



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 66429

(13) U

(51) МПК (2011.01)
C12N 11/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ТРИПСИНУ

1

2

(21) u201102160

(22) 24.02.2011

(24) 10.01.2012

(46) 10.01.2012, Бюл.№ 1, 2012 р.

(72) ЧЕРНО НАТАЛІЯ КИРИЛІВНА, ОЗОЛІНА СО-
ФІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, КАПУСТЯН АНТОНІНА
ІВАНІВНА(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ(57) 1. Спосіб іммобілізації трипсину, що передба-
чає включення ферменту в полімерну матрицю

гелеподібної структури, який **відрізняється** тим, що спочатку змішують водні розчини пектину і трипсину та витримують 10-15 хв., 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 (1-2):(0,5-1):(1-2) відповідно.

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

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема до способу отримання іммобілізованих ферментів, і може бути використана 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 (ПВС), 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 активовані вуглецево-волокнисті матеріали 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, МПК(2005): C12N 11/00 Спосіб іммобілізації ліполітичних ферментів). Недолі-

ком 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 за носій синтетичного матеріалу, при застосуванні якого можуть виникнути алергічні реакції, а також низька активність деяких іммобілізованих ферментів в порівнянні з нативними.

Найбільш близьким до заявлюваного 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, який

(13) U
(11) 66429
(19) UA

надалі в залежності від потреб можна надати необхідну форму. Зберігають іммобілізований препарат у холодильнику при температурі 0-4 °C.

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

Але спосіб за найближчим аналогом має суттєві недоліки: наявність великої іонної сили розчину, що створюється в гелі, унеможлиблює 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 °C передбачає додаткові затрати енергії.

В основу корисної моделі 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 (1-2):(0,5-1):(1-2) відповідно.

Новим у корисній моделі 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, том 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 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 інтерполіелектролітичних комплексів (ІПЕК) хітозану та пектину з включенням до них трипсину. При використанні як комплексоутворювачі природних полісахаридів, завдяки їх власній фізіологічній активності, може бути реалізований синергічний ефект - посилення активності іммобілізованої речовини. ІПЕК пред-

ставляють особливий клас полімерних речовин, що утворюються в результаті кооперативних оборотних реакцій з'єднання протилежних заряджених іонів. Кооперативний характер зв'язків між полііонами надає ІПЕК високу стабільність у широкому інтервалі значень рН середовища. При різних співвідношеннях іоногенних 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 як полімерну матрицю дозволяє зберегти 80-90 % активності іммобілізованого таким чином трипсину, що має пролонговану дію.

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 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 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) інтерполіелектролітичних 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 (1-2):(0,5-1):(1-2). Концентрацію полісахаридів-комплексотворювачів варіювали в інтервалі від 0,25 до 1 %, 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 комплексотворення завершується через 10-15 хв. 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 суміші додали 30 мл 0,25 %-го розчину хітозану в 1 %-ій оцтовій ки-

слоті, перемішали і витримали протягом 15 хв. 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 %.

Приклад 2-7 здійснювали аналогічно тому як наведено в прикладі 1, але компоненти брали в різних співвідношеннях. Результати наведені в таблиці. Встановлено, що найбільшою активністю (94,8 % від максимально можливої) має 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, при цьому співвідношення функціональних груп пектину і хітозану становить 1:1, що відповідає утворенню стехіометричного ІПЕК. При різному співвідношенні функціональних груп пектину та хітозану в комплексі спостерігається зменшення протеолітичної активності ІПЕК. Така тенденція пояснюється утворенням нестехіометричних асоціатів, в котрих включення трипсину здійснюється не повністю.

Таблиця

Протеолітична активність (ПА) ІПЕК в залежності від співвідношення та концентрації його складових

№ зразка	Пектин		Трипсин		Хітозан		ПА, % від max
	Концентрація, С, %	Об'єм, V, мл	Концентрація, С, %	Об'єм, V, мл	Концентрація, С, %	Об'єм, V, мл	
1	0,25	30	0,5	15	0,25	30	94,8
2	0,5	20	0,5	20	0,5	20	71,27
3	1,0	30	1,0	15	1,0	30	54,3
4	0,3	30	0,15	15	0,5	15	28,6
5	0,75	15	1,0	15	0,25	30	32,5
6	0,25	20	0,25	20	0,75	20	31,8
7	1,0	20	0,5	10	1,0	40	24,0