



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 99542

(13) C2

(51) МПК

C12N 11/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2011 02709

(22) Дата подання заявки: 09.03.2011

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: 27.08.2012

(41) Публікація відомостей
про заяву: 27.02.2012, Бюл.№ 4

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: 27.08.2012, Бюл.№ 16

(72) Винахідник(и):

Черно Наталія Кирилівна (UA),
Озоліна Софія Олександрівна (UA),
Капустян Антоніна Іванівна (UA)

(73) Власник(и):

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,

вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039, Україна
(UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

US 6280983 B1, 28.08.2001.

JP 62215389 A, 22.09.1987.

RU 2323748 C2, 10.05.2008.

RU 2233327 C2, 27.07.2004.

RU 93008907 A, 20.03.1997.

UA 7861 U, 15.07.2005.

RU 2054481 C1, 20.02.1996.

UA 31802 U, 25.04.2008.

Декіна С.С. Імобілізація протеолітичних
ферментів та білків на полімерних носіях // Автореферат на здобуття наукового
ступеня к.б.н. 03.00.20 – біотехнологія.
Одеса - 2010.

Кравченко І.А., Давиденко Т.І., Маслова
Н.Ф. Имобилизация ферментов
заместительной терапии на пищевых
волокнах. Доповіді Національної академії
наук України. 1997, № 3, 182-186.

Шаназарова І.М., Валуев Л.І., Валуева
Т.А., Обыденнова І.В.. Имобилизация
овомуконда на хитозане. Прикладная
биохимия и микробиология. 2007, Т. 43,
№2, С. 169-171.

(54) СПОСІБ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ТРИПСИНУ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу іммобілізації трипсину, що передбачає включення ферменту в полімерну матрицю гелеподібної структури, де спочатку змішують водні розчини пектину і трипсину та витримують 10-15 хвилин, після цього додають розчин хітозану в 1 %-ній оцтовій кислоті, після чого отриману суміш витримують 10-15 хвилин і піддають ліофільному сушінню, при цьому розчин пектину, трипсину і хітозану беруть в масовому співвідношенні, рівному (0,5-2) : (0,25-1) : (0,5-2) відповідно.

UA 99542 C2

Винахід належить до біотехнології, зокрема до способу отримання іммобілізованих ферментів, і може бути використаний в харчовій промисловості, а також в медичній та лабораторній практиці.

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

Існує спосіб іммобілізації ліполітичних ферментів, який передбачає включення ферменту в полівініловий спирт і подальше нанесення його на матрицю, попередньо насичену 2 %-им розчином бури. Як матрицю використовують активований вуглецево-волокнистий матеріал з сумарним об'ємом пор 0,41-1,3 см³/г, а процес ведуть при співвідношенні фермент:полівініловий спирт:матриця - (0,8-1,2):(0,11-0,17):(24-72) відповідно (див. патент України № 7861 (51) МПК (2005): С12N 11/00 Спосіб іммобілізації ліполітичних ферментів). Недоліком даного способу є використання полівінілового спирту для включення ферменту. Даний компонент є синтетичним матеріалом і не підлягає біодеградації.

Відомий спосіб іммобілізації ферментів на органічному носії. Спосіб полягає в тому, що хемосорбційне волокно на основі співполімеру акрилонітрилу з 2,5-вінілпіридину (марка ВІОН АН-1) обробляють водними розчинами різних ферментів: лужна фосфатаза, пероксидаза, папаїн, α -хімотрипсин. Активність іммобілізованих ферментів складає 45-75 % від нативної величини залежно від природи ферменту та субстрату (див. заявку на патент Росії № 93008907 Спосіб отримання іммобілізованих ферментів). Недоліком даного способу є використання в якості носія синтетичного матеріалу, при застосуванні якого можуть виникнути алергічні реакції, а також низька активність деяких іммобілізованих ферментів в порівнянні з нативними.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб іммобілізації протеази С (див. патент України на корисну модель № 31802). Іммобілізацію протеази С проводять наступним чином: готують суспендований розчин протеази С, для чого 35 мг ферменту розчиняють в 5 см³ натрій-фосфатного буферного розчину (0,033 моль/дм³, рН 7, 4). Отриману суспензію при температурі 37 °С і ретельному перемішуванні повільно вливають в 3 см³ гелеподібного продукту з бурих морських водоростей "Ламідан". В результаті включення отримують іммобілізовану протеазу С у вигляді суміші, якій надалі в залежності від потреб можна надати необхідну форму. Зберігають іммобілізований препарат у холодильнику при температурі 0-4 °С.

