



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **83594** (13) **U**
(51) МПК

C12P 19/04 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 14015	(72) Винахідник(и): Черно Наталія Кирилівна (UA), Коваленко Олексій Володимирович (UA), Шапкіна Кристина Ігорівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 10.12.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.09.2013	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.09.2013, Бюл.№ 18	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВОДОРОЗЧИННОГО β -ГЛЮКАНУ

(57) Реферат:

Спосіб одержання водорозчинного β -глюкану характеризується тим, що водонерозчинний β -глюкан клітинних стінок хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* піддають ферментативному гідролізу шляхом обробки його мультиферментним препаратом Rovabio Excel AP при концентрації ферменту у розчині 0,25-0,5 мг/см³ протягом 24-72 годин і співвідношенні фермент:субстрат 1:(15-45), після гідролізу суміш кип'ятять 15 хвилин, супернатан відокремлюють і сушать.

UA 83594 U

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема до технології одержання водорозчинних фрагментів (1→3/1→6)-β-D-глюкану клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, який має імуномодулюючі, протипухлинні та радіопротекторні властивості.

5 Бета-глюкан активує клітини системи мононуклеарних фагоцитів як прямим шляхом, так і через систему комплементу. Продукти активації обох систем, діючи через відповідні рецептори, втягують у запально-іmunний процес все більшу кількість мононуклеарних фагоцитів, поліморфноядерних лейкоцитів, лімфоцитів, тучних клітин і тромбоцитів. Ці продукти забезпечують мобілізацію, кооперацію і регуляцію клітинних процесів іmunної відповіді (McCarthy K., Musson R.A, Henson P.M: Protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent secretion of lysosomal hydrolases from rabbit and human macrophages. J Reticuloendothel Soc; 1982 Feb; 31(2):131-44).

10 Визначальну роль у взаємодії глюканів з елементами іmunної системи відіграє конформація молекули в момент впливу. Фізіологічна активність β-глюканів визначається багатьма факторами: типом та конфігурацією зв'язків між залишками моносахаридів, розгалуженістю та конформацією макромолекули, ступенем її полімеризації; розчинністю у воді, молекулярною масою полісахариду та ін. Встановлено, що фізіологічна дія нерозчинних глюканів значно менша, ніж розчинних (Беседнова, Н. Н. Иммунотропные свойства (1→3), (1→6)-β-D-глюканов / Н. Н. Беседнова, Л. А. Иванушко, Т. Н. Звягинцева Л. А. Елякова // Антибиотики и химиотерапия.-2000. - № 5. - С. 37-44).

20 Глюкани дріжджів мають розгалужену структуру, основою якої є кор, що складається з β-D-глюкопіранозних залишків, зв'язаних (1→3) глікозидними зв'язками. До положень О-6 моносахаридних залишків кору приєднуються бічні відгалуження, розмір яких варіює.

25 Здатність глюканів розчинятися у воді можна підвищити шляхом їх хімічної модифікації. В літературі наведено дані щодо отримання та визначення властивостей їх сульфатованих, фосфатованих та інших похідних, які здатні розчинятися у воді.

30 Відомий спосіб одержання водорозчинного фосфатованого глюкану дріжджів (Патент США № 4739046), який передбачає розчинення частинок глюкану в сильному полярному розчиннику, що містить сильний хаотропний агент і фосфатну кислоту. Цей спосіб передбачає обробку водонерозчинного глюкану дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* розчинами диметилсульфоксидом (DMSO) чи сечовиною концентрацією 4-12 М. Суспензію перемішують, суміш підігрівають до T = 50-150 °C та поступово додають фосфатну кислоту. Обробку проводять впродовж 1-12 годин при T = 100 °C, вихід при цьому розчинного глюкану складає 70-90 %. Ступінь фосфатованих груп - 1,48 % - 2,23 %.

35 Однак, отриманий таким чином водорозчинний глюкан змінює конформацію молекули, що, в свою чергу, негативно впливає на біологічну активність полісахариду (Chen, Jiezhong. Medicinal importance of fungal β-(1→3), (1→6)-glucans / Jiezhong Chen, Robert Seviour // Mycological research.-2007. - P. 635-652).

40 Відомий спосіб вирішує задачу, одержання водорозчинного глюкану шляхом хімічного гідролізу, а тому не може бути вибраний прототипом.

