



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110734** (13) **C2**  
(51) МПК

**A61K 36/06** (2006.01)

**B01D 11/02** (2006.01)

**A23L 29/30** (2016.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2014 05456**

(22) Дата подання заявки: **22.05.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на винахід: **10.02.2016**

(41) Публікація відомостей  
про заявку: **25.11.2015, Бюл.№ 22**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.02.2016, Бюл.№ 3**

(72) Винахідник(и):

**Черно Наталія Кирилівна (UA),  
Озоліна Софія Олександрівна (UA),  
Нікітіна Олександра Валеріївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ  
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,  
вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги  
експертизою:

Черно Н. К. Фракціонування полісахаридів  
гливи звичайної *Pleurotus ostreatus* / Н. К.  
Черно, С. О. Озоліна, О. В. Нікітіна //  
Харчова наука і технологія. - 2013. - № 4. -  
С. 30-34

UA 83530 C2, 25.07.2008

Radzki W. Water soluble polysaccharides  
content in three species of edible and  
medicinal mushrooms: *Lentinula edodes*,  
*Pleurotus ostreatus*, *Agaricus blazei* / W.

Radzki, J. Kalbarczyk // *Herba Polonica*. -  
2010. - Vol. 56. - № 4. - P. 31-38

RU 2189825 C1, 27.09.2002

WO 2009017463 A2, 05.02.2009

WO 02085950 A1, 31.10.2002

Synytsya A. Glucans from fruit bodies of  
cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and  
*Pleurotus eryngii*: structure and potential  
prebiotic activity / A. Synytsya, K. Mickova, A.  
Synytsya, I. Jablonsky, J. Spevacek, V. Erban  
// *Carbohydrate Polymers*. - 2009. - Vol. 76. -  
№ 4. - P. 548-556

Arbaayah H.H. Antioxidant properties in the  
oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) and split  
gill mushroom (*Schizophyllum commune*)  
ethanolic extracts / H.H. Arbaayah, Y.U.  
Kalsom // *Mycosphere*. - 2013. - Vol. 4. - №  
4. - P. 661-673

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ДОБАВКИ ТА ВОДОРОЗЧИННИХ ПОЛІСАХАРИДІВ**

(57) Реферат:

Винахід належить до способу одержання функціональної добавки та водорозчинних полісахаридів, який полягає в тому, що попередньо висушену та подрібнену гливу звичайну обробляють 67-73 % розчином етанолу при температурі 60-70 °C і гідромодулі 10, протягом 30-40 хвилин періодично перемішують, відокремлений від супернатанту осад промивають 67-73 %

UA 110734 C2

розчином етанолу, відділяють супернатант, одержані супернатанти змішують, видаляють етанол, суспензію висушують та відокремлюють функціональну добавку, осад, що утворився після обробки подрібненої гливи звичайної етанолом, обробляють дистильованою водою при температурі 93-97 °С, гідромодулі 10 протягом 55-65 хвилин, суспензію охолоджують до кімнатної температури, осад, відокремлений від супернатанту, обробляють дистильованою водою при температурі 93-97 °С, гідромодулі 10 протягом 55-65 хвилин, суспензію охолоджують до кімнатної температури, відділяють супернатант, обидва супернатанти об'єднують, концентрують та підкислюють льодяною оцтовою кислотою до рН=5, від одержаної суміші відокремлюють супернатант, а осаджені водорозчинні полісахариди розчиняють у дистильованій воді, діалізують та ліофільно висушують.

Винахід належить до біотехнології, зокрема до способу одержання з гливи звичайної функціональної добавки, що проявляє антиоксидантні та біфідогенні властивості, та водорозчинних полісахаридів.

Відомий спосіб одержання етанольного екстракту з гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus*) (див. Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts [Text] / Arbaayah H.H. and Umi Kalsom Y. // *Mycosphere*.-2013. Vol. 4(4). - Р. 661-673), який передбачає оброблення 10 г ліофільно висушених грибів 100 см<sup>3</sup> розчину етанолу при температурі 25 °С протягом

24 годин при перемішуванні. Одержану суспензію фільтрують через фільтрувальний папір Whatman № 1. Залишок обробляють двома додатковими порціями розчинів етанолу по 100 см<sup>3</sup> як описано вище. Далі спиртові екстракти об'єднують і концентрують при зниженому тиску при температурі нижче 40 °С для одержання неочищеного екстракту. Неочищений екстракт повторно розчиняють в етанолі для одержання розчину з концентрацією сухих речовин 20 мг/см<sup>3</sup> і зберігають при температурі 4 °С.

Одержаний етанольний екстракт проявляє тільки антиоксидантні властивості.

