



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107173** (13) **C2**  
(51) МПК  
**A23C 11/10** (2006.01)  
**C08B 37/08** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	<b>а 2014 05453</b>	(72) Винахідник(и): <b>Черно Наталія Кирилівна (UA), Озоліна Софія Олександрівна (UA), Нікітіна Олександра Валеріївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>22.05.2014</b>	(73) Власник(и): <b>ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>25.11.2014</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2005/0236328 A1, 27.10.2005 RU 2393228 C2, 27.06.2010 SU 1575552 A1, 20.01.1997 UA 85872 U, 10.12.2013 EP 1397389 B1, 10.08.2005 UA 50194 A, 15.10.2002 RU 2121505 C1, 10.11.1998 WO 93/12243 A1, 24.06.1993 GB 2259709 A, 24.03.1993 US 4368322 A, 11.01.1983
(41) Публікація відомостей про заявку:	<b>25.09.2014, Бюл.№ 18</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.11.2014, Бюл.№ 22</b>	

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ДІЄТИЧНОЇ ДОБАВКИ

### (57) Реферат:

Винахід належить до біотехнології, зокрема до способу одержання дієтичної добавки з печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*), що проявляє широкий спектр функціональної дії. Попередньо зважені і подрібнені некондиційні печериці заливають 0,9-1,1 %-вим розчином гідроксиду натрію і витримують при 75-80 °С протягом 30-60 хв і гідромодулі (1-2), періодично перемішуючи, одержану суміш центрифугують при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. До осаду, що утворився, додають 6,9-7,1 %-вий розчин гідроксиду натрію, витримують 255-265 хв при 95-98 °С і гідромодулі (1-2), суміш центрифугують при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують при 6000 об./хв 15 хв, висушують та подрібнюють до розміру часток d=500 мкм. Заявлений спосіб забезпечує одержання готового продукту, що проявляє антацидну активність на заданому рівні та високі функціонально-фізіологічні властивості.

UA 107173 C2



Винахід належить до біотехнології, зокрема до способу одержання дієтичної добавки з печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*), що проявляє широкий спектр функціональної дії.

Відомий спосіб одержання хітиновмісного та хітозановмісного полісахаридів з печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*) (див. патент US 2005/0236328 A1). Спосіб одержання хітиновмісного полісахариду передбачає додавання до очищених від бруду грибів розчину, що містить 1 % яблучної кислоти та 0,1 % аскорбінової кислоти, та перемішування двічі отриманої таким чином суміші в змішувачі протягом 30 секунд, витримування суміші на водяній бані з температурою 100 °C протягом 120 хв при періодичному перемішуванні, фільтрування суспензії, промивання отриманого осаду водою, додавання до розчиненого в воді осаду 1 н розчину NaOH, нагрівання отриманої суспензії на водяній бані при температурі 60 °C протягом 20 хв, фільтрування, промивання чистою водою та етанолом отриманого осаду, суспендування в воді, нейтралізацію одержаної суспензії 1 н розчином HCl, центрифугування, суспендування отриманого осаду в 99 %-вому розчині етанолу, фільтрування, промивання одержаного осаду розчином етанолу, видалення залишку етанолу та висушування.

Спосіб одержання хітозановмісного полісахариду передбачає оброблення хітиновмісного полісахариду 50 %-вим розчином NaOH при температурі 90 °C протягом 2 годин при періодичному перемішуванні, центрифугування суспензії, суспендування одержаного осаду в 10 %-вому розчині оцтової кислоти, витримування його протягом ночі, центрифугування розчину для отримання супернатанту, розчинення одержаного після центрифугування осаду в 10 %-вому розчині оцтової кислоти, додавання отриманого екстракту до супернатанту, доведення pH об'єднаного супернатанту до 10, центрифугування одержаної суміші, промивання осаду водою тричі, центрифугування та висушування одержаного осаду. Одержаний препарат містить 55,0 % глюкозаміну.

Недоліком одержання хітиновмісного полісахариду є те, що готовий продукт не проявляє антацидні властивості та має низьку антиоксидантну активність через відсутність у його складі хітозану. Спосіб одержання хітозановмісного полісахариду не враховує можливості використання супутніх полісахаридів біологічно активних сполук (меланінів та хітину), що обумовлює низьку сорбційну активність препарату до сполук стероїдної природи та незначний біфідогенний ефект. Окрім того, цей спосіб є екологічно небезпечним, оскільки він передбачає використання концентрованих розчинів агресивних реагентів, та складним за виконанням.

Окрім того, відомий спосіб одержання хітиновмісного волокнистого матеріалу (див. патент РФ 1575552). Хітинглюканмеланіновий волокнистий матеріал з гриба *Inonotus dryophilus*, що росте в природних умовах, одержують шляхом суспендування повітряно-сухої міцеліальної маси в воді з температурою 80 °C, гомогенізування отриманої суспензії, оброблення одержаного після фільтрування осаду 3 %-вим розчином NaOH при температурі 60 °C протягом 2 годин при інтенсивному перемішуванні, фільтрування суміші, додавання до осаду води, нейтралізацію залишку лугу, триразове промивання волокнистої маси дистильованою водою при інтенсивному перемішуванні, фільтрування суміші, додавання до одержаного осаду розчину етилового спирту, фільтрування, оброблення осаду ацетоном, оброблення одержаного після фільтрування осаду етиловим ефіром, фільтрування суспензії та висушування. Одержаний хітинглюканмеланіновий матеріал має темно-коричневий колір, пухку пружну консистенцію і складається з волокон довжиною від 3 до 40 мм, діаметр волокон від 1,5 до 4 мкм. Він містить 70,0 % хітину, 20,0 % глюкану та 10,0 % меланінів.

