

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 158495 B

(21) Patentansøgning nr.: 2175/83

(51) Int.Cl.⁵ A 61 K 35/60

(22) Indleveringsdag: 16 maj 1983

(41) Alm. tilgængelig: 05 sep 1984

(44) Fremlagt: 28 maj 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 04 mar 1983 JP 58/34385

(71) Ansøger: *Nihon Bussan Kabushiki Kaisha; 7182-78, Kaigandori; Karatsu-shi; Saga-ken, JP

(72) Opfinder: Takashi *Takasaki; JP, Mitsunori *Iwamoto; JP

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af fiske- og/eller skaldyrsekstrakter til medicinske formål

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 4036993

(57) Sammendrag:

2175-83

Ved fremgangsmåden fås ekstrakterne ved nedbrydning af fisk- og/eller skaldyr ved et pH på 6,0 til 7,0 med en *Bacillus subtilis* produceret proteinase og nedbrydning i samme pH-område med en Koji skimmelsvamp produceret proteinase. Ekstrakterne indeholder peptidaminsyrer, der hver har en molekylvægt på væsentligt mindre end 3000 samt frie aminosyrer. Ekstrakterne har vist sig anvendelige som ernæringsbalanceringsmidler, anti-ulcermidler, diabetesmidler, antilipemiske midler og til helbredelse af rheumatisme og arthritis.

DK 158495 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af farmakologisk virksomme fiske- og/eller skaldyrsekstrakter ved enzymatisk nedbrydning af fiske- og/eller skaldyrspoteiner ved hjælp af proteinaser ved
5 forhøjet temperatur, adskillelse af de dannede nedbrydningsprodukter fra oliefasen og remanensen og eventuelt efterfølgende koncentrering. Nærmere angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af fiske- og/eller skaldyrsekstrakter med ernæringsbalancerende virkning,
10 anti-ulcer virkning, insulinlignende virkning, anti-lipæmisk virkning og helbredende virkning på rheumatisme og arthritis.

En af de kendte fremgangsmåder til ekstraktion af fiskekødsekstrakter er beskrevet i japansk patentskrift nr. 31935/1978 svarende til US-patentskrift nr. 4036.993. Ved denne fremgangsmåde opvarmes rå fisk, der ikke er blevet underkastet forbehandling såsom opskæring eller maling til en temperatur på ikke mindre end 60°C efterfulgt af dekomposition ved anvendelse af en
20 alkalimodstandsdygtig proteinase ved 50 til 60°C og ved et pH på 9 til 10, og de dekomponerede produkter nedbrydes derefter yderligere ved anvendelse af en syremodstandsdygtig proteinase efter justering af pH-værdien til pH 5 til 6. Denne kendte fremgangsmåde har imidlertid en ulempe i, at råmaterialets pH-værdi skal justeres
25 til pH 9 til 10 ved tilsætning af en natriumionholdig forbindelse såsom natriumcarbonat for at aktivere den alkalimodstandsdygtige proteinase, hvilket er uheldigt ud fra et fødevarer-sanitært synspunkt. Endvidere medfører
30 denne kendte fremgangsmåde en besværlig og vanskelig pH-justeringsoperation, eftersom reaktionsproduktet skal justeres til en pH på 5 til 6 inden tilsætningen af den syremodstandsdygtige proteinase. En anden ulempe ved denne kendte fremgangsmåde er, at den alkalimodstandsdygtige proteinase ikke fuldstændig deaktiveres
35 mod fortsættelse af dens virkning efter tilsætning af den syremodstandsdygtige proteinase, hvilket gør det

vanskeligt at fremstille en ekstrakt, der kun indeholder de peptidaminosyrer, der hver har en molekylvægt på i det væsentlige mindre end 3000, og frie aminosyrer.

Det primære formål med opfindelsen er at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af fiske- og/eller skaldyrsekstrakter med farmaceutiske funktioner og i det væsentlige bestående af peptidaminosyrer, hver med en molekylvægt på i det væsentlige mindre end 3000, og frie aminosyrer.

10 Formålet med opfindelsen er endvidere at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af fiske- og/eller skaldyrsekstrakter, ved hvilken en vanskelig pH-justeringsoperation elimineres.

Et yderligere formål med opfindelsen er at til-
15 vejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af fiske- og/eller skaldyrsekstrakter med ernæringsbalancerende virkning. Med ernæringsbalancerende virkning menes heri en virkning til forbedring af sundhedstilstanden og undgåelse af sygelige tilstande.

20 Et yderligere formål med opfindelsen er også at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af fiske- og/eller skaldyrsekstrakter med anti-ulcerfunktion.

Et yderligere formål med opfindelsen er at til-
25 vejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af fiske- og/eller skaldyrsekstrakter med insulinlignende funktion.

Endvidere er det formålet med opfindelsen at angive en fremgangsmåde til fremstilling af fiske-
30 og/eller skaldyrsekstrakter med antilipæmisk funktion.

Formålet med opfindelsen er derudover at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af fiske- og/eller skaldyrsekstrakter med helbredende virkning på rheumatisme og arthritis.

