



УКРАЇНА

(19) UA (11) 92033 (13) C2
(51) МПК (2009)
C07K 14/415МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІНГІБІТОРА АМІЛАЗИ

1

2

(21) а200804746

(22) 14.04.2008

(24) 27.09.2010

(46) 27.09.2010, Бюл.№ 18, 2010 р.

(72) КРУСІР ГАЛИНА ВСЕВОЛОДІВНА, КУШНІР
НАДІЯ АНАТОЛІЇВНА(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

(56) CA A1 5027180, 05.01.1992.

UA U 35845, 10.10.2008.

Rocher A. et al.: "Identification on the three major
celiac immunoreactive proteins and one alpha-
amylase inhibitor from oat endosperm", FEBS Lett.
1992 Sep 21; 310(1):37-40.Taufel A et al.: "Alpha-amylase inhibitors and soluble
dietary fiber in rye: partial purification and effect on
postprandial glycemia", Z Ernahrungswiss (ISSN:
0044-264X), 1996 Jun; Volume: 35 (Issue:2), page
199-205 (ABSTRACT).

UA U 39690, 10.03.2009.

Rekha MR, Padmaja G "Alpha-amylase inhibitor
changes during processing of sweet potato and taro
tubers", Pland Foods Hum Nutr. 2002 Fall; 57(3-
4):285-94 (ABSTRACT).(57) Спосіб одержання інгібітору амілази, що пе-
редбачає обробку компонента зерна вівса екстра-
гентом, відокремлення осаду, обробку осаду екст-
рагентом, хроматографічне очищення виділеного
білка і сушіння цільового продукту, який **відрізня-**
ється тим, що як компонент зерна вівса викорис-
товують борошєця вівса, які обробляють бікар-
бонатним буферним розчином при рН =7,0-11,0,
відокремлюють осад і фракціюють білки подвійною
обробкою сульфатом амоніаку, після чого вида-
ляють сульфат амонію і здійснюють очищення
білка афінною хроматографією.

Винахід відноситься до біотехнології, зокрема
до технології одержання інгібітора амілази із зер-
нових продуктів.

Найближчим до винаходу, що заявляється, є
спосіб одержання інгібітора амілази з ендосперма
вівса (див. A. Rocher, F. Colilla, M. L. Ortiz and E.
Mendez. Identification of the three major celiac
immunoreactive proteins and one α -amylase inhibitor
from oat endosperm.// FEBS 1992, v. 310, №1, p.37-
40.).

Виділення проводили за схемою:

Інгібітор вилучали з ендосперма зерна вівса,
яке подрібнили і розтерли з 10 об'ємами петро-
лейного ефіру (1 година, при кімнатній температу-
рі). Білки екстрагували сумішшю хлороформ : ме-
танол (2:1), по відношенню до осаду 3:10, (1
годину при кімнатній температурі), потім суміш
видаляли під вакуумом.

Сухий осад екстрагували 20 мл 0,5 М бікарбо-
нату амонію при постійному перемішуванні впро-
довж 12 годин при кімнатній температурі. Осад
відділили від супернатанта центрифугуванням
(1700об/хв., 10хв.). Осад промили двічі (по 10 мл)
розчином бікарбонату амонію й ліофілізували.
Потім розчинений екстракт і осад піддавали висо-
корідинній хроматографії (RP-HPLC) на колонці

Nucleosil C 4 (8 × 250мм) та елюїрували з градієн-
том ацетонітрила, який містив 0,1% трихлороцтову
кислоту або на колонці HPLC з Superose 6 або 12
(10 × 300мм). Десорбцію проводили 0,1% трихло-
роцтовою кислотою зі швидкістю 0,3 мл/хв. Актив-
ність інгібітора складає 32%.

Даний спосіб обрано прототипом.

Прототип і винахід, що заявляється, мають та-
кі спільні ознаки:

- обробка компонента зерна вівса екстраген-
том;

- відокремлення осаду;
- обробка осаду екстрагентом;
- хроматографічне очищення виділеного білка;
- сушіння цільового продукту.

