



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **81223** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 11/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2012 14828</p> <p>(22) Дата подання заявки: 24.12.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.06.2013</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2013, Бюл.№ 12</p>	<p>(72) Винахідник(и): Омельченко Володимир Сергійович (UA), Кричковська Лідія Василівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ "ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ", вул. Фрунзе, 21, м. Харків, 61002 (UA)</p>
--	---

(54) ПРЕПАРАТ ІММОБІЛІЗОВАНИХ АМІЛОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

(57) Реферат:

Препарат іммобілізованих амілолітичних ферментів містить ферментативний препарат, носій у вигляді магнітних мікрочастинок окису заліза різної валентності.

UA 81223 U

Корисна модель належить до харчової промисловості і стосується препаратів іммобілізованих амілолітичних ферментів.

В умовах сучасної ринкової економіки актуальним є питання представлення на ринку вітчизняних конкурентоспроможних препаратів іммобілізованих амілолітичних ферментів, що мають в собі доступну ціну та високу якість.

Найбільш близьким аналогом корисної моделі за технічною суттю та способом отримання є препарат іммобілізованої целюлози, у котрому харчову карбоксиметилцелюлозу розчиняють в буферному розчині або підлученого у дистильованій воді з рН 9,5-10 і додають до фільтрату отриманого розчину целюлоз, що продукуються культурою *Trichoderma reesei* або культурою *Trichoderma viride* з активністю не нижче 50 од/г у вигляді порошку в присутності 1-1, 5 %-ного розчину поверхнево-активної речовини при інтенсивному перемішуванні зі швидкістю 4500-5000 об/хв. Утворену емульсію охолоджують до 5-10 °С, зменшують рН реакційної суміші до 3,0-3,5 і залишають на добу в холодильнику. Частики, що випали відокремлюють з розчину і неодноразово додають до решти часткам ацетатний буфер з рН 4-4,5 при перемішуванні, потім випали частинки, що містять целюлозу, відокремлюють і висушують [1].

Задача корисної моделі є створення препарату іммобілізованого амілолітичного ферменту для проведення декрохмалізації концентратів яблучного соку, котрий може бути легко приготований у промислових умовах, мати можливість до магнітної сепарації та зберігати не менш ніж 90 % активності від розчинного ферментного препарату і привабливого за вартістю. На даний час вітчизняній промисловості для виробництва соків та сокових концентратів для декрохмалізації необхідно використовувати дорогі закордонні ензимні препарати.

Поставлена задача вирішується тим, що проводиться іммобілізація на дешевий носій неорганічного походження, стійкий до термічних впливів, котрий є легко регенерований, нетоксичний, який легко відокремлюється шляхом магнітної сепарації.

Основу препарату складає ферментативний препарат та носій, який являє собою магнітні мікрочастинки окису заліза різної валентності. Корисна модель являє собою допоміжний засіб для декрохмалізації півконцентратів, концентратів різноманітних соків, а також засіб для гідролізу крохмалю; дозволить вирішити проблему перевитрати в промисловості дорогих ферментних препаратів та виключити з технологічних схем деяке важке обладнання.

Технічним результатом корисної моделі є збереження даним препаратом іммобілізованих амілолітичних ферментів активності за рахунок адсорбційної іммобілізації на носії.

У першу чергу було потрібно вибрати носій для іммобілізації ферментів. Характер носія обумовлює метод іммобілізації ферменту.

Ідеальний носій для ферментів має задовольняти декілька вимог:

- 1) бути недорогим;
- 2) бути механічно стійким та не руйнуватися;
- 3) бути безпечним для застосування у харчових цілях;
- 4) легко відокремлюватися від реакційного середовища по закінченню ферментативної реакції;
- 5) мати достатню проникливість для субстратів та ферменту;
- 6) бути біологічно стійким та не піддаватися деградації мікроорганізмами та ферментами;
- 7) мати можливість придання різноманітної технологічної форми;
- 8) мати достатній ступінь гідрофобності для проведення реакцій у водному середовищі.

За характером носії можна розділити на групи - природні та синтетичні. Природні у свою чергу розподіляються на полісахаридні та протеїнові (білки) носії. Полісахаридні носії є найбільш розповсюдженим класом носіїв та найбільш доступним. Найчастіше для іммобілізації використовують такі полісахариди целюлозу, декстрин, агарозу, пектин та їх похідні, що являють собою полімери різних моносахаридів з реакційно спроможними групами, на котрі можливо приєднати ковалентно або шляхом іонообміну реакційні групи білка-ферменту. Велика кількість наявних реакційних груп надає можливість модифікувати полісахаридні носії із утворенням нових функційних груп. Єдиним недоліком можна вважати малий ступінь стійкості проти дії мікроорганізмів та відносно велику вартість носіїв. Використання білків як носіїв теж має свій інтерес як для фундаментальних досліджень, так і для створення технологічних продуктів для практичних цілей. Також як природні носії можуть бути використані низькомолекулярні сполуки - ліпіди та ПАР у вигляді ліпосом та мікросом. Неорганічні носії також можуть знайти своє застосування у створенні іммобілізованих ферментних препаратів.

