

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2055482⁽¹³⁾ C1

(51) МПК⁶ A23J3/04, A23J3/00, A23J3/34, A61K35/60

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 08.09.2014 - прекратил действие
Пошлина: учтена за 20 год с 14.05.2013 по 13.05.2014

(21), (22) Заявка: **94017460/13, 13.05.1994**

(45) Опубликовано: **10.03.1996**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **1. SU, патент N 1836100, кл. А 61К 37/18, 1993. 2. FR, Заявка N 2541897, кл. А 61К 31/70, 1983. 3. FR Патент N 1836085, кл. А 61К 37/18, 1993. 4. SU, Авторское свидетельство N 1343591, кл. А 61К 35/56, 1992.**

(71) Заявитель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН

(72) Автор(ы):

**Гафуров Ю.М.,
Козловская Э.П.,
Рассказов В.А.,
Галкин В.В.,
Артюков А.А.,
Козловский А.С.,
Арзамасцев Е.В.**

(73) Патентообладатель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВО-НУКЛЕИНОВОГО ГИДРОЛИЗАТА

(57) Реферат:

Использование: в медицине, микробиологии, пищевой и парфюмерной отраслях промышленности, сельскохозяйственном производстве. Сущность изобретения: способ заключается в том, что гомогенизированные молоки лососевых или осетровых рыб подвергают автолизу при pH 4,5-5,0 за счет лизосомальных ферментов. Автолизат разделяют на жидкую фракцию и осадок, который подвергают ферментативному гидролизу. Гидролизат молок лососевых рыб содержит такие ценные биологически активные продукты, как аминокислоты, дезоксирибонуклеозиды, олигонуклеотиды различной величины. 4 з.п. ф-лы, 2 табл.

Изобретение касается получения белково-нуклеинового гидролизата, который может быть использован в микробиологии, пищевой и парфюмерной промышленности, медицине, сельскохозяйственном производстве.

Известен способ получения белкового гидролизата, предусматривающий гидролиз отходов переработки крабов коллагеназой, очистку гидролизата ультрафильтрацией на мембранах, концентрирование экстракта и сушку [1]

Известен способ получения экстрактов из рыбы, моллюсков и ракообразных, согласно которому животное сырье нагревают до температуры не ниже 75°C для инактивации аутолитических ферментов, обрабатывают протеазой *Vacillus subtilis* при 50-60°C и pH 6-7 для разложения белков до аминокислот и пептидов, и нагревают до температуры не менее 75°C для инактивирования протеазы. Затем смесь обрабатывают протеазой плесени *Koji* при 40-50°C и pH 6-7 в течение 1-3 ч для разложения белков в пептиды с мол.мас. < 3000 и свободные аминокислоты [2]

Известные способы получения продуктов распада животных тканей чаще всего основаны на разрушении ферментов автолиза тканей термообработкой и последующим получением продуктов распада тканей введением протеолитических ферментов микроорганизмов.

В качестве прототипа выбран способ получения белкового гидролизата, предусматривающий обработки щупалец кальмара протеолитическим ферментом коллагеназой из гепатопанкреаса камчатского краба, отделение целевого продукта ультрафильтрацией на мембранных с пропускающей способностью 100000 дальтон, концентрирование и сушку продукта [3]

Известный способ характеризуется трудоемкостью, так как он предусматривает внесение фермента извне и предварительную обработку щупалец кальмара до состояния мелкодисперсного фарша с последующим его обессоливанием с использованием больших объемов кислоты и воды.

В результате ферментативного гидролиза получают гидролизат, содержащий в своем составе только белок, аминокислоты и ионы некоторых металлов.

Целью изобретения является увеличение выхода готового продукта, повышение его биологической и пищевой ценности.

Для решения поставленной задачи авторы предлагают использовать в качестве сырья для получения гидролизата молоки лососевых или осетровых рыб. Способ получения белково-нуклеинового гидролизата из молок лососевых или осетровых рыб основан на автолизе животной ткани, обусловленном наличием в клетках ткани молок эндогенных лизосомальных ферментов, pH-оптимум действия которых лежит в пределах 4,5-5,0.

Поэтому на первом этапе молоки лососевых или осетровых рыб гомогенизируют в буфере именно с этим значением pH (4,5-5,0). Смесь инкубируют при 37-39°C в течение 46-50 ч. Затем гомогенат разделяют на жидкую фракцию и осадок фильтрацией или центрифугированием, или сепарированием.

Гомогенизированные молоки осетровых рыб перед автолизом подвергают обезжириванию флокуляцией хитозаном.

Прозрачная жидкая фракция содержит дезоксирибонуклеозиды, аминокислоты, неорганический фосфат, лецитин, жирные кислоты, ионы одно- и двухвалентных металлов K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} .

Автолиз молок лососевых или осетровых рыб эндогенными, содержащимися в клетках молок лизосомальными ферментами, приводит к тому, что протеины гидролизуются до свободных аминокислот, а ДНК до нуклеозидов, однако часть ДНК и белков в полимерной форме содержится в осадке.

Поэтому на втором этапе осадок дополнительно обрабатывают ферментным комплексом "коллагеназа" из гепатопанкреаса камчатского краба, полученным известным способом [4] Данный препарат, кроме комплекса протеолитических ферментов, содержит также ДНКазу, фосфатазу и фосфодиэстеразу. Используют также для гидролиза комплекс ферментов из пилоритических отростков лососевых рыб, или панкреатин.