Відомий спосіб одержання імуностимулюючого глюкану з гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus*) (див. міжнародну заявку WO 02/085950), який передбачає оброблення 20 кг подрібнених ніжок гливи 40 дм<sup>3</sup> 0,05-0,15 %-ого розчину карбонату натрію або калію протягом 1-8 хвилин. Далі суспензію фільтрують, промивають водою. До одержаного осаду додають 200 см<sup>3</sup> води, 80 г NaOH та ретельно перемішують. Після цього реакційну суміш обробляють 2 дм<sup>3</sup> 30 %-ого розчину гідроген пероксиду при температурі 15-25 °С протягом 15-24 годин, постійно перемішуючи. Потім суміш промивають питною водою до нейтрального значення pH середовища. До фільтрату додають 5 дм<sup>3</sup> питної води, яка містить 20 см<sup>3</sup> оцтової кислоти, перемішують та знову промивають 10 дм<sup>3</sup> питної води. Одержану суспензію пропускають через гідравлічний прес, обробляють 20 дм<sup>3</sup> концентрованого розчину етанолу протягом 1 години та фільтрують. Обробку етанолом повторюють двічі. Одержаний препарат сушать при температурі 60 °С та подрібнюють до розміру часток d=500 мкм. Препарат містить 70,0 % глюкану, 0,6 % нітрогену хітину та 1,5 % золи.

Однак даний препарат проявляє тільки імуномодулюючі властивості.

Відомий спосіб одержання водорозчинного полісахариду β-глюкану з плодових тіл вищих базидіоміцетів лікарських грибів *Ganoderma tsugae* var. *janniae* strain Tay-1 (див. міжнародну заявку WO 2009/017463), який передбачає оброблення 1 кг біомаси сухих плодових тіл *Ganoderma tsugae* var. *janniae* strain Tay-1 5 дм<sup>3</sup> 85 %-вим розчином етанолу при кипінні протягом 3 годин. Обробку розчином етанолу повторюють 3 рази. Залишок екстрагують 5 дм<sup>3</sup> води при температурі 100 °С протягом 3 годин. Цю операцію повторюють п'ять разів. Далі розчин діалізують, концентрують випарюванням на роторному випарнику до об'єму приблизно 1 дм<sup>3</sup>. Цей розчин збовтують з 200 см<sup>3</sup> хлороформу та ізоамілового спирту (10:1) протягом 10 хвилин, центрифугують при 10000 об/хв для розділення фаз. Водний шар обробляють таким же чином ще один раз та ліофільно висушують. Одержаний неочищений β-глюкан очищають за допомогою аніонообмінної хроматографії. Вихід β-глюкану складає 1,5 г (0,15 %).

Недоліками цього способу є:

використання розчинів з високою концентрацією спирту для видалення спирторозчинних речовин;

тривалий процес вилучення спирторозчинних та водорозчинних речовин;

використання шкідливих речовин при очищенні водного екстракту від супутніх вуглеводів речовин.

Відомий спосіб одержання β-глюкану з ніжок грибів *Pleurotus ostreatus* (див. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity [Text] / A. Synytsya, K. Mickova, A. Synytsya and oth. // *Carbohydrate Polymers*.-2009. - Vol. 7. -Р. 548-556), який передбачає гомогенізування 200 г ніжок грибів лабораторним диспергатором, обробку одержаного гомогенату 80 %-вим (вага/вага) розчином етанолу, а потім промивання дистильованою водою і екстрагування киплячою водою протягом 6 годин. Далі екстракти інкубують з α-амілазою, яку виділили з *Bacillus* sp. (1:500 об/об), при pH=7 протягом 30 хвилин, щоб видалити α-глюкан. Депротейнізацію проводять за допомогою реагенту Севага (хлороформ/бутанол 4:1, об/об). Після цього депротейнізовані супернатанти піддають діалізу і ліофілізують з одержанням водорозчинної фракції.

Наведений спосіб має ряд недоліків:

тривалий процес вилучення водорозчинних речовин;

для очищення водного екстракту від супутніх вуглеводів речовин застосовують шкідливі речовини;

для видалення  $\alpha$ -глюкану використовують фермент мікробіального походження, застосування якого обмежено в харчовій промисловості внаслідок його високого алергізуючого потенціалу.

Відомий спосіб одержання імуностимулюючого препарату з грибів *Pleurotus ostreatus*, основним компонентом якого є  $\beta$ -D-глюкан, зокрема,  $\beta$ -(1,6)-D-глюкопіранозил і розгалужений  $\beta$ -(1,3)-D-глюкопіран (див. патент РФ № 2189825), який передбачає оброблення 100 г висушених плодових тіл і стром гриба в апараті Сокслета 500 см<sup>3</sup> 85 %-вим розчином етанолу протягом 4 годин для відділення ліпідів. Обробку розчином етанолу повторюють ще один раз. З отриманого осаду виділяють полісахаридну фракцію дворазовою обробкою 350 см<sup>3</sup> киплячої дистильованої води протягом 3-х годин. Одержаний екстракт фільтрують і упарюють під вакуумом, обробляють 85 %-вим розчином етанолу протягом 8 годин. Одержаний осад піддають діалізу, гель-фільтрації та ліофілізації. У результаті одержують 5,8 г порошку світло-жовтого кольору, що містить біологічно активні полісахариди зі стром гливи з молекулярною масою 10-420 кД. Основним компонентом фракції є бета-D-глюкан, зокрема, бета-(1,6)-D-глюкопіранозил і розгалужений бета-(1,3)-D-глюкопіран.