35 Disse og andre formål med opfindelsen vil fremgå af den følgende beskrivelse deraf.

Ifølge opfindelsen tilvejebringes en fremgangsmåde til fremstilling af farmakologiske virksomme fiske- og/eller skaldyrsektrakter ved enzymatisk nedbrydning af fiske- og/eller skaldyrspoteiner ved hjælp af proteina-
5 ser ved forhøjet temperatur, adskillelse af de dannede nedbrydningsprodukter fra oliefasen og remanensen og eventuelt efterfølgende koncentrerings, der er ejendommelig ved, at man

- 10 a) fuldstændigt inaktiverer de autolyseenzymmer, der findes i fiskene og/eller skaldyrene, ved opvarmning af hele, rå fisk og/eller skaldyr i 10 min. til 1 time ved en temperatur på mindst 75°C,
- 15 b) nedbryder proteinerne indeholdt i fiskene og/eller skaldyrene ved behandling af fiskene og/eller skaldyrene ved en temperatur på 50-60°C og en pH-værdi fra 6,0 til 7,0 med en proteinase fra *Bacillus subtilis* til de foreligger på proteosetrinnet,
- 20 c) fuldstændigt inaktiverer proteinasen, der stammer fra *Bacillus subtilis*, ved forhøjelse af temperaturen til mindst 75°C,
- 25 d) sætter en proteinase dannet af en Koji-skimmelsvamp til de således ud fra fiskene og/eller skaldyrene opnåede proteoser og behandler blandingen med proteinasen ved en temperatur på 40-50°C og pH-værdi fra 6,0 til 7,0 i 1-3 timer, indtil proteoserne er nedbrudt til peptidamino-syrer med en molekylvægt, der er væsentligt lavere end 3.000 og frie aminosyrer, og
- 30 e) fuldstændigt inaktiverer proteinasen opnået ud fra Koji-skimmelsvampen ved forhøjelse af temperaturen til mindst 75°C.

Fig. 1 er et fotografi, der viser lungerne på et
35 fedesvin indgivet en makrelekstrakt fremstillet ved den omhandlede fremgangsmåde samt lungerne på et kontrolfe-

desvin, der ikke var indgivet ekstrakten.

Fig. 2 er et fotografi, der viser hjertet på et fedesvin indgivet en makrelekstrakt fremstillet ved den omhandlede fremgangsmåde og hjertet på et kontrolfedesvin, der ikke var indgivet ekstrakten.

Fig. 3 er et fotografi, der viser leveren på et fedesvin indgivet en makrelekstrakt fremstillet ved den omhandlede fremgangsmåde og leveren på et kontrolfedesvin, der ikke var indgivet ekstrakten.

Fig. 4 er et fotografi, der viser en anden opskåret leverprøve fra kontrolfedesvinet i fig. 3.

Fig 5 er et fotografi, der viser maven på en rotte indgivet et makrelekstrakt fremstillet ved den omhandlede fremgangsmåde og maverne på kontrolrotter, der ikke var indgivet ekstrakten.

Fig. 6 er en grafisk fremstilling, der angiver den insulinlignende virkning af en makrelekstrakt fremstillet ved den omhandlede fremgangsmåde og viser mængderne af fra fedtceller afgivne frie fedtsyrer.

Fig. 7 er en grafisk fremstilling, der viser hævningsprocenten hos rotter indgivet en makrelekstrakt fremstillet ved den omhandlede fremgangsmåde og hævningsprocenten hos rotter, der ikke var indgivet ekstrakten.

Den omhandlede opfindelse beskrives nærmere nedenfor. Opfinderne har undersøgt en fremgangsmåde til fremstilling af fiske- og/eller skaldyrsekstrakter omfattende de trin, at et antal fisk og/eller skaldyr nedbrydes ved et pH på 6,0 til 7,0 og en temperatur på 50 til 60°C ved indvirkning fra en proteinase opnået ud fra *Bacillus subtilis*, at proteinasen opnået ud fra *Bacillus subtilis* fuldstændigt deaktiveres, og at de fra fiskene og/eller skaldyrene opnåede produkter derefter nedbrydes ved indvirkning af en proteinase opnået ud fra *Koji* skimmelsvamp ved et pH på 6,0 til 7,0 og en temperatur på 40 til 50°C i 1 til 3 timer. Som et resultat

har det vist sig, at der ved den ovennævnte fremgangsmåde kan opnås fiske- og/eller skaldyrsekstrakter, der i det væsentlige er sammensat af peptidaminosyrer, hver med en molekylvægt på væsentliget mindre end 3000
5 samt frie aminosyrer, og at de ved den ovennævnte fremgangsmåde fremstillede fiske- og/eller skaldyrsekstrakter har forskellige farmaceutiske funktioner, eftersom hele kroppen af fiskene og/eller skaldyrene inklusiv indre organer nedbrydes ved fremgangsmåden. Det har end-
10 videre vist sig, at de fiske- og/eller skaldyrsekstrakter, der fremstilles ved den omhandlede fremgangsmåde, og som har den særlige ovennævnte aminosyresammensætning, nemlig de proteiner, der findes i de rå fisk og/eller skaldyr, nedbrudt til dannelse af en blanding
15 i det væsentlige sammensat af peptidaminosyrer, hver med en molekylvægt på væsentligt mindre end 3000 samt frie aminosyrer, har ernæringsbalancerende virkning, anti-ulcervirkning, insulinlignende virkning, antilipæmisk virkning og en helbredende virkning på rheumatisme og
20 arthritis.

