



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 35/66 (2020.08); C12N 9/58 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020101606, 16.01.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.01.2020

Дата регистрации:
01.04.2021

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 16.01.2020

(45) Опубликовано: 01.04.2021 Бюл. № 10

Адрес для переписки:
115516, Москва, а/я 17, Кузнецову Д.В.

(72) Автор(ы):

Григораш Александр Ильич (RU),
Макланов Анатолий Иванович (RU),
Самойленко Владимир Александрович (RU),
Шкондина Наталья Александровна (RU),
Смирнова Мария Александровна (RU),
Буякова Ирина Владимировна (RU),
Коновалов Евгений Владимирович (RU),
Коновалов Андрей Евгеньевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"Научно-производственное
предприятие"ФЛОРАВИТ" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2088104 C1, 27.08.1997. RU
2268620 C1, 27.01.2006. RU 2092179
C1, 10.10.1997. RU 2466402 C1, 10.11.2012.

(54) Способ получения биологически активного средства путем гидролиза белоксодержащего сырья

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к получению биологически активных средств из растительного и животного сырья для применения в пищевой, фармацевтической промышленности, биотехнологии, ветеринарии и кормопроизводстве. Предлагается способ получения биологически активного средства путем гидролиза содержащего белок сырья, выбранного из биомассы бифидобактерий видов *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum*, лактобацилл видов *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* и *Streptococcus thermophilus*, биомассы мицелиального гриба *Nadsoniella nigra*

штамма № ВКМ F - 2137, пекарских дрожжей, сбора лечебных трав. Сырье подвергают гидролизу с помощью культуральной жидкости штамма гриба вида *Fusarium sambucinum* при температуре 35-40°C и соотношении компонентов 1:50 в течение 18-24 часов. Затем гидролизат сепарируют, фильтруют, концентрируют, при необходимости нормализуют, согласно целевому назначению. Способ получения продукта гидролиза обеспечивает ускорение и удешевление технологии его получения, а также расширение ассортимента продуктов с биологически активными свойствами. 1 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 35/66 (2020.08); C12N 9/58 (2020.08)(21)(22) Application: **2020101606, 16.01.2020**(24) Effective date for property rights:
16.01.2020Registration date:
01.04.2021

Priority:

(22) Date of filing: **16.01.2020**(45) Date of publication: **01.04.2021** Bull. № 10

Mail address:

115516, Moskva, a/ya 17, Kuznetsovu D.V.

(72) Inventor(s):

**Grigorash Aleksandr Ilich (RU),
Maklanov Anatolij Ivanovich (RU),
Samojlenko Vladimir Aleksandrovich (RU),
Shkondina Natalya Aleksandrovna (RU),
Smirnova Mariya Aleksandrovna (RU),
Buyakova Irina Vladimirovna (RU),
Konovalov Evgenij Vladimirovich (RU),
Konovalov Andrej Evgenevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Nauchno-proizvodstvennoe
predpriyatie "FLORAVIT" (RU)**

(54) **METHOD OF OBTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE AGENT BY HYDROLYSIS OF PROTEIN-CONTAINING RAW MATERIALS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, in particular to the production of biologically active agents from plant and animal raw materials for use in the food, pharmaceutical industry, biotechnology, veterinary medicine and feed production. Disclosed is a method of obtaining a biologically active agent by hydrolysis of a protein-containing raw material selected from the biomass of bifidobacteria of the species *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum*, lactobacilli of the species *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus thermophilus*, biomass of filamentous fungus *Nadsoniella nigra* of strain No. VKM F - 2137, baker's

yeast, collection of medicinal herbs. The raw material is subjected to hydrolysis using a culture liquid of a strain of a fungus of the species *Fusarium sambucinum* at a temperature of 35-40°C and a component ratio of 1:50 for 18-24 hours. Then the hydrolyzate is separated, filtered, concentrated, and, if necessary, normalized, according to the intended purpose.

EFFECT: method for obtaining a hydrolysis product provides acceleration and reduction in the cost of the technology for its production, as well as an expansion of the range of products with biologically active properties.

1 cl, 1 tbl, 4 ex

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу получения биологически активного средства из растительного и животного сырья для медицины, микробиологии, пищевой и парфюмерной промышленности, производства ветеринарных препаратов и кормов для животных, биотехнологии и т.д.

5 Получаемое заявленным способом биологически активное средство позволяет существенно расширить область их применения.

Основные промышленные способы производства гидролизатов, являющихся биологически активными средствами - гидролиз белков разбавленными кислотами (серной и соляной) или щелочами при нагревании. Гораздо реже для этих целей
10 используют ферменты, так как производство последних является дорогостоящим, а также требует последующей инактивации, что в конечном итоге приводит к увеличению стоимости целевого продукта.