За цим способом також одержують хітозанглюканмеланіновий волокнистий матеріал з гриба *Inonotus dryophilus* шляхом замочування повітряно-сухої міцеліальної маси в воді з температурою 80 °C, додавання до суміші 0,05 % прального порошку, гомогенізування отриманої суспензії, оброблення відділеної від води міцеліальної маси 3 %-вим розчином NaOH при температурі 60 °C протягом 1 години при постійному перемішуванні, фільтрування, оброблення одержаного осаду 30 %-вим розчином NaOH в атмосфері азоту при температурі 80 °C протягом 2 годин при інтенсивному перемішуванні, фільтрування, додавання до одержаного осаду води, перемішування, проведення нейтралізації лугу соляною кислотою, триразове промивання осаду дистильованою водою, фільтрування, оброблення отриманого осаду розчинами етанолу, ацетону, ефіром та висушування. Вміст хітозану в складі отриманого препарату становить 71,0 %, меланінів 12,0 %, глюканів 17,0 %. Одержаний волокнистий матеріал має темно-коричневий колір, пухку пружну консистенцію і складається з волокон довжиною від 3 до 40 мм. Діаметр волокон 3-9 мкм з переважанням волокон діаметром 5 мкм, товщина стінок волокна від 0,5 до 4 мкм.

Недоліком одержання хітинглюканмеланінового волокнистого матеріалу з гриба *Inonotus dryophilus* є низький вміст в складі препарату глюкану та відсутність хітозану, що обумовлює незначний біфідогенний ефект, невелику антиоксидантну активність, низьку сорбційну активність

до іонів важких металів та відсутність антацидних властивостей. Окрім того, гриби, що ростуть в природних умовах, здатні накопичувати в своєму складі небезпечні для організму людини екотоксиканти. Запропонований спосіб також характеризується складністю процесу, що пов'язано з використанням великої кількості різноманітних хімічних реагентів.

5 Спосіб одержання хітозанглюканмеланінового волокнистого матеріалу з гриба *Inonotus dryophilus* має ряд недоліків: даний препарат проявляє недостатньо високу сорбційну активність до сполук стероїдної природи та незначний біфідогенний ефект; він передбачає використання концентрованих розчинів агресивних реагентів, що негативно впливає на навколишнє середовище.

10 Окрім того, відомий спосіб одержання харчових волокон з гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus*) (див. патент РФ 2393228), який передбачає глибинне культивування базидіальних грибів *Pleurotus ostreatus* на живильному середовищі наступного складу (г/дм<sup>3</sup>): соєве борошно - 21,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -3,5,  $\text{MgSO}_4$ -0,4, молочна сироватка - 200 см<sup>3</sup>, вода - до 1 дм<sup>3</sup>. піддавання отриманого міцелію глибокому заморожуванню з подальшим розморожуванням, дезінтеграцію, очищення харчових волокон, яке здійснюють послідовною обробкою холодною і гарячою водою, сумішшю 1 М розчину карбонату натрію або гідроксиду натрію з етанолом у співвідношенні 1:2 і 0,5 М розчину лимонної кислоти. Вихід харчових волокон становить 16-18 % від сухої біомаси, вміст хітину - 16,0-19,0 %, глюкану - 40,0-50,0 % від сухої маси харчових волокон.

15 Недоліком способу є те, що одержаний препарат характеризується низькою фізіологічною активністю. Окрім того, даний спосіб передбачає заморожування сировини з наступним розморожуванням, що ускладнює процес отримання препарату та потребує наявності дорогих екологічно небезпечних морозильних установок.

20 Суттєвим недоліком всіх відомих способів одержання хітиновмісних препаратів є те, що вони не проявляють антацидні властивості. Це обумовлює неможливість їх застосування при терапії кислотозалежних захворювань. В той же час хітозановмісні препарати, одержані за відомими способами, характеризуються надвисокими показниками антацидної активності: вони підвищують рН шлункового соку до 6,5-7,0. Це, в свою чергу, призводить до порушення процесів травлення, зокрема розщеплення білкових речовин, оскільки за таких умов відбувається зниження активності протеолітичних ферментів шлункового соку до мінімального значення.

30 Найближчим до способу, що заявляється, є спосіб одержання поліфункціональної дієтичної добавки з некондиційних грибів (див. патент на корисну модель UA № 85872), що передбачає додавання до попередньо зважених і подрібнених некондиційних печериць води з гідромодулем 1:(1-2) і витримування при 75-80 °C протягом 30-60 хв при періодичному перемішуванні, центрифугування одержаної суміші при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. Додавання до осаду, що утворився, 3 %-ого розчину гідроксиду натрію, витримування 120-270 хв при 95-98 °C і гідромодулі 1:(1-2), центрифугування суміші при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. Промивання осаду водою тричі і центрифугування при 6000 об./хв 15 хв, сушіння почергово етанолом і ефіром та подрібнення до розміру часток  $d=500$  мкм. Дієтичні добавки містять 77,9-84,5 % полісахаридів, в тому числі 15,6-16,4 % хітину, 8,7-9,9 % білка та 3,1-3,4 % меланінів.

Даний спосіб вибрано прототипом.

Прототип і спосіб, що заявляється, мають наступні спільні ознаки (операції):

- обробка грибів;
- 45 - відокремлення осаду;
- обробка осаду водним розчином гідроксиду натрію;
- промивання осаду водою;
- сушіння;
- подрібнення.

50 Але спосіб за прототипом має ряд суттєвих недоліків:

- низький вміст хітину, відсутність у складі препаратів його модифікованих форм (хітозану) та низький вміст меланінів обумовлює обмежений спектр дії препаратів;

- наявність у складі препаратів високого вмісту білка, який закриває активні центри полісахаридів, призводить до зниження ефективності препаратів.

55 В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб одержання дієтичної добавки, в якому шляхом введення попередньої лужної обробки та заміни 3 %-ого розчину гідроксиду натрію на 6,9-7,1 %-ий розчин гідроксиду натрію забезпечити одержання готового продукту, який містить в своєму складі таке співвідношення компонентів в заданій формі, що дозволить йому проявляти антацидні властивості на заданому рівні та характеризуватися підвищеною фізіологічною активністю.