40 В основу корисної моделі поставлено задачу розробити ефективний ферментативний спосіб одержання низькомолекулярного водорозчинного β-(1→3/1→6)-D-глюкану клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

45 Поставлена задача вирішується тим, що включає обробку водонерозчинного β-глюкану клітинних стінок хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* мультиферментним препаратом Rovabio Excel AP при концентрації ферменту у розчині 0,25-0,5 мг/см³ протягом 24-72 годин і співвідношенні фермент:субстрат 1:(15-45), після гідролізу суміш кип'ятять 15 хвилин, супернатан відокремлюють і сушать.

Режими деструкції макромолекул водонерозчинного глюкану підібрані експериментально.

50 Отримані препарати являють собою порошок білого кольору. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану коливається у діапазоні 40-90 % маси вихідного полісахариду. Результати молекулярно-масового розподілу свідчать, що отримані препарати являють собою гетерогенну за молекулярною масою суміш, у якій присутні фрагменти зі ступенем полімеризації у досить широкому інтервалі значень, а вміст фракції з M_n 1-30 кДа коливається у діапазоні 15-60 % сухої маси глюкану клітинних стінок дріжджів.

55 Заявлений спосіб дає можливість одержати водорозчинний низькомолекулярний β-глюкан дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, який має більшу фізіологічну активність, ніж водонерозчинний чи модифікований розчинний, отриманий хімічним способом, завдяки розчинності у воді та відсутності зміни конформації молекули полісахариду.

60 Спосіб одержання препарату здійснюють у наступному порядку. Водонерозчинний β-глюкан клітинних стінок хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* обробляють

мультиферментним препаратом Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція), що має переважно ендо-1,4- β -ксиланазну та ендо-1,3(4)- β -глюканазну активності. Ферментний препарат попередньо очищають від супутніх йому вуглеводних речовин. Ферментативний гідроліз проводять при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $\text{pH } 6$. Варіюючи концентрацією ферменту у розчині (0,25-0,5 мг/см³), тривалістю ферментолізу (24-72 годин) і співвідношенням фермент:субстрат (E:S-1:(15-45)). Після закінчення гідролізу суміш кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 $^{\circ}\text{C}$. Отриманий препарат являє собою порошок білого кольору.

Приклад № 1.

При одержанні препарату, який заявляється, 100 мг водонерозчинного β -глюкану заливають 26,4 см³ ферментного препарату Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція) концентрацією 0,25 мг/см³ та проводять гідроліз при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $\text{pH } 6$ впродовж 24 годин. Після закінчення гідролізу суміш кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 $^{\circ}\text{C}$. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану та молекулярно-масовий розподіл представлено у таблицях 1 та 2 відповідно.

Приклад № 2.

При одержанні препарату, який заявляється, 100 мг водонерозчинного β -глюкану заливають 13,3 см³ ферментного препарату Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція) концентрацією 0,25 мг/см³ та проводять гідроліз при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $\text{pH } 6$ впродовж 24 годин. Після закінчення гідролізу суміш кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 $^{\circ}\text{C}$. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану та молекулярно-масовий розподіл представлено у таблицях 1 та 2 відповідно.

Приклад № 3.

При одержанні препарату, який заявляється, 100 мг водонерозчинного β -глюкану заливають 26,4 см³ ферментного препарату Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція) концентрацією 0,25 мг/см³ та проводять гідроліз при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $\text{pH } 6$ впродовж 48 годин. Після закінчення гідролізу суміш кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 $^{\circ}\text{C}$. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану та молекулярно-масовий розподіл представлено у таблицях 1 та 2 відповідно.

Приклад № 4.

При одержанні препарату, який заявляється, 100 мг водонерозчинного β -глюкану заливають 13,3 см³ ферментного препарату Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція) концентрацією 0,25 мг/см³ та проводять гідроліз при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $\text{pH } 6$ впродовж 48 годин. Після закінчення гідролізу суміш кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 $^{\circ}\text{C}$. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану та молекулярно-масовий розподіл представлено у таблицях 1 та 2 відповідно.

Приклад № 5.

При одержанні препарату, який заявляється, 100 мг водонерозчинного β -глюкану заливають 26,4 см³ ферментного препарату Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція) концентрацією 0,25 мг/см³ та проводять гідроліз при $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $\text{pH } 6$ впродовж 72 годин. Після закінчення гідролізу суміш кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 $^{\circ}\text{C}$. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану та молекулярно-масовий розподіл представлено у таблицях 1 та 2 відповідно.

Приклад № 6.