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

В частности, известен способ получения гидролизатов из рыбы, моллюсков и ракообразных, согласно которому животное сырье нагревают до температуры не ниже 75°C для инактивации ферментов, обрабатывают комплексом протеаз *Bacillus subtilis*
20 при 50-60°C и рН 6-7 для деградации белков до аминокислот и пептидов, смесь нагревают до 75°C для инактивации протеаз. Затем смесь обрабатывают протеазами из плесени *Koji* при 40-50°C рН 6-7 в течение 1-3 ч для разложения белков до пептидов с молекулярной массой <3000 и свободных аминокислот [1].

Известны способы получения белковых гидролизатов с использованием ферментного
25 комплекса "Коллагеназа", который получают из отходов рыбоперерабатывающей промышленности [2-4].

В качестве прототипа выбран способ получения белковых гидролизатов из животных и растительных тканей путем гидролиза белоксодержащего сырья "Коллагеназой краба", инактивации фермента, отделения целевого продукта ультрафильтрацией,
30 концентрирования и сушки продукта [6].

Способ получения белковых гидролизатов в прототипе осуществляют путем ферментативного гидролиза животного и растительного белоксодержащего сырья с последующей инактивацией ферментов. Сырье подвергают гидролизу гепатопанкреасом промысловых видов крабов, далее целевой продукт отделяют фильтрацией,
35 концентрируют и высушивают.

Гидролиз ведут 2-6 ч, преимущественно 4 часов при рН между 6,5 9,0, преимущественно 8,5, с последующей термоинактивацией ферментов при 55-100°C.

Для получения продукта высокого качества проводят дополнительную очистку гидролизатов с помощью ультрафильтрации через мембранные и керамические фильтры.

40 Недостатками данного способа являются трудоемкость выделения ферментного комплекса, заключающаяся в необходимости термоинактивации ферментов при 55-100°C, что приводит к значительному удорожанию конечного продукта.

Целью изобретения является упрощение и удешевление способа получения белковых гидролизатов, за счет исключения стадии выделения ферментного комплекса, при
45 сохранении высокого качества конечного продукта.

Техническим результатом является упрощение и удешевление процесса производства, с сохранением высокого качества конечного продукта.

Сущность изобретения заключается в использовании для гидролиза

белоксодержащего сырья водного раствора органических кислот и ферментов полученного в результате культивирования штамма гриба вида *Fusarium Sambusinum*.

Взаимодействие белоксодержащего сырья с органическими кислотами и ферментами приводит к образованию новых композиций органических соединений и к изменению биологической активности.

На основе этих растворов выпускаются БАДы, кормовая добавка для птиц и животных (патенты RU 2181018, RU 2311045, RU 2259209, RU 2268620, RU 2092179, RU 2376366) стимулятор роста микроорганизмов и адьювант (патент RU 2482175), а также запатентованы способы выращивания растений с использованием этих растворов (№ RU 2259209) и т.д.

Согласно патенту RU №2268620 культуральная жидкость гриба вида *Fusarium Sambusinum* содержит ферменты: коллагеназы - 100-800 ед/мл, протеазы - 1-2 ед/мл, пектиназы - 0,4-0,8 ед/мл.

Эти ферменты с одной стороны выступают как катализаторы гидролиза, а с другой могут быть использованы в составе целевых продуктов аналогично зарегистрированных.

В общем виде заявленное изобретение представляет собой способ получения биологически активного средства путем гидролиза белоксодержащего сырья, содержащего растительный белок,

закрывающийся в том, что белоксодержащее сырье, содержащее растительный белок, подвергают гидролизу водным раствором

органических кислот и ферментов, полученным в результате культивирования штамма гриба вида *Fusarium Sambusinum* при температуре 35-40°C, в соотношении компонентов 1:50, при периодическом перемешивании в течение 18-24 часов, до получения белкового гидролизата, затем белковый гидролизат сепарируют, фильтруют, концентрируют и при необходимости нормализуют, согласно целевому предназначению, с получением биологически активного средства.

Для гидролиза используют водный раствор органических кислот и ферментов, полученный в результате культивирования штаммов гриба вида *Fusarium Sambusinum*, выбранного из ряда *Fusarium Sambusinum* ВКМ F-261109D, *Fusarium Sambusinum* F-165D-BCB-916(PS-64), *Fusarium Sambusinum* F-165D-BCB-917, *Fusarium Sambusinum* F-3051D, *Fusarium Sambusinum* F-3052D, *Fusarium Sambusinum* F-8427D, *Fusarium Sambusinum* F-199D-52587, *Fusarium Sambusinum* F-676D-139C.