Поставлена задача вирішена в способі одержання дієтичної добавки, що передбачає обробку грибів, відокремлення осаду, обробку його водним розчином гідроксиду натрію, промивання осаду водою, сушіння і подрібнення, тим, що, на відміну від прототипу, печериці заливають 0,9-1,1 %-вим розчином гідроксиду натрію і витримують при 75-80 °С протягом 30-60

5 хв і гідромодулі (1-2), одержану суміш центрифугують, до осаду, що утворився, додають 6,9-7,1 %-вий водний розчин гідроксиду натрію, витримують 255-265 хв при 95-98 °С і гідромодулі (1-2), суміш центрифугують, осад, що утворився, промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують, а відокремлений осад висушують.

Заявнику невідомі способи одержання препаратів, до складу яких входить амінополісахарид з таким ступенем ацетилювання, що дозволяє цьому препарату проявляти антацидні властивості на заданому рівні.

Принциповою відмінністю винаходу, що заявляється, є те, що сировину попередньо обробляють розчином лугу концентрацією 0,9-1,1 % при температурі 75-80 °С протягом 30-60 хв, а потім витримують в 6,9-7,1 % розчині гідроксиду натрію при температурі 95-98 °С протягом 255-265 хв. Такий порядок проведення операцій дозволяє модифікувати певні функціональні

15 групи амінополісахаридів в заданому напрямку та очистити дієтичну добавку від білка, який обмежує можливість контакту полісахаридів та меланінів з продуктами обміну і ксенобіотиками, що, в свою чергу, значно знижує ефективність його застосування.

З науково-технічної та патентної літератури заявнику невідомо, що такі режими обробки дозволяють одержати дієтичну добавку, яка проявляє антацидну активність на заданому рівні та високі функціонально-фізіологічні властивості.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Попередньо зважені і подрібнені некондиційні печериці заливають 0,9-1,1 %-вим розчином гідроксиду натрію і витримують при 75-80 °С протягом 30-60 хв і гідромодулі (1-2), періодично

25 перемішуючи, одержану суміш центрифугують при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. До осаду, що утворився, додають 6,9-7,1 %-вий розчин гідроксиду натрію, витримують 255-265 хв при 95-98 °С і гідромодулі (1-2), суміш центрифугують при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують при 6000 об./хв 15 хв, висушують та

30 подрібнюють до розміру часток  $d=500$  мкм.

Одержана поліфункціональна дієтична добавка являє собою дрібний порошок коричневого кольору і за хімічним складом є біополімерним комплексом.

Приклади здійснення способу.

Приклад № 1

35 1 кг подрібнених некондиційних печериць заливають  $1000\text{ см}^3$  1,1 %-вого розчину гідроксиду натрію і витримують при 75 °С протягом 30 хв, періодично перемішуючи, одержану суміш центрифугують при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. До осаду, що утворився, додають  $1000\text{ см}^3$  6,9 %-вого розчину гідроксиду натрію, витримують 255 хв при 95 °С, суміш центрифугують при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від

40 супернатанту. Осад промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують при 6000 об./хв 15 хв, висушують та подрібнюють до розміру часток  $d=500$  мкм.

Приклад № 2

45 1 кг подрібнених некондиційних печериць заливають  $2000\text{ см}^3$  1,0 %-вого розчину гідроксиду натрію і витримують при 80 °С протягом 60 хв періодично перемішуючи, одержану суміш центрифугують при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. До осаду, що утворився, додають  $2000\text{ см}^3$  7,0 %-вого розчину гідроксиду натрію, витримують 260 хв при 98 °С, суміш центрифугують при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують при 6000 об./хв 15 хв, висушують та подрібнюють до розміру часток  $d=500$  мкм.

50 Приклад № 3

1 кг подрібнених некондиційних печериць заливають  $1000\text{ см}^3$  0,9 %-вого розчину гідроксиду натрію і витримують при 75 °С протягом 60 хв періодично перемішуючи, одержану суміш центрифугують при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. До осаду, що утворився, додають  $2000\text{ см}^3$  7,1 %-вого розчину гідроксиду натрію, витримують 265

55 хв при 98 °С, суміш центрифугують при 6000 об./хв протягом 15 хв для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують при 6000 об./хв 15 хв, висушують та подрібнюють до розміру часток  $d=500$  мкм.

Хімічний склад дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, наведено у таблиці 1. Характеристику функціонально-фізіологічних властивостей дієтичних добавок, одержаних за

прикладами 1-3, наведено в таблиці 2, 3 та 4. За зразок порівняння було вибрано дієтичну добавку, одержану за прототипом.

Умови виділення дієтичних добавок підбирали експериментально. Для цього встановлювали вплив концентрації розчину лугу та тривалості обробки на функціонально-фізіологічні властивості дієтичних добавок.

Для цього була отримана низка дієтичних добавок за наступними прикладами.

Приклад № 4

Попередню обробку сировини проводять згідно з прикладом № 2. Далі осад, що утворився, обробляють 7,0 %-вим розчином гідроксиду натрію та витримують одержану суміш протягом 60 хв при 98 °С. Наступні операції здійснюються згідно з прикладом № 2.

Приклад № 5

Попередню обробку сировини проводять згідно з прикладом № 2. Далі осад, що утворився, обробляють 7,0 %-вим розчином гідроксиду натрію та витримують одержану суміш протягом 120 хв при 98 °С. Наступні операції здійснюються згідно з прикладом № 2.

Приклад № 6

Попередню обробку сировини проводять згідно з прикладом № 2. Далі осад, що утворився, обробляють 7,0 %-вим розчином гідроксиду натрію та витримують одержану суміш протягом 180 хв при 98 °С. Наступні операції здійснюються згідно з прикладом № 2.