При одержанні препарату, який заявляється, 100 мг водонерозчинного β -глюкану заливають 13,3 см³ ферментного препарату Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція) концентрацією 0,25 мг/см³ та проводять гідроліз при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $\text{pH } 6$ впродовж 72 годин. Після закінчення гідролізу суміш кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 $^{\circ}\text{C}$. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану та молекулярно-масовий розподіл представлено у таблицях 1 та 2 відповідно.

Приклад № 7.

При одержанні препарату, який заявляється, 100 мг водонерозчинного β -глюкану заливають 4,4 см³ ферментного препарату Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція) концентрацією 0,5 мг/см³ та проводять гідроліз при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $\text{pH } 6$ впродовж 24 годин. Після закінчення гідролізу суміш

кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 °С. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану та молекулярно-масовий розподіл представлено у таблицях 1 та 2 відповідно.

5 Приклад № 8.

При одержанні препарату, який заявляється, 100 мг водонерозчинного β-глюкану заливають 4,4 см³ ферментного препарату Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція) концентрацією 0,5 мг/см³ та проводять гідроліз при T = 37 °С і рН 6 впродовж 48 годин. Після закінчення гідролізу суміш кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 °С. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану та молекулярно-масовий розподіл представлено у таблицях 1 та 2 відповідно.

10 Приклад № 9.

При одержанні препарату, який заявляється, 100 мг водонерозчинного β-глюкану заливають 13,3 см³ ферментного препарату Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція) концентрацією 0,5 мг/см³ та проводять гідроліз при T = 37 °С і рН 6 впродовж 72 годин. Після закінчення гідролізу суміш кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 °С. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану та молекулярно-масовий розподіл представлено у таблицях 1 та 2 відповідно.

20 Приклад № 10.

При одержанні препарату, який заявляється, 100 мг водонерозчинного β-глюкану заливають 6,7 см³ ферментного препарату Rovabio Excel AP (АВЕНТИС, Франція) концентрацією 0,5 мг/см³ та проводять гідроліз при T = 37 °С і рН 6 впродовж 72 годин. Після закінчення гідролізу суміш кип'ятять впродовж 15 хвилин для інактивації ферменту, центрифугують при 8000 об./год. 15 хвилин, та супернатан висушують при температурі 50 °С. Вихід водорозчинних продуктів деструкції глюкану та молекулярно-масовий розподіл представлено у таблицях 1 та 2 відповідно.

Таблиця 1

Вихід водорозчинних вуглеводів, % маси вихідного полісахариду за прикладами № 1-10

№ зразка	Концентрація E, мг/см ³	Тривалість ферментолізу, год.	Співвідношення E:S	Вихід водорозчинних вуглеводів, %
1	0,25	24	1:15	75,1±1,1
2			1:30	74,7±1,1
3		48	1:15	89,3±1,1
4			1:30	86,1±1,1
5		72	1:15	90,3±1,1
6			1:30	88,1±1,1
7	0,5	24	1:45	48,7±1,1
8		48	1:45	56,8±1,1
9		72	1:15	65,0±1,1
10			1:30	68,1±1,1

30

Молекулярно-масовий розподіл водорозчинних продуктів ферментолізу,
% співвідношення за прикладами № 1-10

№ зразка	Молекулярна маса, кДа		
	>30	1-30	<1
1	37,0±0,5	56,6±0,5	6,4±0,5
2	31,9±0,5	62,4±0,5	5,7±0,5
3	31,7±0,5	44,7±0,5	23,6±0,5
4	21,2±0,5	67,1±0,5	11,7±0,5
5	15,7±0,5	57,4±0,5	26,9±0,5
6	21,5±0,5	52,5±0,5	26,0±0,5
7	15,7±0,5	57,4±0,5	26,9±0,5
8	15,7±0,5	57,4±0,5	26,9±0,5
9	17,4±0,5	76,1±0,5	6,5±0,5
10	13,5±0,5	80,5±0,5	6,0±0,5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 1. Спосіб одержання водорозчинного β -глюкану, який характеризується тим, що водонерозчинний β -глюкан клітинних стінок хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* піддають ферментативному гідролізу шляхом обробки його мультиферментним препаратом Rovabio Excel AP при концентрації ферменту у розчині 0,25-0,5 мг/см³ протягом 24-72 годин і співвідношенні фермент:субстрат 1:(15-45), після гідролізу суміш кип'ятять 15 хвилин, супернатан відокремлюють і сушать.
- 10 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ферментативний гідроліз проводять при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $\text{pH} = 6$.

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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