В качестве белоксодержащего сырья в заявленном способе можно использовать:

- биомассу бифидобактерий видов *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, лактобацилл видов; *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* и *Streptococcus thermophilus*;

- биомассу мицелиального гриба *Nadsoniella nigra*, штамм №ВКМ F - 2137;

- дрожжи;

- сборы лечебных трав, содержащие растительный белок, или кормосмеси растительного происхождения, содержащие растительный белок, или, соевый концентрат, или соевый шрот, или соевую муку, или кукурузную муку, или пшеничную муку, или пшеничные отруби, или продукты переработки рапса и других зернобобовых.

Для интегральной оценки изменения биологической активности гидролизатов были использованы методические рекомендации МЗ РФ №99/96 "Электропунктурный вегетативный резонансный тест" и методическими рекомендациями М98/232 МЗ РФ "Возможности компьютеризированной электропунктурной диагностики по методу Р. Фолля в терапии методами рефлексотерапии и гомеопатии". Согласно методу вегеторезонансного тестирования ВРТ можно моделировать влияние растворов на

активность метаболических процессов в тканях того или иного органа. Результат получается в виде процентов изменения компенсаторных возможностей для конкретного человека.

В качестве маркера использовался показатель изменения относительного значения энтропии, аналогично предложенному в патенте №2466402. Энтропия рассчитывалась по формуле К.Э. Шеннона:

$$H = - \sum_{i=1}^n (a_i/100) \times \log_2 (a_i/100),$$

где H - значение энтропии в отн. ед.; $i=1, 2 \dots n$ - номер органа; a_i - изменения компенсаторной реакции относительно текущего состояния, %. В качестве продукта заведомо обладающего биологической активностью, как некоторый эталон биологической активности, воспользуемся БАД Флоравит Э (Свидетельство о государственной регистрации № RU.77.99.88.003.E.001926.02.15 от 02.02.2015 г.).

Раствор БАД Флоравит Э производится путем переработки культуральных жидкостей, получаемых в результате культивирования штамма гриба вида *Fusarium Samburginum*. Аналогично производятся кормовые добавки (Регистрационный № ПВР-2-4.1/02705 от 27 апреля 2011 г) а также продукты по патентам №2482175 (Способ получения стимулятора роста микроорганизмов) и №2493257 (Способ получения адьюванта). Биологическая активность БАД Флоравит Э доказана как клинически, так и 20-летней практикой применения.

Для оценки биологической активности гидролизатов представляется целесообразным определять влияние на, не менее чем 10 органах, включая не менее 5 эндокринных желез, и не менее чем 10 человек разных возрастов и пола. Для каждого из органов показания усредняются и суммируются. Положительным влиянием считается, если полученный результат имеет знак (-), а величина, по модулю, чем больше, тем лучше. Сравнение полученных значений энтропии для гидролизатов с таковыми для Флоравита Э представляется адекватным ориентиром для оценки качества предлагаемого способа гидролиза.

Примеры реализации заявленного способа.

Пример 1. Гидролизу подвергают смесь лиофильно высушенной биомассы бифидобактерий видов *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, лактобацилл видов; *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* и *Streptococcus thermophilus*. Порошок каждого из видов берется в количестве 0,8-1,1 грамм, концентрация клеток бактерий каждого из видов составляет $1 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^8$ ед/гр, всего 20 грамм. Порошок заливается в соотношении 1:50 культуральной жидкостью гриба вида *Fusarium Samburginum*. Водный раствор выдерживается при температуре 35-40°C в течение 18-24 часов при периодическом перемешивании. Произведенный гидролизат сепарируется, фильтруется и при необходимости нормализуется, например, по содержанию коллагеназы согласно целевому предназначению.

Пример оценки изменения биологической активности проиллюстрирован в таблице 1.

Для оценки биологической активности методом ВРТ тестировалось влияние на метаболическую активность тканей 11 органов (см. табл. 1) 11 человек (мужчины и женщины в возрасте от 50 до 75 лет) выбранные случайным образом.

Усредненные значения процентов изменения помещены в таблицу. Одновременно тестировались влияние БАД Флоравит Э биологическая активность которого подтверждена клинически и 20 летней практикой применения, а также тестировалось влияние гидролизата, произведенного как показано в примере 1.

