



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 118214

(13) U

(51) МПК

A23J 1/20 (2006.01)

A23J 3/08 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 01837**

(22) Дата подання заявки: **27.02.2017**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.07.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.07.2017, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):

**Дідух Геннадій Васильович (UA),
Тележенко Любов Миколаївна (UA),
Кириленко Аліна Василівна (UA)**

(73) Власник(и):

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

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОМОДУЛЯТОРА

(57) Реферат:

Спосіб одержання імуномодулятора включає хроматографічне виділення лактоферину на колонці із сорбентом карбоксиметилцелюлозою, врівноваженим 0,05 М натрій-фосфатним буфером, елюювання 0,05 М натрій-фосфатним буфером в градієнті концентрацій хлориду натрію 0,1-1,2 М, збирання фракцій з оптичною щільністю 0,5 од. при довжині хвилі $\lambda=280$ нм, знесолення і ліофілізацію. Як молочну сировину використовують перміат підсирної сироватки, який нейтралізують до рН 8,8-9,0, обробляють хлористим кальцієм і нагрівають до 53-55°C, витримують 18-20 хв., утворений осад розводять до масової частки сухих речовин 8-9 %, а з отриманого таким чином розчину виділяють лактоферин і лактопероксидазу хроматографічним методом.

UA 118214 U

Корисна модель належить до харчової промисловості, зокрема до галузі переробки молока і молочних продуктів, і може бути використана для отримання високоцінних білкових компонентів з відходів переробки молока, зокрема з перміату підсирної сироватки.

Відомий спосіб одержання імуномодулятора з жіночого молока, що включає знежирення, видалення казеїну, фракціонування сульфатом амонію, діаліз і ліофілізацію цільового продукту. Фракціонування ведуть ступенево: спочатку додають сульфат амонію до концентрації 35-45 % від насичення, осад видаляють, потім до супернатанту додають сульфат амонію до концентції 70-80 % від насичення. Перед діалізом осад від фракціонування розчиняють в дистильованій воді, інкубують з 1,3-3,7 М хлоридом натрію при рН 3,6-4,4 і видаляють утворений осад за допомогою фільтрування [див. патент РФ № 1709606].

Найбільш близьким технічним рішенням до корисної моделі, що заявляється, є спосіб одержання імуномодулятора з сирого коров'ячого молока, який включає хроматографію у колонці з сорбентом карбоксиметилцелюлозою, врівноваженим 0,05 М натрій-фосфатним буфером при рН 7,7, елюювання лактоферину 0,05 М натрій-фосфатним буфером, в градієнті концентрацій хлориду натрію 0,1-1,2 М, повторну хроматографію лактоферину у колонці з сорбентом карбоксиметилцелюлозою, врівноваженим 0,05 М натрій-фосфатним буфером при рН 7,7, елюювання лактоферину з другої колонки 0,05 М натрій-фосфатним буфером, в градієнті концентрацій хлориду натрію 0,1-1,2 М, збирання фракцій з оптичною щільністю 0,5 од. при довжині хвилі $\lambda=280$ нм., ультрафільтрацію, знесолення і ліофілізацію розчину, [див. патент РФ № 2390253].

Даний спосіб вибрано прототипом.

Прототип і корисна модель, що заявляється мають наступні спільні ознаки:

- хроматографічне виділення лактоферину на колонці з сорбентом карбоксиметилцелюлозою, врівноваженим 0,05 М натрій - фосфатним буфером;
- елюювання 0,05 М натрій-фосфатним буфером в градієнті концентрацій хлориду натрію 0,1-1,2 М;
- збирання фракцій з оптичною щільністю 0,5 од. при довжині хвилі $\lambda=280$ нм.;
- знесолення;
- ліофілізація розчину.

Недоліком способу за прототипом є те, що він дозволяє одержати тільки лактоферин. Як сировина використовується сире коров'яче молоко, яке після одержання лактоферину не зберігає своїх властивостей, до того ж утворюється велика кількість відходів, які здатні завдавати шкоду довкіллю. Для одержання 100 г. лактоферину необхідно 1 т. молока.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб одержання імуномодулятора з вторинної молочної сировини, призначеного для створення на його основі кулінарної продукції з імуномодельюючою дією, який входить у систему безвідходної переробки молочної сировини.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі одержання імуномодулятора, що включає хроматографічне виділення лактоферину з молочної сировини на колонці із сорбентом карбоксиметилцелюлозою врівноваженим 0,05 М натрій-фосфатним буфером, елюювання 0,05 М натрій-фосфатним буфером в градієнті концентрацій хлориду натрію 0,1-1,2 М, збирання фракцій з оптичною щільністю 0,5 од. при довжині хвилі $\lambda=280$ нм., знесолення і ліофілізацію, тим що, на відміну від прототипу, як молочну сировину використовують перміат підсирної сироватки, який нейтралізують до рН 8,8-9,0, обробляють хлористим кальцієм і нагрівають до 53-55 °С, витримують 18-20 хв., утворений концентрат розводять до масової частки сухих речовин 8 %, а з отриманого таким чином розчину виділяють лактоферин і лактопероксидазу хроматографічним методом.