Недоліками цього способу є:

використання розчинів з високою концентрацією спирту для видалення спирторозчинних речовин;

тривалий процес вилучення спирто- і водорозчинних речовин;

високий вміст білка (18,2 %) в отриманому препараті, що призводить до зниження його фізіологічної активності.

Відомий спосіб одержання водорозчинних полісахаридів з ніжок і шапок грибів *Pleurotus ostreatus* (див. Radzki, W. Water soluble polysaccharides content in three species of edible and medicinal mushrooms: *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus blaze* [Text] / W. Radzki, J. Kalbarczyk // *Herba polonica*.-2010. - Vol. 56. - P. 32-37), який передбачає оброблення 5 грамів висушених шапок і ніжок грибів 80 %-вим розчином етанолу при кипінні для видалення низькомолекулярних речовин. Етанольний екстракт видаляють центрифугуванням і нерозчинний залишок суспендують в дистильованій воді (1:50 вага/об'єм). Вилучення водорозчинних полісахаридів проводять при кипінні із зворотним холодильником протягом трьох годин при 100 °C. Одержану суспензію охолоджують і центрифугують. Супернатант, що містить водорозчинні полісахариди, фільтрують через паперовий фільтр і концентрують за допомогою роторного випарника. Потім для осадження водорозчинних полісахаридів до сконцентрованого розчину додають 96 %-вий розчин етанолу (1:3 об'єм/об'єм). Осад збирають центрифугуванням, промивають двічі ацетоном, центрифугують і сушать до постійної маси. Після сушіння препарат подрібнюють в ступці з ацетоном і одержують дрібний порошок коричневого кольору.

Але наведений спосіб має ряд недоліків:

тривалий процес вилучення спирто- і водорозчинних речовин;

низький вміст глюкану (37,3 %) в складі водорозчинних полісахаридів;

високий вміст білка (27,0 %) в отриманому препараті, що призводить до зниження його фізіологічної активності.

З науково-технічної та патентної літератури заявнику невідомі способи одержання з гливи звичайної в одному технологічному циклі двох продуктів: функціональної добавки, що проявляє дві властивості - антиоксидантну та біфідогенну, і водорозчинних полісахаридів з високим вмістом глюкану та низьким вмістом білка.

У зв'язку з цим, жоден із відомих способів не може бути обраний прототипом, а критика кожного окремого способу як прототипу буде некоректною.

В основу винаходу поставлено задачу створити спосіб одержання функціональної добавки та водорозчинних полісахаридів, в якому шляхом зміни умов виконання операцій та введення нових операцій забезпечити одержання двох продуктів: функціональної добавки, що проявляє дві властивості - антиоксидантну та біфідогенну, і водорозчинних полісахаридів з високим вмістом глюкану та низьким вмістом білка.

Поставлена задача вирішена в способі одержання функціональної добавки та водорозчинних полісахаридів, який полягає в тому, що попередньо висушену та подрібнену гливу звичайну обробляють 67-73 %-вим розчином етанолу при температурі 60-70 °C і гідромодулі 10 протягом 30-40 хвилин, періодично перемішуючи, відокремлений від супернатанту осад промивають 67-73 %-вим розчином етанолу, відділяють супернатант, одержані супернатанти змішують, видаляють етанол, суспензію висушують та відокремлюють функціональну добавку, осад, що утворився після обробки подрібненої гливи звичайної етанолом, обробляють дистильованою водою при температурі 93-97 °C, гідромодулі 10

протягом 55-65 хвилин, суспензію охолоджують до кімнатної температури, осад, відокремлений від супернатанту, обробляють дистильованою водою при температурі 93-97 °С, гідромодулі 10 протягом 55-65 хвилин, суспензію охолоджують до кімнатної температури, відділяють супернатант, обидва супернатанти об'єднують, концентрують та підкислюють льодяною оцтовою кислотою до pH=5, від одержаної суміші відокремлюють супернатант, а осади водорозчинні полісахариди розчиняють у дистильованій воді, діалізують та ліофільно висушують.

Технічний результат полягає в тому, що одержана функціональна добавка проявляє дві властивості: відому - антиоксидантну, та нову - біфідогенну, а водорозчинні полісахариди мають підвищений вміст глюкану та знижений вміст білка.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Попередньо висушену та подрібнену гливу звичайну обробляють 67-73 %-вим розчином етанолу при температурі 60-70 °С протягом 30-40 хвилин і гідромодулі 10, періодично перемішуючи. Одержану суміш центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають 67-73 %-вим розчином етанолу і центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержані таким чином супернатанти об'єднують і видаляють з них етанол перегонкою, одержану суспензію висушують.