Але, спосіб за прототипом має такі недоліки:

В прототипі в якості джерела інгібітора амілаз
використовували ендосперм зерна вівса, тобто
цінний харчовий продукт. В нашій роботі в якості
джерела інгібітора амілаз використовується побіч-
ний продукт переробки зерна вівса - борошєця
вівса, які утворюються як відходи виробництва при
отриманні харчового продукту. Борошєця вівса є
дешевим джерелом інгібітора амілаз.

Для знежирення у прототипі використовували
петролейний ефір і процес вели протягом 1 години

(13) C2

(11) 92033

(19) UA

при кімнатній температурі, що не може повністю звільнити сировину від ліпідної складової, тобто таке знежирення є частковим. В способі, що пропонується, знежирення проводили в апараті Сокслета, що дозволяє багаторазово чистим розчинником (багаторазова екстракція) провести повне знежирення борошенець вівса.

В прототипі додатково використовується екстракція сумішшю хлороформ : метанол (2:1) по відношенню до осаду 3:10 при кімнатній температурі. Потім суміш розчинників видаляється під вакуумом, тобто в якості екстрагенту використовували дорогі та токсичні органічні розчинники хлороформ та метанол. Крім цього, для їх видалення необхідно використовувати вакуумний апарат, що значно удорожує технологію. Використання органічних розчинників при кімнатній температурі для екстракції білкових речовин, які володіють біологічною активністю, тобто ферменти та їх інгібітори, супроводжується повною втратою їх біологічної активності, тому екстракцію ферментів та їх інгібіторів необхідно проводити тільки за дуже низьких температур: $(-18 \div -20) ^\circ\text{C}$ та з мінімальним часом контакту розчинника з сировиною.

Виділення інгібітора за методом прототипу вимагає використання складного приладу - високорідинного хроматографа на колонці Nucleosil C4 з використанням токсичних органічних розчинників. В способі, що пропонується, використовується фракціювання сульфатом амоніаку з подальшою афінною хроматографією супернатанту на колонці з дешевим сорбентом, що не потребує складного апаратурного оформлення.

Активність інгібітора, який вилучено за прототипом складає 32%, що значно менше, ніж активність інгібітора, виділеного за методом, що патентується (38%).

В основу винаходу поставлено задачу створити удосконалений спосіб одержання інгібітора амілази, в якому шляхом заміни вихідної сировини, а також умов екстрагування та очищення білка, забезпечити вилучення інгібітора α -амілази з максимальною антиамілолітичною активністю.

Поставлена задача вирішена в спосіб одержання інгібітора амілази, що передбачає обробку компонента зерна вівса екстрагентом, відокремлення осаду, обробку осаду екстрагентом, хроматографічне очищення виділеного білка і сушку цільового продукту тим, що, як компонент зерна вівса, використовують борошенеця вівса, які обробляють бікарбонатним буферним розчином при $\text{pH}=7,0-11,0$, відокремлюють осад і фракціонують білки подвійною обробкою сульфатом амоніаку, після чого видаляють сульфат амоніаку і здійснюють очищення білка афінною хроматографією.

Новим у винаході, що заявляється, є наявність таких ознак:

- використання борошенець вівса в якості компонента зерна вівса;
- умови екстрагування;
- очищення білка афінною хроматографією.

Причиною-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак і досягнення технологічного результату можна пояснити наступним: вилучення інгібітора панкреатичної α -амілази з максимально