Лактоферин є багатофункціональним глікопротеїном родини трансферину з підвищеною здатністю до зв'язування з залізом. Спорідненість лактоферину до заліза в 300 разів вища, ніж в інших трансферинів. У недавніх дослідженнях визначена роль лактоферину в гомеостазі заліза. Він здатний індукувати вивільнення заліза з тканин у кровотік за допомогою механізму мобілізації цього елемента, (див. Nappi C. et al. Acta Obstet Gynecol Scand. 2009; 88 (9): 10311035.) Клінічні дані показали, що лактоферин, спожитий усередину, може сприяти нормалізації рівнів загального заліза в плазмі крові, рН, феритину, а також кількості еритроцитів. Лактоферин бере участь у відновленні імунного статусу, посилює протидію захисних сил організму інфекціям, викликаних мікробами, грибами і вірусами, (див. Paesano R. et al. Biometals. 2014 Oct; 27 (5): 9991006.)

Лактоферин регулює функції імунокомпетентних клітин і є ключовим фактором вродженого імунітету. Однак у молоці, знаходиться в комплексі з лактопероксидазою і за рахунок синергетичної взаємодії вони утворюють поліфункціональний захисний фактор. Крім того, лактопероксидазна система є одним з найбільш значущих мікробних інгібіторів, які

обумовлюють бактерицидну фазу сирого молока. В деяких країнах вона використовується для збільшення термінів зберігання незбираного молока.

Перміат - це вторинна сировина виробництва сироваткових білків. Відділяють сироваткові білки шляхом термокислотної коагуляції при рН 4,6-5,2, що співпадає з ізоелектричними точками більшості сироваткових білків. Проте ізоелектричні точки лактоферину та лактопероксидази близькі до рН 9, тому вони залишаються в надосадовій фракції. Характеристика найбільш важливих сироваткових білків представлена в таблиці 1.

Спосіб здійснюється в наступному порядку. Перміат нейтралізують за допомогою NaHCO_3 до рН 8,8-9 додають хлористий кальцій і витримують при температурі 53-55 °С, впродовж 18-20 хв. Відстоюють 40-45 хв. Потім надосадову фракцію зливають, а утворений осад розводять натрій-фосфатним буфером при рН 7,7 до масової частки сухих речовин 8-9 % і направляють на хроматографію лактоферину і лактопероксидази у колонці з сорбентом карбоксиметилцелюлозою, врівноваженим 0,05 М натрій-фосфатним буфером при рН 7,7. Після цього елюють лактоферин і лактопероксидазу 0,05 М натрій-фосфатним буфером, в градієнті концентрацій хлориду натрію 0,1-1,2 М. При елюванні збирають фракції розчину лактоферину і лактопероксидази з оптичною щільністю 0,5 од. при довжині хвилі $\lambda=280$ нм. і направляють їх на знесолення та ліофілізацію. Отримують порошок кремового кольору з легким присмаком, характерним для молочних продуктів.

Приклад

12 л перміату підсирної сироватки нейтралізують до рН 8,8. Додають 10 г. хлористого кальцію. Гріють до температури 55 °С, і витримують 20 хв. Після цього відстоюють 40 хв. Осад розводять фосфатним буфером при рН 7,7 до масової частки сухих речовин 8 % і направляють на колонку з сорбентом карбоксиметилцелюлозою. Проводять сорбцію лактоферину 0,05 М натрій-фосфатним буфером при рН 7,7. Елюють 0,05 М натрій-фосфатним буфером в градієнті концентрацій хлориду натрію 0,1-1,2 М, збираючи фракції з оптичною щільністю 0,5 од. при довжині хвилі $\lambda=280$ нм. Після цього розчин лактоферину і лактопероксидази піддають діалізу і ліофілізації. В результаті отримують 1 г. сухого препарату, який містить 52 % лактопероксидази та 41 % лактоферину.

Таблиця 1

Характеристика найбільш важливих сироваткових білків

Білок	Молекулярна маса, кДа Ізоелектрична точка	
α -Лактоальбумін	14,1	4,8
β -Лактоглобулін	18,2	4,9-5,4
Бичачий альбумін	66	4,8
Лактоферин	78-80	8,0-8,8
Лактопероксидаза	78-80	8,6-9,6
Імуноглобуліни	150-900	5,8-7,3

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання імуномодулятора, що включає хроматографічне виділення лактоферину на колонці із сорбентом карбоксиметилцелюлозою, врівноваженим 0,05 М натрій-фосфатним буфером, елювання 0,05 М натрій-фосфатним буфером в градієнті концентрацій хлориду натрію 0,1-1,2 М, збирання фракцій з оптичною щільністю 0,5 од. при довжині хвилі $\lambda=280$ нм, знесолення і ліофілізацію, який **відрізняється** тим, що як молочну сировину використовують перміат підсирної сироватки, який нейтралізують до рН 8,8-9,0, обробляють хлористим кальцієм і нагрівають до 53-55 °С, витримують 18-20 хв., утворений осад розводять до масової частки сухих речовин 8-9 %, а з отриманого таким чином розчину виділяють лактоферин і лактопероксидазу хроматографічним методом.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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