приклад 1. В ємність помістили 15 мл 0,5 % водного розчину пектину і до нього додавали 15 мл 0,1 % водного розчину CaCl_2 , після чого додавали 15 мл 0,5 % водного розчину α -амілази. Суміш перемішали і витримали протягом 15 хв. Потім до суміші додали 30 мл 0,25 % розчину хітозану в 1 % оцтовій кислоті, перемішали і витримали протягом 15 хв. Отриману гелеву масу після цього помістили в металеві бокси і піддали ліофільному сушінню при 37 °С протягом 10 год. Отриманий продукт має губчасту пористу структуру, колір від світло-сірого до кремового. Вміст води складає 8-10 %.

Приклад 2-7. Здійснювали аналогічно тому, як наведено в прикладі 1, але компоненти брали в різних співвідношеннях. Результати наведені в таблиці.

Встановлено, що найбільшу амілолітичну активність (85,2 % від максимально можливої) має комплекс, отриманий при масовому співвідношенні пектин: CaCl_2 : α -амілаза: хітозан - 2:0,2:1:2

- (приклад 1), при цьому співвідношення функціональних груп пектину і хітозану становить 1:1, що відповідає утворенню стехіометричного ІПЕК. При різному співвідношенні функціональних груп пектину та хітозану в комплексі спостерігається зменшення протеолітичної активності ІПЕК. Така тенденція пояснюється утворенням нестехіометричних асоціатів, в котрих включення α -амілази здійснюється не повністю.

Таблиця

Амілолітична активність (АА) ІПЕК в залежності від співвідношення та його компонентів

№ зразка	Пектин V, мл	CaCl ₂ V, мл	α -Амілаза V, мл	Хітозан V, мл	АА, % від max
1	30	3	15	30	85,1
2	20	3	20	20	54,42
3	30	3	15	30	44,32
4	30	3	15	15	25,62
5	15	3	15	30	29,55
6	20	3	20	20	27,12
7	20	3	10	40	23,14

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб іммобілізації α -амілази, що передбачає включення ферменту в полімерну поліелектролітну матрицю, який **відрізняється** тим, що спочатку змішують водні розчини пектину і CaCl₂, потім додають водний розчин α -амілази та витримують 10...15 хв, після чого додають розчин хітозану в 1 % оцтовій кислоті, суміш витримують 10...15 хвилин і піддають ліофільному сушінню, при цьому розчини пектину, CaCl₂, α -амілази і хітозану беруть в масовому співвідношенні (1-2):(0,1-1):(0,1-1):(1-2) відповідно.

Комп'ютерна верстка М. 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