Даний спосіб вибрано прототипом. Фермент трипсин належить до класу протеаз. Прототип і спосіб, що заявляється, співпадають в наявності операції включення ферменту з полімерною матрицею гелеподібної структури.

Але спосіб за прототипом має суттєві недоліки: наявність великої іонної сили розчину, що створюється в гелі, унеможливорює ймовірність іммобілізації на ньому лужних протеаз (нульовий % збереження активності), збереження активності трипсину у складі гелеподібного продукту з бурих морських водоростей "Ламідан" зберігається всього на 19,5 %. Другим недоліком є те, що іммобілізована протеаза С у вигляді продукту гелеподібної структури деяким чином є несприятною за органолептичними показниками для вживання перорально. Окрім того, проведення процесу іммобілізації ферменту при температурі 37 °С передбачає додаткові затрати енергії.

В основу винаходу поставлено задачу розробити удосконалений спосіб іммобілізації трипсину, в якому шляхом включення його в іншу полісахаридну матрицю забезпечити значне збереження активності ферменту та отримати продукт зі сприятливими органолептичними характеристиками.

Поставлена задача вирішена в способі іммобілізації трипсину, що передбачає включення ферменту в полімерну матрицю гелеподібної структури, тим, що спочатку змішують водні розчини пектину і трипсину та витримують 10-15 хвилин, після чого до вказаної суміші додають розчин хітозану в 1 %-ій оцтовій кислоті, суміш витримують 10-15 хвилин і піддають ліофільному сушінню. Розчини пектину, трипсину і хітозану беруть в масовому співвідношенні (0,5-2):(0,25-1):(0,5-2) відповідно.

Новим у винаході, що заявляється, є використання як компонентів полімерної матриці таких полісахаридів як пектин і хітозан, а також режими виконання способу: час витримки, співвідношення компонентів.

Відомо, що хітозан застосовується як носій різних біологічно активних сполук (див. Ж. Прикладна біохімія та мікробіологія, 2007, Т. 43, № 2, С. 169-171). Цьому значною мірою сприяє наявність в молекулі хітозану активної аміногрупи, яка в м'яких умовах може взаємодіяти з функціональними групами іммобілізованої сполуки. Однак при цьому завжди виникає

5 необхідність вибору поєднувального агента, що забезпечує максимальну біологічну активність речовини в іммобілізованому стані. В літературі відсутні дані про результати порівняльних досліджень впливу способу іммобілізації на біологічну активність кінцевого продукту.

Пропонований спосіб отримання іммобілізованих ферментів полягає в отриманні інтерполіелектролітних комплексів (ІПЕК) хітозану та пектину з включенням до них трипсину.

10 При використанні як комплексоутворювачів природних полісахаридів, завдяки їх власній фізіологічній активності, може бути реалізований синергічний ефект - посилення активності іммобілізованої речовини. ІПЕК представляють особливий клас полімерних речовин, що утворюються в результаті кооперативних оборотних реакцій з'єднання протилежно заряджених іонів. Кооперативний характер зв'язків між полііонами надає ІПЕК високу стабільність у

15 широкому інтервалі значень рН середовища. При різних співвідношеннях йоногенних груп вихідних компонентів можуть бути отримані як нерозчинні, так і розчинні ІПЕК. Нерозчинні (стехіометричні) ІПЕК виділяються з розчину у вигляді порівняно мало сольватованих осадів, співвідношення між протилежно зарядженими групами в них становить 1:1.

Комплекси мають високу протеолітичну активність. Відмінною особливістю такого способу іммобілізації ферментів є відсутність контакту ферменту з розчинниками, які спричиняють денатуруючу дію на білки. Показано, що зв'язування ферменту з матрицею відбувається в основному за рахунок електростатичних взаємодій. Такий характер взаємодії дозволяє зберегти третинну структуру білка і, отже, його активність. Використання полісахаридів в якості полімерної матриці дозволяє зберегти 80-90 % активності іммобілізованого таким чином

20 трипсину, що володіє пролонгованою дією.

Невідома технологія іммобілізації ферменту, зокрема трипсину, в якій як полімерні полісахариди використовуються пектин і хітозан в суміші. Вказані компоненти полімерної матриці підібрані експериментально. Як аніонні комплексоутворювачі, крім пектину, використовували також агар та карагінан, як катіонний комплексоутворювач - казеїн. При

30 змішуванні розчинів пектину з казеїном або хітозану з карагінаном, або хітозану з агаром - утворення гелеподібної структури не спостерігалось. Відмічалось деяке збільшення в'язкісних характеристик даних сумішей, на відміну від суміші хітозану з пектином.

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

35 вибрано час витримки саме 10-15 хвилин.