Приклад № 7

Попередню обробку сировини проводять згідно з прикладом № 2. Далі осад, що утворився, обробляють 7,0 %-вим розчином гідроксиду натрію та витримують одержану суміш протягом 240 хв при 98 °С. Наступні операції здійснюються згідно з прикладом № 2.

Приклад № 8

Попередню обробку сировини проводять згідно з прикладом № 2. Далі осад, що утворився, обробляють 7,0 %-вим розчином гідроксиду натрію та витримують одержану суміш протягом 300 хв при 98 °С. Наступні операції здійснюються згідно з прикладом № 2.

Приклад № 9

Попередню обробку сировини проводять згідно з прикладом № 2. Далі осад, що утворився, обробляють 5,0 %-вим розчином гідроксиду натрію та витримують одержану суміш протягом 300 хв при 98 °С. Наступні операції здійснюються згідно з прикладом № 2.

Приклад № 10

Попередню обробку сировини проводять згідно з прикладом № 2. Далі осад, що утворився, обробляють 9,0 %-вим розчином гідроксиду натрію та витримують одержану суміш протягом 180 хвилин при 98 °С. Наступні операції здійснюються згідно з прикладом № 2.

Дієтичні добавки, одержані за прикладами 1-3, характеризуються приблизно однаковою кількістю глюкану та амінополісахариду, в той же час дієтичні добавки, одержані за прототипом, містять в 3,9-4,2 разу більше глюкану, ніж амінополісахариду. При цьому масова частка меланінів в складі дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, в 3,9-4,4 рази більше в порівнянні з дієтичними добавками, одержаними за прототипом. Дієтичні добавки, одержані за прикладами 1-3, містять в 2,6-3,1 разу менше білка, ніж дієтичні добавки, одержані за прототипом. Дієтичні добавки, одержані за прикладами 4-7, характеризуються низькою масовою часткою амінополісахариду. При цьому вони містять значну кількість білкових речовин. Співвідношення компонентів в складі дієтичної добавки, одержаної за прикладом 8, і дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, практично не відрізняється, що обумовлює недоцільність використання більш тривалої лужної обробки. Дієтична добавка, одержана за прикладом 9, характеризується високим вмістом білка, а кількість амінополісахариду та меланінів значно менша. Масова частка амінополісахариду в складі дієтичної добавки, одержаної за прикладом 10, збільшується при одночасному зниженні вмісту глюкану, меланінів та білка.

У складі гідролізатів полісахаридів ідентифіковано глюкозу і глюкозамін - моносахарид, який є структурною ланкою амінополісахариду. Отже, вуглеводну компоненту дієтичних добавок представлено двома полімерами: глюканом і амінополісахаридом в різному співвідношенні.

Відомо, що амінополісахарид існує у двох формах: хітину та хітозану. До хітину відносять амінополісахарид зі ступенем ацетилювання більше 50,0 %, а хітозану - менше 50,0 %.

Ступінь ацетилювання амінополісахариду в складі дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, становить 34,9-36,7 %, а в дієтичних добавках, одержаних за прототипом, - 78,2-71,7 %. Згідно із значенням цього показника в дієтичних добавках, одержаних за прикладами 1-3, амінополісахарид є хітозаном, в дієтичних добавках, одержаних за прототипом, - хітином. Ступінь ацетилювання амінополісахариду в складі дієтичних добавок, одержаних за

прикладами 4-7, становить 49,6-41,0 %, за прикладом 8-33,8 %, за прикладом 9-58,3 %, за прикладом 10-27,6 %.

В ІЧ-спектрах дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, ідентифіковані характерні для хітозану смуги поглинання  $953\text{ см}^{-1}$ . Наявність смуги поглинання при  $1655\text{ см}^{-1}$  свідчить про те, що хітин знаходиться в  $\alpha$ -формі. Присутність в ІЧ-спектрах дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, смуги поглинання при  $890\text{ см}^{-1}$  (при одночасній відсутності смуги поглинання при  $830\text{ см}^{-1}$ , яка відповідає  $\alpha$ -конфігурації глікозидного зв'язку) підтверджує, що в молекулах обох полісахаридів - як хітозану, так і глюкана, залишки моносахаридів з'єднуються  $\beta$ -зв'язком. В ІЧ-спектрі виявлено характерні для  $\beta$ -(1-3)-глюкана смуги поглинання при 2920, 1370, 1230 і  $1200\text{ см}^{-1}$ . На підставі цих даних можна стверджувати, що у складі дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, присутній  $\beta$ -(1-3)-глюкан. В ІЧ-спектрах знайдено типові для меланінів смуги поглинання в області  $1610\text{-}1590\text{ см}^{-1}$ , які відповідають коливанню кільця ароматичних сполук, і близько  $1400\text{ см}^{-1}$ , обумовлені присутністю карбонільної групи хінонів.

До найважливіших функціонально-фізіологічних властивостей препаратів відносять: антацидні властивості, біфідогенний ефект, антиоксидантну активність, сорбційну активність щодо продуктів обміну і деяких екотоксикантів, водоутримуючу, жирозв'язуючу здатності (ВУЗ та ЖЗЗ).

Зниження величини рН шлункового соку в присутності дієтичних добавок відбувається за рахунок утворення солей хлороводневої кислоти з вільними аміногрупами полісахариду. Отже, із зменшенням ступеня ацетилювання амінополісахаридів збільшується здатність дієтичних добавок зв'язувати хлороводневу кислоту, що, в свою чергу, призводить до підвищення рН шлункового соку.