Одержана функціональна добавка являє собою дрібний порошок світло-коричневого кольору.

Нерозчинний залишок, що залишився після обробки подрібненої гливи звичайної 67-73 %-вим розчином етанолу, обробляють дистильованою водою при температурі 93-97 °С і гідромодулі 10 протягом 55-65 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад, що відокремили, обробляють дистильованою водою при температурі 93-97 °С і гідромодулі 10 протягом 55-65 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Супернатанти, що одержані після 1-ої та 2-ої обробок осадів дистильованою водою, об'єднують, концентрують за допомогою роторного випарника. Концентрат підкислюють льодяною оцтовою кислотою до pH=5 для зниження масової частки білка і меланінів. Осад, що утворився, відокремлюють центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. До одержаного супернатанту додають 96 %-вий розчин етанолу при співвідношенні 1:3, відокремлюють осад центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин, одержаний осад розчиняють у воді, діалізують та ліофільно висушують.

Приклади здійснення способу.

Приклад № 1

100 г попередньо висушеної та подрібненої гливи звичайної обробляють 67 %-вим розчином етанолу при температурі 60 °С протягом 40 хвилин і гідромодулі 10, періодично перемішуючи. Одержану суміш центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають 67 %-вим розчином етанолу і центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержані таким чином супернатанти об'єднують і видаляють з них етанол перегонкою, одержану суспензію висушують.

Одержана функціональна добавка являє собою дрібний порошок світло-коричневого кольору.

Вихід складає 21,4 г (21,4 %).

Нерозчинний залишок, що залишився після обробки подрібненої гливи звичайної 67 %-вим розчином етанолу, обробляють дистильованою водою при температурі 93 °С і гідромодулі 10 протягом 55 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад, що відокремили, повторно обробляють дистильованою водою при температурі 93 °С і гідромодулі 10 протягом 55 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Супернатанти, що одержані після 1-ої та 2-ої обробок осадів дистильованою водою, змішують, концентрують за допомогою роторного випарника. Концентрат підкислюють льодяною оцтовою кислотою до pH=5 для зниження масової частки білка і меланінів. Осад, що утворився, відокремлюють центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. До одержаного супернатанту додають 96 %-вий розчин етанолу при співвідношенні 1:3, відокремлюють осад центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержаний осад розчиняють у воді, діалізують та ліофільно висушують.

Вихід складає 3,1 г (3,1 %).

Приклад № 2

100 г попередньо висушеної та подрібненої гливи звичайної обробляють 67 %-вим розчином етанолу при температурі 70 °C протягом 30 хвилин і гідромодулі 10, періодично перемішуючи. Одержану суміш центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають 67 %-вим розчином етанолу і центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержані таким чином супернатанти об'єднують і видаляють з них етанол перегонкою, одержану суспензію висушують.

Одержана функціональна добавка являє собою дрібний порошок світло-коричневого кольору.

Вихід складає 21,4 г (21,4 %).

Нерозчинний залишок, що залишився після обробки подрібненої гливи звичайної 67 %-вим розчином етанолу, обробляють дистильованою водою при температурі 93 °C і гідромодулі 10 протягом 65 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад, що відокремили, повторно обробляють дистильованою водою при температурі 93 °C і гідромодулі 10 протягом 65 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Супернатанти, що одержані після 1-ої та 2-ої обробок осадів дистильованою водою, змішують, концентрують за допомогою роторного випарника. Концентрат підкислюють льодяною оцтовою кислотою до pH=5 для зниження масової частки білка і меланінів. Осад, що утворився, відокремлюють центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. До одержаного супернатанту додають 96 %-вий розчин етанолу при співвідношенні 1:3, відокремлюють осад центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержаний осад розчиняють у воді, діалізують та ліофільно висушують.

Вихід складає 3,1 г (3,1 %).

#### Приклад № 3

100 г попередньо висушеної та подрібненої гливи звичайної обробляють 70 %-вим розчином етанолу при температурі 65 °C протягом 35 хвилин і гідромодулі 10, періодично перемішуючи. Одержану суміш центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають 70 %-вим розчином етанолу і центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержані таким чином супернатанти об'єднують і видаляють з них етанол перегонкою, одержану суспензію висушують.

Одержана функціональна добавка являє собою дрібний порошок світло-коричневого кольору.

Вихід складає 21,3 г (21,3 %).

Нерозчинний залишок, що залишився після обробки подрібненої гливи звичайної 70 %-вим розчином етанолу, обробляють дистильованою водою при температурі 95 °C і гідромодулі 10 протягом 60 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад, що відокремили, повторно обробляють дистильованою водою при температурі 95 °C і гідромодулі 10 протягом 60 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Супернатанти, що одержані після 1-ої та 2-ої обробок осадів дистильованою водою, змішують, концентрують за допомогою роторного випарника. Концентрат підкислюють льодяною оцтовою кислотою до pH=5 для зниження масової частки білка і меланінів. Осад, що утворився, відокремлюють центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. До одержаного супернатанту додають 96 %-вий розчин етанолу при співвідношенні 1:3, відокремлюють осад центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержаний осад розчиняють у воді, діалізують та ліофільно висушують.