5 Рассчитывалось значение энтропии для каждого органа H , суммарное значение $H_c = H_1 + H_2 + H_3 + H_4 + H_5 + H_6 + H_7 + H_8 + H_9 + H_{10} + H_{11}$ соответственно для БАД Флоравит Э имеем $H_{сф} = -0,383$ и для гидролизата $H_{сг} = -0,671$.

Значение энтропии указывает на положительное влияние вышеуказанных растворов на протекающие метаболические процессы в тестируемых органах.

10 Увеличение относительного значения $H_{отн} = -0,671/(-0,383) = 1,75$ однозначно указывает на возрастание биологической активности раствора при проведении гидролиза как описано в примере 1. Увеличение выборки (органов и человек) не оказывает значительного влияния на полученный результат.

Пример 2. Гидролизу подвергают биомассу мицелиального гриба *Nadsoniella nigra*, 15 штамм № ВКМ F - 2137, отделенную фильтрованием от культуральной жидкости. Лиофильно высушенная биомасса заливается в соотношении 1:50 культуральной жидкостью гриба вида *Fusarium Sambucinum* Гидролиз проводят в течение 18-24 часов при температуре 35-40°C.

20 Полученный гидролизат сепарируется, фильтруется. Относительные значения $H_{отн} = H_{сг}/H_{сф} = -0,425/(-0,383) = 1,11$ однозначно указывает на возрастание биологической активности.

Пример 3. Гидролизу подвергают биомассу пекарских дрожжей отделенную 25 фильтрованием от культуральной жидкости. Лиофильно высушенная биомасса заливается в соотношении 1: 50 культуральной жидкостью гриба вида *Fusarium Sambucinum*. Гидролиз проводят в течение 18-24 часов при температуре. 35-40°C.

Полученный гидролизат сепарируется, фильтруется и нормализуется по содержанию, например, коллагеназы. Относительные значения $H_{отн} = H_{сг}/H_{сф} = -0,44/(-0,383) = 1,15$ указывает на возрастание биологической активности.

Пример 4. Гидролизу подвергают сборы лечебных трав. Например, берется набор 30 трав рекомендованный при нарушениях работы кишечника и печени - листья сенны, цветки бессмертника, травы тысячелистника, мяты перечной, череды в равных частях по весу. Сбор тщательно измельчается, до размеров частиц не более 1 мм и заливается в соотношении 1:50 культуральной жидкостью гриба вида *Fusarium Sambucinum* полученной согласно патента RU №2268620. Гидролиз проводят в течение 18-24 часов 35 при температуре 35-40°C.

Полученный гидролизат сепарируется, фильтруется и нормализуется по содержанию, например, коллагеназы. Оценка относительной биологической активности $H_{отн} = H_{сг}/H_{сф} = -0,448/(-0,383) = 1,17$.

40 Биологически активные средства, получаемые по заявленному способу, целесообразны для широкого применения в производстве лечебно-профилактического и диетического питания для различных категорий взрослых и детей, в производстве кремов и шампуней, кормов для сельскохозяйственных животных, в медицине для парентерального питания и в биотехнологии.

Таблица 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	железы желудка	поджелудочная железа и селезенка	сальниковый разрез печени	книпочки	всплывающая железа	зиффа	надпочечники	надпочечник справа	надпочечник слева	гипофиз и дварши-товидная железа	гипофиз	Сумма Нерф и Нет
Влияние БАД Флоравайт, %	0	17	20	1	-1	2	-9	4	20	28	-3	
Изм. ЭНТОО-ЛИК	0.00	-0.08	-0.10	0.00	0.00	-0.01	0.04	-0.02	-0.10	-0.14	0.01	-0.383
Влияние гидролизата, %	31	17	21	-1	15	6	0	6	21	22	3	
Изм. ЭНТОО-ЛИК	-0.15	-0.08	-0.10	0.00	-0.07	-0.03	0.00	-0.03	-0.10	-0.11	-0.01	-0.671

(57) Формула изобретения

Способ получения биологически активного средства, заключающийся в том, что сырье, содержащее белок, выбранное из биомассы бифидобактерий видов *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum*, лактобацилл видов *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* и *Streptococcus thermophilus*, биомассы штамма мицелиального гриба *Nadsoniella nigra* ВКМ F - 2137, пекарских дрожжей, сбора лечебных трав, подвергают гидролизу взаимодействием с культуральной жидкостью, полученной в результате культивирования штамма гриба вида *Fusarium sambucinum* при температуре 35-40°C, в соотношении компонентов 1:50, при периодическом перемешивании в течение 18-24 часов до получения белкового гидролизата, сепарируют, фильтруют, концентрируют и при необходимости нормализуют, согласно целевому предназначению, с получением биологически активного средства.