Введення 50 мг дієтичних добавок, одержаних за прототипом, до  $100\text{ см}^3$  шлункового соку не супроводжується істотною зміною рН системи навіть після 6 годин експозиції. Така ж тенденція спостерігається при дослідженні антацидних властивостей дієтичних добавок, одержаних за прикладами 4-6, препаратів, одержаних за патентом US 2005/0236328 A1, патентом РФ 1575552, патентом РФ 2393228. Це пояснюється тим, що присутній у складі цих препаратів амінополісахарид майже не містить вільних аміногруп. Через наявність у складі дієтичної добавки, одержаної за прикладами 7 і 9, амінополісахариду з відносно низьким ступенем ацетилювання вони проявляють дещо вищі антацидні властивості. У їх присутності інтрагастральне рН після 120 хв експозиції становить 2,5 та 3,6 відповідно. Проте такі зміни рівня рН вважаються недостатньо ефективними для препаратів з антацидними властивостями. Значення рН шлункового соку при введенні до нього отриманих за патентом US 2005/0236328 A1 та патентом РФ 1575552 хітозановмісних препаратів, у яких ступінь ацетилювання амінополісахариду становить близько 14,7-17,0 %, протягом 60 хвилин підвищується до 6,7, а при внесенні дієтичної добавки, одержаної за прикладом 10, - 6,5. Такі високі показники рН середовища є небажаними, оскільки в цих умовах інгібуються процеси розщеплення білкових речовин, що призводить до їх гниття та інтоксикації організму. У присутності дієтичної добавки, одержаної за прикладом 8, рівень рН шлункового соку підвищується несуттєво в порівнянні з дієтичними добавками, одержаними за прикладами 1-3, і становить 4,2. Це свідчить про недоцільність використання більш тривалої лужної обробки.

Хітозан у складі дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, характеризується таким ступенем ацетилювання, що їх введення до шлункового соку змінює рН реакційної суміші до таких рекомендованих значень, які досягаються при застосуванні антацидних препаратів, що найбільш широко використовуються при лікуванні кислотозалежних захворювань. Так, при введенні 50 мг дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, до  $100\text{ см}^3$  шлункового соку його рН збільшується з 1,9 до 4,0 протягом 90 хв і далі стабілізується на цьому рівні. Хімічна природа зв'язування хлороводневої кислоти дієтичними добавками, одержаними за прикладами 1-3, дозволяє віднести їх до категорії антацидів, що не всмоктуються, і тому вважаються найбільш безпечними.

Антиоксидантна активність дієтичних добавок залежить від вмісту в їх складі меланінів та хітозану. Це обумовлює те, що при однаковій кількості у складі суспензії дієтичні добавки, одержані за прикладами 1-3, характеризуються більш високим значенням цього показника, ніж дієтичні добавки, одержані за прототипом та за прикладами 4-7 і 9. З ростом кількості дієтичних добавок у складі реакційної суміші ефективність їх дії зростає, що пов'язано зі збільшенням масової частки реакціноздатних сполук. Однак, на відміну від дієтичних добавок, одержаних за прототипом, при вмісті дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, у кількості 40 мг антиоксидантна активність досягає практично максимального значення і при подальшому збільшенні їх масової частки у складі реакційної суміші майже не змінюється. За такою концентрацією антиоксидантна активність дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3,

еквівалентна 10 мг аскорбінової кислоти, яка широко використовується в харчовій промисловості як інгібітор окислення (98,7 % та 99,4 % відповідно).

Дієтичні добавки, одержані за прикладами 1-3, здатні інтенсифікувати метаболічні процеси біфідобактерій. Ступінь прояву ними біфідогенного ефекту визначається вмістом в їх складі глюкозу, але значення має також масова частка фракції, що гідролізується розбавленими розчинами мінеральних кислот. Дієтичні добавки, одержані за прикладами 1-3, містять в 1,6-1,7 разу менше глюкозу, ніж дієтичні добавки, одержані за прототипом, проте масова частка легкогідролізованого глюкозу складає 35,7-36,1 % від сухих речовин. Це пояснює те, що в присутності дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, ріст типового представника роду біфідобактерій - *Bifidobacterium bifidum* складає  $1 \times 10^{12}$  КУО/см<sup>3</sup>. Значення цього показника при використанні дієтичних добавок, одержаних за прототипом, який містить 46,4-57,6 % легкогідролізованого глюкозу, дещо вище і сягає  $(2-3) \times 10^{12}$  КУО/см<sup>3</sup>. Через низький вміст легкогідролізованого глюкозу та низьку його доступність ріст біфідобактерій в присутності дієтичних добавок, одержаних за прикладами 4-7, складає лише  $(2-5) \times 10^{11}$  КУО/см<sup>3</sup>. В присутності дієтичних добавок, одержаних за прикладами 8, 10, ріст біфідобактерій є незначним, оскільки вони практично не містять легкогідролізованого глюкозу через вилучення цієї фракції при їх виділенні.

Механізм сорбції іонів полівалентних металів полягає в утворенні хелатів при їх взаємодії з низькою функціональних груп - аміногруп, фенольних гідроксилів, карбоксилів. Сорбційна активність дієтичних добавок корелює із вмістом зазначених груп у їх складі. Дієтичні добавки, одержані за прикладами 1-3, в порівнянні з дієтичними добавками, одержаними за прототипом, характеризуються більш високою масовою часткою меланінів та амінополісахариду. Останній, на відміну від амінополісахариду, що входить до складу дієтичних добавок, одержаних за прототипом, містить у своєму складі значну кількість вільних аміногруп. На здатність дієтичних добавок зв'язувати іони полівалентних металів також впливає доступність полімерів, яка зростає за рахунок очищення їх від білкових речовин. Тому вона вища у дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3. Сукупність вищевикладеного обумовлює більш високу сорбційну ємність дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, до іонів Pb<sup>2+</sup> в порівнянні з дієтичними добавками, одержаними за прототипом, за прикладом 9, US 2005/0236328 A1.