Вихід складає 3,2 г (3,2 %).

#### Приклад № 4

100 г попередньо висушеної та подрібненої гливи звичайної обробляють 73 %-вим розчином етанолу при температурі 60 °C протягом 40 хвилин і гідромодулі 10, періодично перемішуючи. Одержану суміш центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають 73 %-вим розчином етанолу і центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержані таким чином супернатанти об'єднують і видаляють з них етанол перегонкою, одержану суспензію висушують.

Одержана функціональна добавка являє собою дрібний порошок світло-коричневого кольору.

Вихід складає 21,1 г (21,1 %).

Нерозчинний залишок, що залишився після обробки подрібненої гливи звичайної 73 %-вим розчином етанолу, обробляють дистильованою водою при температурі 97 °C і гідромодулі 10 протягом 55 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад, що відокремили, повторно обробляють дистильованою водою при температурі 97 °C і гідромодулі 10 протягом 55 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Супернатанти, що одержані після 1-ої та 2-ої обробки осадів дистильованою водою, змішують, концентрують за допомогою роторного випарника. Концентрат підкислюють льодяною оцтовою кислотою до pH=5 для зниження масової частки білка і меланінів. Осад, що утворився, відокремлюють центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. До одержаного супернатанту додають 96 %-вий розчин етанолу при співвідношенні 1:3, відокремлюють осад центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержаний осад розчиняють у воді, діалізують та ліофільно висушують.

Вихід складає 3,3 г (3,3 %).

#### Приклад № 5

100 г попередньо висушеної та подрібненої гливи звичайної обробляють 73 %-вим розчином етанолу при температурі 70 °C протягом 30 хвилин і гідромодулі 10, періодично перемішуючи. Одержану суміш центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають 73 %-вим розчином етанолу і центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержані таким чином супернатанти об'єднують і видаляють з них етанол перегонкою, одержану суспензію висушують.

Одержана функціональна добавка являє собою дрібний порошок світло-коричневого кольору.

Вихід складає 21,2 г (21,2 %).

Нерозчинний залишок, що залишився після обробки подрібненої гливи звичайної 73 %-вим розчином етанолу, обробляють дистильованою водою при температурі 97 °C і гідромодулі 10 протягом 65 хвилин, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Осад, що відокремили, повторно обробляють дистильованою водою при температурі 97 °C і гідромодулі 10 протягом 65, періодично перемішуючи. Одержану таким чином суспензію охолоджують до кімнатної температури та центрифугують при 3000 об/хв 15 хвилин для відділення осаду від супернатанту. Супернатанти, що одержані після 1-ої та 2-ої обробки осадів дистильованою водою, змішують, концентрують за допомогою роторного випарника. Концентрат підкислюють льодяною оцтовою кислотою до pH=5 для зниження масової частки білка і меланінів. Осад, що утворився, відокремлюють центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. До одержаного супернатанту додають 96 %-вий розчин етанолу при співвідношенні 1:3, відокремлюють осад центрифугуванням при 3000 об/хв 15 хвилин. Одержаний осад розчиняють у воді, діалізують та ліофільно висушують.

Вихід складає 3,3 г (3,3 %).

Хімічний склад функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, наведено у таблиці 1. Біфідогенний ефект функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, наведено у таблиці 2. Антиоксидантну активність функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, наведено у таблиці 3. Хімічний склад водорозчинних полісахаридів, одержаних за прикладами 1-5, наведено в таблиці 4. Моносахаридний склад водорозчинних полісахаридів, одержаних за прикладами 1-5, наведено в таблиці 5.

Умови екстракції спирторозчинних речовин підбирали експериментально. Максимальний вміст спирторозчинних речовин у складі гливи звичайної визначали, проводячи вичерпну екстракцію.

Встановлено, що при обробці гливи звичайної 96 %-вим розчином етанолу вихід спирторозчинних речовин сягає 46,5 % від їх загального вмісту. Це пояснюється тим, що за таких умов не відбувається екстракція низькомолекулярних вуглеводів. Тому застосування розчину етанолу такої концентрації є недоцільним.

Встановлено, що після 30 хвилин експозиції гливи звичайної у 80 %-вому розчині етанолу при температурі кипіння ступінь вилучення екстрактивних речовин сягає 94,8 % від їх загального вмісту. При подовженні тривалості обробки до 45 хвилин спостерігається їх вичерпна екстракція (99,1 %).

При дії на гливу звичайну більш розведеного (70 %-вого) розчину етанолу протягом 30 хвилин при температурі кипіння вихід спирторозчинних речовин майже не змінюється і

становить 93,6 %. Після 45 хвилин експозиції ступінь вилучення спирторозчинних речовин з гливи звичайної досягає тих же значень, що й при використанні 80 %-вого реагенту.