Полученный после ферментативного гидролиза продукт содержит дезоксирибонуклеозиды и нуклеотиды различной величины, аминокислоты и пептиды. Гидролизат объединяют с жидкой фракцией.

Инактивацию ферментов термической обработкой проводят либо после смешивания жидкой фракции и гидролизата, либо отдельно в жидкой фракции и в гидролизате.

Хранят продукт в сухом виде или в виде раствора при pH 3-4. Для создания кислой среды в фильтраты добавляют ледяную уксусную кислоту. При хранении белково-нуклеиновых гидролизатов из молок лососевых или осетровых рыб в течение года в стеклянных бутылках при указанных условиях изменение органолептических показателей не наблюдалось.

Принципиальным отличием заявляемого способа является то, что на первой стадии фермент не вносят извне, а создают условия для протекания ферментативного автолиза животной ткани под действием лизосомальных ферментов, содержащихся в клетках молок. При этом никакой предварительной обработки животного сырья не требуется.

Автолиз молок лососевых или осетровых рыб с последующим ферментативным гидролизом остатка нерасщепленной ткани позволяет получить продукт, содержащий большой спектр биологически активных

веществ, таких как аминокислоты, дезоксирибонуклеозиды, олигонуклеотиды различной величины.

Заявленные в способе параметры позволяют получить наибольший выход продукта с максимальным суммарным содержанием аминокислот. Снижение температуры автолиза, сокращение времени автолиза приводит к снижению глубины гидролиза, повышение температуры и увеличение времени автолиза ведет к нарушению процесса и снижению биологической ценности продукта.

Пример 1. 1,0 кг замороженных при -10°C молок кеты гомогенизируют в 5 л 0,1 М ацетатного буфера, рН 4,7. Смесь инкубируют при 37°C в течение 48 ч. Автолизат отделяют фильтрованием через фильтровальную бумагу. Жидкую фракцию нагревают до 80°C для инактивации ферментов. Осадок перемешивают в 5 л 0,05 М трис-НСI буфера, содержащего 0,01 М MgCl_2 , 0,005 М CaCl_2 и прибавляют 1,0 г коллагеназы, полученной из гепатопанкреаса камчатского краба. Ферментативный гидролиз проводят в течение 24 ч при 37°C . При центрифугировании ферментативного гидролизата осадка не образуется. Инактивацию фермента проводят температурной обработкой гидролизата при 75°C 30 мин. Выход суммарного гидролизата 0,22 кг (22%) от исходного количества сырья.

Пример 2. Процесс проводят как в примере 1, за исключением того, что на втором этапе молоки обрабатывают комплексом ферментов из пилоритических отростков лососевых рыб в количестве 5,0 г. Гомогенат инкубируют при температуре 39°C в течение 49 ч. Автолизат отделяют центрифугированием с числом оборотов 2000 тыс. об./мин в течение 20 мин. Ферментативный гидролиз ведут при температуре 38°C .

Пример 3. Процесс проводят как в примере 1, за исключением того, что молоки обрабатывают панкреатином в количестве 5,0 г.

Пример 4. Процесс проводят как в примере 1, но используют молоки осетра, которые после гомогенизаций обезжиривают добавлением раствора хитозана с содержанием хитозана в растворе 0,01-0,1% в количестве, необходимом для обезжиривания молок. Жидкую фракцию смешивают с гидролизатом и подвергают инактивации ферментов нагреванием. Результаты количественного определения компонентов белково-нулеинового гидролиза молок кеты представлены в табл. 1 и 2.

Белково-нуклеиновый гидролизат, полученный предложенным способом, найдет широкое применение в медицине для парантерального питания, в составе ранозаживляющих мазей при ожоговых поражениях, в качестве профилактического средства для восстановления иммунной системы, как геронтологическое средство; в парфюмерной промышленности как эффективная добавка при производстве различных косметических препаратов; в микробиологии для приготовления питательных сред, в технологии клеточных культур эукариотических клеток; в сельском хозяйстве в качестве стимулятора роста растений.

Формула изобретения

1. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВО-НУКЛЕИНОВОГО ГИДРОЛИЗАТА, предусматривающий ферментативный гидролиз морского животного сырья протеолитическим ферментом, термическую инактивацию фермента, отличающийся тем, что из морского животного сырья используют молоки лососевых или осетровых рыб, перед ферментативным гидролизом молок последние подвергают гомогенизации и автолизу при рН 4,5 - 5,0, температуре $37 - 39^{\circ}\text{C}$ в течение 46 - 50 ч, полученный автолизат разделяют на жидкую фракцию и осадок, который подвергают ферментативному гидролизу коллагеназой, полученной из гепатопанкреаса камчатского краба, или комплексом ферментов из пилоритических отростков лососевых рыб, или панкреатином, затем гидролизат объединяют с жидкой фракцией и смесь используют в качестве готового продукта.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что термическую инактивацию фермента осуществляют в жидкой фракции.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что термическую инактивацию фермента осуществляют в гидролизате.
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что термическую инактивацию фермента осуществляют после объединения гидролизата с жидкой фракцией.
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что при использовании молок осетровых рыб гомогенизированные молоки подвергают обезжириванию флокуляцией хитозаном перед их автолизом.

РИСУНКИ

[Рисунок 1](#), [Рисунок 2](#)