Серед сполук, які входять до складу дієтичних добавок, найбільшою сорбційною активністю по відношенню до сполук стероїдної природи - жовчаних кислот, які є попередником холестерину, характеризуються меланіни. Оскільки дієтичні добавки, одержані за прикладами 1-3, містять більше меланінів, ніж дієтичні добавки, одержані за прототипом та прикладами 9-10, тому вони більш ефективно зв'язують жовчаних кислоти.

За показниками ВУЗ та ЖЗЗ дієтичні добавки, одержані за прикладами 1-3, значно перевищують дієтичні добавки, одержані за прототипом. Отже, дієтичні добавки, одержані за прикладами 1-3, більшою мірою активізують функціонування органів травлення та попереджують всмоктування ліпідів, що сприяє нормалізації ваги людини.

Таким чином, дієтичні добавки, одержані за прикладами 1-3, на відміну від дієтичних добавок, одержаних за прототипом та за прикладами 4-10, проявляють антацидні властивості на заданому рівні при одночасно високій фізіологічній активності.

Ефективність дії отриманих дієтичних добавок досліджували в умовах *in vivo* на білих щурах-самцях, у яких викликали інтоксикацію свинцем шляхом перорального введення ацетату свинцю в кількості 14,1 мг/кг. Добова доза дієтичної добавки складала 200 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. Магальс та ін. - Чернівці: Мед університет, 2006. - 350 с.

Експериментальні дослідження проводили відповідно до вимог біоетики згідно з національними "Загальними етичними принципами експериментів на тваринах", що викладені в "Загальних етичних принципах експериментів на тваринах" (документ, розроблений робочою групою Конгресу під керівництвом чл.-кор. НАН і АМН України О.Г. Резнікова) // Ендокринологія. - 2003. - Т. 8. - № 1. - С. 142-145, які узгоджуються з положеннями "European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes" - Council of Europe, Strasbourg, 1986. - 53 p.

Досліджували такі показники: морфометричні - вивчення динаміки зміни маси тіла тварин протягом експерименту (зважування тварин проводили до і після закінчення експерименту); фізіологічні - вивчення поведінкових реакцій тварин у тесті "Відкрите поле" (до експерименту, на другому тижні і після закінчення експерименту); біохімічні - після виведення тварин з експерименту в сироватці крові визначалася показники ліпідного обміну (загальні ліпіди, холестерин, тригліцериди, а також активність ферментів, що характеризують функціональний



стан гепатобіліарної системи: аланін- і аспартатамінотрансферази), в тканинах печінки визначали стан систем антиоксидантного захисту (глутатіонредуктази (ГР), глутатіонпероксидази (ГП), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ)), рівень перекисного окиснення ліпідів оцінювали за зміною показника малонового діальдегіду (МДА)).

5 Тварини були розділені наступним чином: 1 група - контрольна, що отримувала загальний раціон харчування; 2 група - тварини, що перорально отримували дієтичну добавку, одержану за прикладом 2; 3 група - тварини, що отримували ацетат свинцю; 4 група - тварини, що отримували дієтичну добавку і ацетат свинцю.

Результати досліджень наведено в табл. 5-7.

10 Введення в раціон харчування лабораторним тваринам дієтичної добавки позитивно впливало на показники морфометрії - динаміка приросту маси тіла тварин в даній експериментальній групі була вище, ніж у контролі на 20,1 %. Пероральне надходження в організм тварин солі свинцю знижувало показники приросту маси тіла в даній групі на 24,3 % відносно групи тварин, які отримували дієтичну добавку. У групі, що перорально одержувала

15 дієтичну добавку і ацетат свинцю, відмічено зниження приросту маси тіла на 14,2 % в порівнянні з тваринами, які отримували тільки дану добавку (табл. 5).

На першому етапі дослідження відзначені достовірні відмінності в прояві горизонтальній активності між тваринами різних груп, що пов'язано з індивідуально-типологічних особливостями поведінкових реакцій у різних особин. Тому порівняння даних показників в

20 кожній групі тварин проводилося відносно їх фонових значень. Після 2-х тижнів експерименту в контрольній групі тварин не відзначено значних (достовірних) змін у порівнянні з початком експерименту. В 2-й групі тварин підвищилася локомоторна активність - кількість вертикальних стійок у тварин збільшилася на 33,1 % відносно фонових показників, отриманих у цієї ж групи тварин до експерименту. У групі, експонованої

25 ацетатом свинцю, відзначена тенденція до пригнічення показників локомоторної та дослідницької активності, що вказує на ймовірність розвитку нейротоксичних ефектів в цій групі. Подальша експозиція ацетатом свинцю викликає достовірне зниження показників горизонтальної, вертикальної активності на 31,8 і 53,0 % відповідно. Одночасне надходження в організм солі свинцю і дієтичної добавки не викликає зміни показників поведінкових реакцій

30 тварин відносно контролю.

Встановлено, що прийом дієтичної добавки не впливає на рівень загальних ліпідів у крові тварин. Експозиція ацетатом свинцю підвищує їх вміст на 52,4 % відносно контролю, а одночасне надходження в організм солі свинцю і дієтичної добавки достовірно знижує вміст загальних ліпідів на 14,2 %. Вміст тригліцеридів у сироватці крові при прийомі дієтичної добавки

35 мало тенденцію до зниження. Надходження солі свинцю з питною водою протягом місяця достовірно збільшувало вміст тригліцеридів в крові практично вдвічі. Одночасне надходження в організм солі свинцю і дієтичної добавки достовірно знижує вміст тригліцеридів на 18,9 % відносно групи, що одержувала свинець. Достовірне підвищення на 39,5 % рівня холестерину

40 виявлено у тварин, експонованих ацетатом свинцю, а в групі, що одержувала одночасно дієтичну добавку і ацетат свинцю, відмічено достовірне зниження даного показника на 18,9 % відносно групи, що одержувала свинець.