Екстракція 60 %-вим розчином етанолом супроводжується вилученням більшої кількості сухих речовин з гливи звичайної, але їх маса перевищує загальний вміст власне спирторозчинних речовин у сировині за рахунок часткового переходу до складу екстрактів водорозчинних компонентів. Тому застосування 60 %-вого екстрагенту є недоцільним.

Таким чином, при використанні 70 %- та 80 %-вого розчинів етанолу при температурі кипіння ступінь вилучення екстрактивних речовин суттєво не відрізняється між собою. Проте, з економічної точки зору більш раціонально вилучати спирторозчинні речовини з гливи звичайної 67-73 %-вим розчином етанолу.

Для встановлення можливості застосування більш низьких температур для виділення спирторозчинних речовин сировину обробляли 70 %-вим розчином етанолу при температурі 60 та 70 °С. За таких умов вихід екстрактивних речовин наближався до максимального значення після 30-40 хвилин екстракції.

Саме такі режими екстракції спирторозчинних речовин були обрані для виділення функціональних добавок.

Встановлено, що за виходом функціональні добавки, одержані за прикладами 1-5, суттєво не відрізняються між собою. Цей показник варіює в межах 94,2-95,7 % від максимальної кількості спирторозчинних речовин.

Наявність в функціональних добавках, одержаних за прикладами 1-5, двох властивостей - антиоксидантної та біфідогенної пояснюється наступним.

У складі функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, ідентифіковано: низькомолекулярні вуглеводи, представлені переважно трегалозою, цукроспирт маніт, а також нітрогеновмісні і фенольні речовини.

Функціональні добавки, одержані за прикладами 1-5, інтенсифікують метаболічні процеси у мікроорганізмів, зокрема біфідобактерій, які відіграють важливу роль у підтримці гомеостазу організму. При їх додаванні до молока у кількості 2 % тривалість його ферментації скорочувалась у 1,7 разу у порівнянні зі традиційним способом сквашування та практично дорівнювала такій при використанні як біфідогенного фактора 2 %-вого розчину фруктози - моносахариду, який біфідобактерії активно зброджують (13,5 та 13,0 год. відповідно).

Введення до молока функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, як біфідогенних факторів сприяє отриманню ферментованих згустків, в яких кількість життєздатних клітин біфідобактерій у 1,2-1,4 разу перевищує таку в згустках, отриманих при збродженні молока з використанням фруктози, та у 16,3-18,8 разу більше у порівнянні з традиційним способом (табл. 2). При цьому у всіх зразках бактерії мають форму прямих чітких паличок, які наявні у вигляді поодиноких і парних клітин.

Функціональні добавки, одержані за прикладами 1-5, характеризуються високою антиоксидантною активністю. Так, антиоксидантна активність функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, у 1,4 разу перевершує антиоксидантну активність кверцетину за умов однакової їх кількості у складі реакційної суміші. Однак, при концентрації функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, 15 мг/см<sup>3</sup> значення цього показника практично не відрізняється від антиоксидантної активності відомого антиокислювача - аскорбінової кислоти при її концентрації 10 мг/см<sup>3</sup> (97,0-99,2 % та 99,6 % відповідно).

Вплив функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, на процеси вільнорадикального окиснення в живому організмі контролювали за накопиченням малонового діальдегіду. Він разом з іншими продуктами перекисного окиснення ліпідів призводять до порушення структурно-функціональних властивостей клітинних мембран та зниження їх стійкості до дії пероксидних сполук. Внаслідок цього розвивається ціла низка патологічних процесів, які призводять до виникнення різноманітних хвороб та передчасного старіння організму.

Для активізації перекисного окиснення ліпідів щурам-самцям перорально вводили ацетат свинцю в кількості 14,1 мг/кг. Добова доза функціональної добавки складала 50 мг/кг. Тварин утримували на стандартному раціоні з вільним доступом до води та їжі згідно з вимогами, викладеними в книзі "Лабораторні тварини в медико-біологічних експериментах" // В.П. Пішак, В.Г. Висоцька, В.М. Магальяс та ін. - Чернівці: Мед університет, 2006. - 350 с.

Тварини були розділені наступним чином: 1 група - контрольна, що отримувала загальний раціон харчування; 2 група - тварини, що отримували ацетат свинцю; 3 група - тварини, що отримували функціональну добавку, одержану за способом, що заявляється, і ацетат свинцю.

Встановлено, що вміст малонового діальдегіду в крові тварин контрольної групи складав 0,21 нмоль/г тканини, тварин другої групи, що отримували ацетат свинцю, - 0,28 нмоль/г



тканини, а тварин третьої групи, що одночасно отримували ацетат свинцю та функціональну добавку, одержану за способом, що заявляється, - 0,22 нмоль/г тканини. Отже, в присутності функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, вміст малонового діальдегіду зменшився на 21,4 % у порівнянні з групою, експонованою ацетатом свинцю, та наближався до контрольної групи.