Співвідношення пектину, трипсину та хітозану також підібрано експериментально. Комплекс з протеолітичною активністю отримували послідовним змішуванням розчинів пектину, трипсину і хітозану. Використовували хітозан з молекулярною масою 245 кДа і ступенем деацетилювання 67,2 %, яблучний пектин з молекулярною масою 12 кДа і ступенем метоксилювання 66,4 %, трипсин з активністю 90 од/мг. Співвідношення між протилежно зарядженими групами хітозану та пектину становило 1:1, що відповідає утворенню нерозчинних (стехіометричних)

40 інтерполіелектролітних комплексів (ІПЕК). Показано, що процес комплексоутворення носить нединамічний характер, тому отримані комплекси мають ряд переваг в порівнянні з динамічними асоціатами модифікованих хітозанів при отриманні носіїв для транспорту біологічно активних речовин, і в тому числі живих клітин мікроорганізмів (бактерій) з пролонгованим ефектом.

Масове співвідношення компонентів у комплексі (пектин, трипсин: хітозан) становило (0,5-2):(0,25-1):(0,5-2). Концентрацію полісахаридів-комплексоутворювачів варіювали в інтервалі від 0,5 до 2 %, трипсину - від 0,2 до 1 %. Процес взаємодії компонентів супроводжувався гелеутворенням, в той час як кожен з полісахаридів окремо при взаємодії з трипсином в даних умовах не здатен до утворення гелю. Процес комплексоутворення завершується через 10-15

50 хвилин з моменту з'єднання компонентів комплексу. Включення ферменту в матрицю становило 100 %. ІПЕК з трипсином піддавали ліофільному сушінню при 37 °С, після чого визначали протеолітичну активність.

Приклад 1

В ємність помістили 30 мл 0,25 %-го водного розчину пектину і додали 15 мл 0,5 %-го водного розчину трипсину. Суміш перемішали і витримали протягом 15 хв. Після цього до

60

суміші додали 30 мл 1 %-го розчину хітозану в 1 %-ій оцтовій кислоті, перемішали і витримали протягом 15 хвилин. Отриману гелеву масу після цього помістили в металеві бюкси і піддали ліофільному сушінню при 37 °С протягом 10 год. Отриманий продукт мав губчасту пористу структуру, колір від світло-сірого до кремового. Вміст води складав 8-10 %. Отримані ІПЕК з трипсином характеризуються збереженням активності 94,08 % від максимально можливої. Встановлено, що найбільшою активністю володіє комплекс, отриманий з використанням 0,25 %-их розчинів пектину і хітозану і 0,5 %-го розчину трипсину при масовому співвідношенні пектин: трипсин: хітозан 2:1:2.

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

Як видно з даних таблиці, оптимальне співвідношення пектину і хітозану, щодо протеолітичної активності комплексу, становить 1:1, що відповідає утворенню стехіометричного ІПЕК (кількість аніонних карбоксильних груп пектину є еквівалентною кількості катіонних аміногруп хітозану). При співвідношенні пектину та хітозану в комплексі 1:3 та 3:1, спостерігається зменшення протеолітичної активності комплексів. Погіршення протеолітичних властивостей ІПЕК пояснюється утворенням нестехіометричних динамічних асоціатів, в котрих включення трипсину здійснюється не повністю.

Таблиця

Вплив масового співвідношення компонентів пектину, трипсину та хітозану на протеолітичну активність комплексу

№ прикладу	Компоненти, %			Протеолітична активність, % від максимальної
	Пектин, 0,5 %	Трипсин, 0,5 %	Хітозан, 0,5 %	
1	0,25	0,5	0,25	94,8
2	0,5	0,5	0,5	71,27
3	2,0	1,0	2,0	54,3
4	0,3 (-)	0,15	0,5	28,6 (-)
5	3,0 (-)	1,0	2,0	32,5 (-)
6	1,0	0,25	0,3 (-)	31,8 (-)
7	1,0	0,5	3,0 (-)	24,0 (-)

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб іммобілізації трипсину, що передбачає включення ферменту в полімерну матрицю гелеподібної структури, який **відрізняється** тим, що спочатку змішують водні розчини пектину і трипсину та витримують 10-15 хвилин, після чого додають розчин хітозану в 1 %-ній оцтовій кислоті, суміш витримують 10-15 хвилин і піддають ліофільному сушінню, при цьому розчин пектину, трипсину і хітозану беруть в масовому співвідношенні, рівному (0,5-2) : (0,25-1) : (0,5-2) відповідно.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що пектин і хітозан беруть в концентрації 0,25-1 %.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

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