Після виведення тварин з експерименту в сироватці крові вивчали активність амінотрансфераз (АСТ і АЛТ) та їх співвідношення, які є маркерним показником функціонального стану гепатобіліарної системи, відповідальної за процеси детоксикації

45 ксенобіотиків в організмі і є основним органом, де відбуваються процеси анаболізму і катаболізму ліпідів.

Підвищена активність АЛТ виявлена в групі тварин, експонованих ацетатом свинцю - ріст на 27,1 %, при цьому коефіцієнт де Рітца - відношення АСТ/АЛТ - зменшився на 14,8 %. У групі, що одержувала одночасно дієтичну добавку і ацетат свинцю, АСТ і АЛТ знаходилися на рівні

50 значень контрольної групи.

Достовірна активація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) виявлена в групі, експонованої ацетатом свинцю. Так, кількість МДА підвищилася на 25,0 %, а в групі, що одночасно одержувала ацетат свинцю і дієтичну харчову добавку, стан прооксидантних систем знаходився на рівні достовірно нижче на 12,0 % відносно групи, експонованої свинцем. Одночасно з

55 активацією ПОЛ, в групі, експонованої ацетатом свинцю, відзначена активація ГП на 21,1 %, а в групі, що одержувала одночасно дієтичну добавку і ацетат свинцю, - на 47,4 %. Активність НАДФ-Н2 - залежною ГР підвищувалася сімфазно з ГР в групі, експонованої ацетатом свинцю, на 17,1 % ( $p < 0,05$ ), а в групі, що одержувала одночасно дієтичну добавку і ацетат свинцю, - на 47,6 %. Одночасно в цих групах спостерігалася підвищення активності Г-6-ФДГ на 33,1 і 59,6 %

60 відповідно.

Таким чином, введення в раціон харчування щурам дієтичної добавки протягом 1-го місяця позитивно впливало на показники морфометрії: динаміка приросту маси тіла тварин в даній експериментальній групі була вище, ніж у контролі. Відзначено достовірне зниження маси тіла у тварин, які отримували протягом місяця з питною водою ацетат свинцю, а також позитивна динаміка стабілізації маси у тварин, які отримували одночасно дієтичну добавку і сіль свинцю. У динаміці експерименту в групі тварин, які отримували дієтичну добавку, відзначено підвищення показників, що характеризують локомоторну та дослідницьку активність. У групі тварин, експонованих ацетатом свинцю, виявлено зворотну спрямованість - достовірне зниження даних показників як відносно контрольної групи, так і відносно фонових показників. Одночасне надходження в організм солі свинцю і дієтичної добавки сприяло стабілізації показників поведінкових реакцій тварин, що характеризують функціональний стан нервової системи, найбільш чутливою до впливу негативних факторів.

Ліпідний обмін - один з центральних ланок інтермедіарного і клітинного метаболізму, тому дослідження його основних ланок є чутливим маркером при розвитку різних метаболічних дисфункцій. Прийом дієтичної добавки суттєво не впливав на рівень вмісту загальних ліпідів, тригліцеридів і холестерину в крові тварин, відзначено лише тенденцію до їх зниження. Моделювання свинцевої інтоксикації у тварин викликало значне підвищення цих показників у крові, що може бути пов'язано з інтенсифікацією ліпідного обміну і свідчити про підвищення енергетичних витрат організму, викликаних тривалим надходженням в організм ксенобіотиків і активацією систем їх детоксикації. Одночасне надходження в організм солі свинцю і дієтичної добавки достовірно знижує вміст загальних ліпідів, тригліцеридів і холестерину відносно групи, що одержувала тільки свинець. Введення в раціон тварин дієтичної добавки не викликало зміну показників АЛТ і АСТ, що може характеризувати стабільність функціонування основних метаболічних систем і підтверджувати безпеку застосування препарату. Підвищену активність АЛТ виявлено тільки в групі тварин, експонованих ацетатом свинцю. У групі, що одержувала одночасно дієтичну добавку і ацетат свинцю, спостерігалася стабілізація даних показників.

Позитивний вплив на функціонування антиоксидантних систем організму підтверджується на моделі свинцевої інтоксикації і одночасного прийому дієтичної добавки. Експозиція свинцем викликала у тварин підвищення перекисного окиснення ліпідів з одночасною активацією систем антирадикального захисту (ГП і ГР). Прийом дієтичної добавки на фоні експозиції свинцю викликає стабілізацію показників перекисного окиснення ліпідів з одночасною, більш вираженою активацією ферментів антиоксидантної системи.

Таким чином, дієтичні добавки, одержані за способом, що заявляється, за своїм складом і властивостям відносяться до біополімерних природних ентеросорбентів. На відміну від дієтичної добавки, одержаної за прототипом, вони містять амінополісахарид із заданим ступенем ацетилювання та характеризуються підвищеним вмістом меланінів при одночасно низькому вмісті супутніх білкових речовин. Це обумовлює здатність дієтичних добавок, одержаних за способом, що заявляється, проявляти антицидні властивості на заданому рівні та високу антиоксидантну активність. Окрім того, вони є ефективними сорбентами сполук стероїдної природи, іонів полівалентних металів та стимуляторами росту мікроорганізмів.

В дослідях *in vivo* підтверджено ефективність застосування дієтичних добавок при дії на організм факторів, у патогенезі пошкодження яких важлива роль належить оксидативному стресу, а також тих, що призводять до порушення ліпідного обміну і діяльності центральної нервової системи.