Встановлено, що функціональні добавки, одержані за прикладами 1-5, також здатні інгібувати перекисне окиснення ліпідів, яке викликає руйнацію життєво важливих для організму людини есенціальних жирних кислот та накопичення шкідливих продуктів окиснення. В зв'язку з цим, введення функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, до складу продуктів харчування з високим вмістом жирів дозволить попередити зниження їх біологічної цінності та погіршення органолептичних показників. Це дасть змогу виробляти продукти харчування з пролонгованими термінами зберігання.

Таким чином, функціональні добавки, одержані за прикладами 1-5, можуть бути використані як біфідогенні фактори при ферментації молока чистими культурами біфідобактерій та антиоксиданти, що одночасно запобігають накопиченню перекисних радикалів в живому організмі та подовжують терміни зберігання продуктів харчування з високим вмістом жиру.

Ефективність функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, було підтверджено при виготовленні біойогурту, біокефіру та вершкового масла геродієтичного призначення.

Біойогурт готували згідно з ТУ У 25027034-012-99 при наступному співвідношенні вказаних компонентів, мас. %:

функціональна добавка	0,75
симбіотична закваска	0,0020
нормалізована гомогенізована	
пастеризована молочна суміш з	
масовою часткою сухого	
знежиреного молочного	
залишку 10-12 %	решта.

Функціональну добавку вводили на стадії нормалізації незбираного коров'ячого молока.

Внесення функціональної добавки дозволило зменшити тривалість сквашування з 8 до 6 год., при цьому кількість життєздатних клітин молочнокислих бактерій на кінець терміну придатності збільшилася з  $1 \times 10^7$  КУО/см до  $5 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>. Одержаний продукт за фізико-хімічними, органолептичними, мікробіологічними та пробіотичними показниками відповідав вимогам до кисломолочних продуктів з підвищеними функціональними властивостями.

Біокефір готували згідно з ТУ У 25027034-011-99 при наступному співвідношенні вказаних компонентів, мас. %:

функціональна добавка	0,75
симбіотична закваска	0,0020
нормалізоване гомогенізоване	
пастеризоване коров'яче	решта.
молоко	

Функціональну добавку вводили на стадії нормалізації незбираного коров'ячого молока.

Внесення функціональної добавки дозволило зменшити тривалість сквашування з 8 до 6 год., при цьому кількість життєздатних клітин молочнокислих бактерій на кінець терміну придатності збільшилося з  $1 \times 10^7$  КУО/см<sup>3</sup> до  $2 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>. Одержаний продукт за фізико-хімічними, органолептичними, мікробіологічними та пробіотичними показниками відповідав вимогам до кисломолочних напоїв з підвищеними функціональними властивостями.

Вершкове масло готували згідно з ДСТУ 4399:2005 при наступному співвідношенні вказаних компонентів, мас. %:

функціональна добавка	0,95
вершки з коров'ячого молока	решта.

Функціональну добавку вводили на стадії збивання вершків.

При додаванні функціональної добавки до вершкового масла його термін зберігання збільшився з 35 до 45 діб.

Отже, з наведених даних видно, що функціональні добавки, одержані за прикладами 1-5, є ефективними біфідогенними факторами, застосування яких при виготовленні молочних продуктів дозволяє не тільки інтенсифікувати процес їх виробництва, але й підвищити вміст життєздатних клітин молочнокислих бактерій на кінець строку придатності у складі кінцевого продукту в порівнянні з такими, що виготовляють за традиційною технологією. До того ж функціональні добавки, одержані за прикладами 1-5, проявляють також високу антиоксиданту

активність. Завдяки цьому при виготовленні харчових продуктів їх можна використовувати за двома напрямками:

для виробництва функціональних продуктів харчування геродієтичного призначення;

5 для виробництва продуктів харчування з високим вмістом жиру з пролонгованими термінами зберігання.

Високий вміст глюкану та низький вміст білка у водорозчинних полісахаридах, одержаних за прикладами 1-5, можна пояснити наступним.

Відомо, що глюкан є домінуючим полісахаридом в складі водорозчинних полісахаридів грибів. Саме цьому вуглеводу притаманні імуномодулюючі та протипухлинні властивості. 10 Встановлено, що найбільшу фізіологічну активність проявляє водорозчинний глюкан, який містить мінімальну кількість домішок.

При обробці грибів водою при температурі 93-97 °C протягом 55-65 хвилин до складу екстрактів переходить переважно вуглеводна складова гриба, масова частка якої сягає 52,7-53,5 % від загального вмісту сухих речовин в об'єднаній водорозчинній фракції. У її складі також 15 було знайдено білок та меланіни.

При осадженні спиртом сумарної водорозчинної фракції, яку було виділено згідно з прототипом, отримано водорозчинні полісахариди, що містять 67,0-67,5 % вуглеводів, 26,8-27,1 % білків, та 5,8-6,0 % меланінів. В їх гідролізатах ідентифіковано галактозу, глюкозу, манозу та фукозу у молярному співвідношенні (1,1-1,2):(3,8-4,1):(0,9-1,0):(1,0-1,1) відповідно.