У результаті пошуку було вибрано неорганічну основу на основі оксиду заліза, котра має магнітні властивості. Ферментний препарат, іммобілізований на цій основі зберігає достатньо великий рівень активності для декрохмалізації яблучного соку.

Окис залізу відрізняється від інших носіїв своїми магнітними властивостями, стійкістю до підвищених температур та механічних впливів, мінімальною токсичністю, доброю здатністю до відокремлення. Як носій окис заліза задовольняє більшості вимог, котрим повинен відповідати ідеальний носій для іммобілізованого ферментного препарату.

5 Для отримання залишкової активності препарату іммобілізованих амілолітичних ферментів, потрібної кількості частинок носія та необхідної кількості ферментів було проведено комплекс досліджень із застосуванням спектрофотометричних методів - визначення кількості білку, що було адсорбовано на частинках, визначення повноти гідролізу та граничної кількості частинок окису заліза, після підвищення котрої зберігається максимальний рівень залишкової ферментативної активності.

10 Експерименти по дослідженню повноти кількості іммобілізованого ферменту на носії, гідролізу крохмалю та збереження залишкової активності проводилися відповідно плану експерименту "нанесення - властивість" за допомогою стандартного йодного методу. За допомогою колориметричного методу розраховували повноту гідролізу - колір змінювався від фіолетового до жовтого, синій характеризувався утворенням декстринів. Глибина гідролізу визначалася за допомогою періодичного відбору проб напівконцентрату на вміст крохмалю за відповідних довжин хвиль.

15 Експериментальні дані показують, що період гідролізу крохмалю дорівнює 2 годинам, що відповідає технологічному процесу. Використання іммобілізованого ферментного препарату є можливим протягом 5-7 разів.

20 Приклад.

Відповідно до корисної моделі можуть бути отримані препарати амілолітичного ферменту, іммобілізованого на цеолітах адсорбційним способом. Залежність каталітичної активності нативної та іммобілізованої глюкоамілази від рН середовища. Вивчали властивості іммобілізованого ферментного препарату, порівнюючи його стабільність і активність з нативної формою ферменту. Іммобілізація глюкоамілази на поверхні 10 г цеоліту проводилася адсорбцією з розчину, що містить 200 мг ферменту в 10 мл ацетатного буфера (рН 5,0) при постійному перемішуванні протягом 2 год. при кімнатній температурі. Отриманий препарат іммобілізованої глюкоамілази відокремлювали фільтруванням, промиваючи 2-3 рази буферним розчином для видалення не пов'язаного з носієм ферменту. Каталітичну активність глюкоамілази визначали за амілолітичною активності, ГОСТ 20264.4-89. Значення каталітичної активності іммобілізованого ферменту виражали у відсотках від активності нативної глюкоамілази в розчині. Величину рН буферних розчинів визначали на рН - метр "М 120". З метою відтворення рН середовища шлунково-кишкового тракту курчат-бройлерів досліди проводили в ацетатному, фосфатному і солянокислому буферах при значеннях рН 1,5-8,0. В результаті дослідів було встановлено, що іммобілізований фермент в сильнокислій (рН 1,5-2,0) і лужній (рН 7,0-8,0) середовищах лише на 20 % від максимальної зменшив свою активність, в тоді як нативний фермент у цих умовах денатурованого і відновити його каталітичні властивості при оптимальному значенні рН (4,5) не вдалося. Іммобілізований фермент проявляє максимальну активність (70 % від активності нативної глюкоамілази) в інтервалі рН 4,2-5,5, в той час як нативний при відхиленнях від оптимального значення рН 4,5 швидко втрачає каталітичну активність.

40 Магнітні властивості мікрочасток дозволяють провести майже повне відокремлення на магнітних сепараторах. Таким чином, повторне використання дозволить значно зберегти достатню кількість високовартісного ферментного препарату та зберегти витратні матеріали, потрібні на видалення чужорідного білка.

Джерело інформації:

50 1. Пат. 2388822, РФ, МПК С12Н11/12 Способ получения иммобилизованной глюкоамилазы [Текст] / Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Прошина О.П., Олиференко Г.Л.; заявитель: Федеральное агентство по образованию Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет леса", - заявл. 02.07.2008, опубл. 10.05.2010 г.

55

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Препарат іммобілізованих амілолітичних ферментів, основу якого складає ферментативний препарат та носій, який **відрізняється** тим, що носій являє собою магнітні мікрочастинки окису заліза різної валентності.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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