Таблиця 1

Хімічний склад дієтичних добавок,  
одержаних за прикладами 1-10, та дієтичної добавки, одержаної за прототипом

№ прикладу	Вміст компонентів, %			
	Глюкан	Амінополісахарид	Білок	Меланіни
1	39,9	39,8	3,3	13,5
2	39,8	39,9	3,2	13,6
3	39,9	39,9	3,3	13,4
4	48,4	19,4	11,4	16,2
5	47,9	22,9	10,9	15,6
6	45,4	27,5	8,7	14,3
7	44,1	34,2	4,4	13,8

Продовження таблиці 1

8	38,8	42,3	3,0	12,6
9	53,2	28,2	6,4	9,1
10	27,4	58,2	2,8	8,4
Дієтична добавка, одержана за прототипом	62,0	15,9	9,9	3,2

Таблиця 2

Вплив дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, 7, 9, 10, та дієтичної добавки, одержаної за прототипом, на значення pH шлункового соку

Препарат	Тривалість експозиції, хв						
	0	30	60	90	120	150	180
Дієтична добавка, одержана за прикладом 2	1,9	2,8	3,6	4,0	4,0	4,0	4,0
Дієтична добавка, одержана за прототипом	1,9	1,95	2,0	2,0	2,0	2,0	2,2
Дієтична добавка, одержана за прикладом 7	1,90	2,25	2,90	3,50	3,70	3,70	3,70
Дієтична добавка, одержана за прикладом 9	1,90	2,15	2,30	2,50	2,50	2,50	2,50
Дієтична добавка, одержана за прикладом 10	1,90	3,90	4,70	5,80	6,90	6,90	6,90

Таблиця 3

Антиоксидантна активність дієтичної добавки, одержаної за прикладом 2, та дієтичної добавки, одержаної за прототипом, залежно від їх маси в складі реакційної суміші

Маса зразка, г	Антиоксидантна активність, %	
	Дієтична добавка, одержана за прикладом 2	Дієтична добавка, одержана за прототипом
0,01	21,4	11,3
0,02	37,1	26,2
0,03	83,3	69,1
0,04	97,2	81,8
0,05	98,7	88,4

Таблиця 4

Функціонально-фізіологічні властивості дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, та дієтичної добавки, одержаної за прототипом

Показники	№ прикладу			Дієтична добавка, одержана за прототипом
	1	2	3	
Водоутримуюча здатність, г H <sub>2</sub> O/г дієтичної добавки	6,4	6,3	6,5	4,6
Жирозв'язуюча здатність, г олії/г дієтичної добавки	2,3	2,4	2,2	1,9
Сорбція іонів Pb <sup>2+</sup> , мг Pb <sup>2+</sup> /г дієтичної добавки	20,9	20,7	20,6	11,7
Сорбція холевої кислоти, мг холевої кислоти/г дієтичної добавки	25,8	26,0	25,9	20,0

Таблиця 5

Динаміка зміни маси тіла тварин при проведенні експерименту

Група	Середня маса тварини до експерименту	Середня маса тварини після експерименту
1	213,7±1,90	246,75±1,46
2	218,7±3,40	258,25±3,40
3	217,80±2,00	248,90±2,77
4	218,80±2,50	252,75±3,19

Таблиця 6

Дослідження поведінкових реакцій тварин

Група	Горизонтальна активність	Вертикальна активність	Норковий рефлекс	Грумінг	Емоції (кількість болюсів)
До початку експерименту					
1	24,5±2,9	10,8±1,0	1,5±0,9	2,5±0,7	2,9±0,6
2	22,8±2,2	13,9±1,0	1,6±0,3	2,1±0,4	1,9±0,3
3	21,4±1,8	13,2±1,4	1,7±0,2	2,1±0,3	2,8±0,5
4	20,0±1,1	10,2±0,9	1,8±0,2	2,7±0,3	2,2±0,4
Через два тижні після початку експерименту					
1	24,6±2,3	10,2±1,3	2,0±0,3	2,1±0,3	2,1±0,3
2	24,5±2,7	18,5±0,9	1,8±0,3	1,7±0,3	1,5±0,2
3	16,5±1,6	10,6±1,2	1,5±0,3	2,2±0,3	2,8±0,6
4	18,8±1,6	11,0±1,5	1,5±0,1	2,5±0,3	2,1±0,2
Через чотири тижні після початку експерименту					
1	19,1±1,8	9,2±1,2	1,5±0,1	2,1±0,2	2,6±0,7
2	20,2±2,0	16,1±2,0	1,7±0,4	1,3±0,3	1,6±0,3
3	14,6±0,9	6,2±0,2	2,0±0,2	1,6±0,1	2,9±0,3
4	20,2±1,0	10,58±0,9	2,0±0,3	2,3±0,4	3,0±0,4

Таблиця 7

Результати дослідження впливу дієтичної добавки на деякі біохімічні показники тварин

Показник	Група			
	1	2	3	4
Загальні ліпіди, г/л	4,66	4,64	7,10	6,09
Тригліцериди, г/л	0,74	0,70	1,59	1,29
Холестерин, ммоль/л	1,14	1,08	1,59	1,29
АСТ, од./хв	66,35	62,42	79,01	66,06
АЛТ, од./хв	26,84	27,28	34,12	28,81
МДА, нмоль/г тканини	0,20	0,19	0,27	0,23
Білок, мг/мл	12,0	11,1	10,6	10,9
ГП, кмоль/мг білка*хв	0,19	0,22	0,23	0,28
ГР, нмоль НАДФН <sub>2</sub> /хв мг білка	0,82	0,83	0,96	1,21
Г-б-ФДГ, нмоль/мг білка	4,48	4,56	5,96	7,15

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

Спосіб одержання дієтичної добавки, що передбачає обробку грибів, відокремлення осаду, обробку його водним розчином гідроксиду натрію, промивання осаду водою, сушіння і подрібнення, який **відрізняється** тим, що печериці заливають 0,9-1,1 %-вим розчином гідроксиду натрію і витримують при 75-80 °С протягом 30-60 хв і гідромодулі (1-2), одержану суміш центрифугують, до осаду, що утворився, додають 6,9-7,1 %-вий водний розчин гідроксиду натрію, витримують 255-265 хв при 95-98 °С і гідромодулі (1-2), суміш центрифугують, осад, що

10

утворився, промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують, а відокремлений осад висушують.

---

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

---

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