можливою антиамілолітичною активністю базується на досягненні максимального ступеню очищення інгібітора за рахунок використання найбільш ефективного специфічного екстрагенту - бікарбонатного буферу, подвійного використання неорганічних (тобто, більш фізіологічних) реактивів та найбільш ефективної афінної хроматографії, в основу якої покладена спорідненість інгібітора до ферменту.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Борошенеця вівса попередньо знежирюють 10-ма об'ємами петролейного ефіру в апараті Сокслета. Екстракцію інгібітора панкреатичної амілази з борошенець вівса проведено 0,1 М бікарбонатним буфером, $\text{pH } 7,0-11,0$, який містить 0,15 М NaCl (гідромодуль 5) при постійному перемішуванні на магнітній мішалці (число обертів 5000 об/хв) при кімнатній температурі протягом 1 години. Осад відокремлюють від супернатанту за допомогою центрифугування при швидкості 8000 обертів за хвилину впродовж 20 хвилин. Фракціювання супернатанту проводять сульфатом амоніаку з масовими концентраціями солі між 40 і 75%. Отриманий осад розчинюють у дистильованій воді. Суспензію білка поміщають в пористу мембрану і діалізують проти 500 мл дистильованої води впродовж 3 днів. Отриманий зразок центрифугують при 5000 об/хв впродовж 30 хвилин.

Супернатант піддають афінній хроматографії. Супернатант наносять на колонку ($1 \times 15\text{см}$) з сорбентом: панкреатична амілаза - сефароза 4В зі швидкістю 15 мл/год. Після закінчення насичення сорбенту, яке контролюють за появою в фільтраті інгібіторної активності по відношенню до тваринної α -амілази, гель промивають 0,05 М трис/HCl буфером, $\text{pH } =8,0$. Потім гель в колонці проминають послідовно 1 М розчином NaCl та 8 М сечовиною в 0,05 М трис/HCl буфері, $\text{pH}=8,0$. Десорбцію інгібітора проводять 10^{-3} М розчином HCl. Активну фракцію нейтралізують до $\text{pH}=8,0$ 1 М розчином NaOH й ліофільно висушують. Активність інгібітора складає 38%.

Приклад 1.

Борошенеця вівса попередньо знежирюють 10-ма об'ємами петролейного ефіру в апараті Сокслета. До 100 г борошенець вівса додають 500 мл 0,1 М бікарбонатного буферу, $\text{pH } 9,2$, який містить 0,15 М NaCl. Екстракцію проводять при постійному перемішуванні на магнітній мішалці (число обертів 5000 об/хв) при кімнатній температурі впродовж 1 години. Осад відокремлюють за допомогою центрифугування при швидкості 8000 об/хв впродовж 20 хвилин. До екстракту додають 11,56 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Осад відокремлюють центрифугуванням, до супернатанту додають 19,08 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, осад відокремлюють центрифугуванням. До одержаного осаду додають 30 мл дистильованої води. Суспензію білка поміщають в пористу мембрану і діалізують проти 500 мл дистильованої води впродовж 3 днів. Проводять афінну хроматографію на колонку ($1 \times 15\text{см}$) з сорбентом: панкреатична амілаза - сефароза 4В наносять супернатант зі швидкістю 15 мл/хв. Після закінчення насичення сорбенту, яке контролюють за появою в фільтраті інгібіторної активності по відношенню до тваринної

α -амілази, гель промивають 0,05 М трис/HCl буфером, рН =8,0 (50 мл). Потім гель в колонці промивають послідовно 1 М розчином NaCl (20 мл) та 8 М сечовиною в 0,05 М трис/HCl буфері, рН =8,0 (32 мл). Десорбцію інгібітора проводять 10^{-3} М розчином HCl (80 мл). Активну фракцію нейтралізують до рН =8,0 1 М розчином NaOH й ліофільно висушують.

Приклад 2.

Здійснюють аналогічно прикладу 1, але екстракцію проводять бікарбонатним буфером з діапазоном рН середовища 7,0-11,0. Отримані дані наведені в таблиці.

Таблиця

Вплив рН бікарбонатного буферу на антиамілолітичну активність інгібітора	
рН бікарбонатного буферу	Активність інгібітора амілази, %
7,0	28,5
8,0	35
9,2	38
10,0	33,8
11,0	28

Як видно з даних, наведених в таблиці, оптимальне значення рН є 9,2, при цьому екстрагується білок з найбільшою інгібіторною активністю по відношенню до панкреатичної α -амілази.