20 Отже, водорозчинні полісахариди, одержані за прототипом і відомими способами, містять значну кількість домішок, а масова частка глюкану сягає лише 35,5-39,0 % від сухих речовин водорозчинних полісахаридів.

Вважають, що білок та меланіни існують у вигляді меланопротеїнового комплексу, який осаджується при зниженні рН середовища. Для зменшення масової частки цього комплексу як 25 супутньої водорозчинним полісахаридам речовини водний екстракт підкислювали оцтовою кислотою до рН=5,0. При цьому утворювався осад, в складі якого переважав вказаний комплекс. Це дозволило підвищити масову частку вуглеводів у складі сухих речовин супернатанту в 1,2-1,3 разу.

30 При наступному осадженні було отримано водорозчинні полісахариди, в складі яких зменшилася масова частка домішок (вміст білка не перевищував 6,1 %). При цьому в 1,4 разу підвищився вміст глюкану в складі водорозчинних полісахаридів.

Отже, водорозчинні полісахариди, одержані за прикладами 1-5, характеризуються високим вмістом вуглеводів, масова частка яких сягає 92,0-92,9 % від сухих речовин зразків. 35 Водорозчинні полісахариди, одержані за прикладами 1-5, містять незначну кількість домішок - вміст білка становить лише 5,7-6,1 %. Масова частка глюкану у складі водорозчинних полісахаридів, одержаних за прикладами 1-5, становить 73,6-73,9 %.

Таблиця 1

Хімічний склад функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5

Показник, % від сухих речовин	№ прикладу				
	1	2	3	4	5
Маніт	27,0	26,7	26,5	25,8	26,3
Низькомолекулярні вуглеводи	60,4	60,6	59,6	60,2	59,9
Нітрогеномісні органічні сполуки	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8
Речовини фенольної природи	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7

Таблиця 2

Вплив функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5, на ріст біфідобактерій

Біфідогенний фактор	КУО/см <sup>3</sup>
Функціональна добавка, одержана за прикладом 1	1,3×10 <sup>12</sup>
Функціональна добавка, одержана за прикладом 2	1,4×10 <sup>12</sup>
Функціональна добавка, одержана за прикладом 3	1,4×10 <sup>12</sup>
Функціональна добавка, одержана за прикладом 4	1,5 × 10 <sup>12</sup>
Функціональна добавка, одержана за прикладом 5	1,3×10 <sup>12</sup>
Фруктоза	1,1×10 <sup>12</sup>
Молоко без додавання біфідогенних факторів	0,8×10 <sup>11</sup>

Таблиця 3

Антиоксидантна активність функціональних добавок, одержаних за прикладами 1-5

Показник	№ прикладу				
	1	2	3	4	5
Антиоксидантна активність, %	98,9	99,2	98,1	97,0	97,8

Таблиця 4

Хімічний склад водорозчинних полісахаридів, одержаних за прикладами 1-5

Показник, % від сухих речовин	№ прикладу				
	1	2	3	4	5
Вуглеводи	92,4	92,6	92,9	92,2	92,0
Білок	5,8	5,7	5,9	6,1	6,2

Таблиця 5

Моносахаридний склад водорозчинних полісахаридів, одержаних за прикладами 1-5

№ прикладу	Вміст моносахариду, %			
	Галактоза	Глюкоза	Маноза	Фукоза
1	15,0	73,6	5,9	5,5
2	15,3	73,8	5,8	5,1
3	15,1	73,9	5,7	5,3
4	15,2	73,7	5,8	5,3
5	15,1	73,6	5,9	5,4

5

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб одержання функціональної добавки та водорозчинних полісахаридів, який полягає в тому, що попередньо висушену та подрібнену гливу звичайну обробляють 67-73 % розчином етанолу при температурі 60-70 °С і гідромодулі 10, протягом 30-40 хвилин періодично перемішують, відокремлений від супернатанту осад промивають 67-73 % розчином етанолу, відділяють супернатант, одержані супернатанти змішують, видаляють етанол, суспензію висушують та відокремлюють функціональну добавку, осад, що утворився після обробки подрібненої гливи звичайної етанолом, обробляють дистильованою водою при температурі 93-97 °С, гідромодулі 10 протягом 55-65 хвилин, суспензію охолоджують до кімнатної температури, осад, відокремлений від супернатанту, обробляють дистильованою водою при температурі 93-97 °С, гідромодулі 10 протягом 55-65 хвилин, суспензію охолоджують до кімнатної температури, відділяють супернатант, обидва супернатанти об'єднують, концентрують та підкислюють льодяною оцтовою кислотою до рН=5, від одержаної суміші відокремлюють супернатант, а осаджені водорозчинні полісахариди розчиняють у дистильованій воді, діалізують та ліофільно висушують.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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