Ved den omhandlede fremgangsmåde anbringes hele rå fisk og/eller skaldyr såsom hestemakrel, makrel, sardin, makrelgedde, tun, Atkamakrel, torsk, ti- og ottearmet blæksprutte, rejer, store rejer, østers,
25 corbicula, korthalsede muslinger, ferskvandsmuslinger med hård skal, "ark shell"-arter og muslingearter i et reaktionskar, uden at de udsættes for nogen forbehandling såsom opskæring eller formaling, til dannelse af en opslemning. Materialer af stor størrelse kan tilskæres
30 til passende dimensioner. Umiddelbart efter anbringelse i reaktionskarret hæves temperaturen af de ifyldte fisk og/eller skaldyr til ikke mindre end 75°C, fortrinsvis ikke mindre end 80°C for fuldstændig at deaktivere de autolyseenzymmer, der findes i de rå fisk og/eller skal-
35 dyr og samtidig fjerne den fiskelugt eller dårlige odeur, der udsendes af autolyseprodukterne. Indholdet i

reaktionskarret kan holdes ved den hævede temperatur i almindelighed fra ca. 10 minutter til ca. 1 time for at deaktivere autolyseenzymmerne. Ved den tidligere nævnte kendte fremgangsmåde er den laveste temperatur til deaktivering af autolyseenzymmer 60°C. Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af fiske- og/eller skaldyrsekstrakter med farmaceutiske funktioner, bør den laveste temperatur til deaktivering af autolyseenzymmer imidlertid ikke være mindre end 75°C for at fjerne fiskeagtig lugt eller dårlig odeur fuldstændigt.

Derefter nedbrydes de proteiner, der findes i fiskene og/eller skaldyrene til proteosetrinnet ved en temperatur på fra 50 til 60°C og et pH på 6,0 til 7,0, fortrinsvis 6,0 til 6,5, ved tilsætning af en fra *Bacillus subtilis* frembragt proteinase. Et foretrukket enzym, til brug ved dette trin, er et i fiskevæv opløseligt enzym, der fremstilles i Japan af Kinki Yakuruto Manufacturing Co., Ltd. og sælges gennem Yakuruto Biochemistry Co., Ltd., som salgsagent, under varemærket "AROAZE AP-10", og dette enzym anvendes i de følgende eksempler. Varigheden af dette nedbrydningstrin er ikke kritisk og ligger i almindelighed fra 1 til 3 timer, fortrinsvis 1,5 til 2 timer. Ved den omhandlede fremgangsmåde kræves pH-justeringsoperationen ikke, eftersom dette nedbrydningstrin udføres ved et pH på 6,0 til 7,0, der ligger indenfor det neutrale eller svagt sure område, og opsvulmningen af muskelkødet i de rå fisk og/eller skaldyr og dets separering fra benene er ikke nævneværdig i sammenligning med den fremgangsmåde, hvor det første nedbrydningstrin udføres i det alkaliske pH-område. Ved at fortsætte nedbrydningen i det pH-område, der er defineret i kravene, nemlig ved et pH på 6,0 til 7,0, nedbrydes proteinerne fuldstændigt til proteoser uden at der frembringes peptidaminosyrer med lav vægt og frie aminosyrer. Det er væsentligt, at proteinerne fuldstændig nedbrydes til proteosetrinnet i dette trin til

opnåelse af en blanding, der i det væsentlige består af proteoser, og som er velegnet til at blive nedbrudt ved den enzymatiske nedbrydning i det efterfølgende trin.

Derefter hæves temperaturen af indholdet i reaktionskarret til mindst 75°C, fortrinsvis til en temperatur på ikke mindre end 80°C. Under dette trin, ved hvilket indholdet i reaktionskarret holdes ved den hævede temperatur, deaktiveres den med *Bacillus subtilis* fremstillede proteinase, der anvendtes i det foregående nedbrydningstrin fuldstændigt. Hertil holdes indholdet i reaktionskarret ved deaktiveringstemperaturen i almindelighed 10 minutter til 1 time, fortrinsvis 15 til 30 minutter. Såfremt dette deaktiveringstrin udelades, fortsætter proteinasen, der anvendtes i det forudgående nedbrydningstrin, dets virkning på indholdet i karret under det efterfølgende enzymatiske nedbrydningstrin, hvilket resulterer i, at det mislykkes at fremstille fiske- og/eller skaldyrsekstrakter indeholdende en særlig sammensætning af aminosyrer og med forskellige farmaceutiske funktioner, og formålet med opfindelsen kan ikke opnås.

Det efterfølgende trin i den omhandlede fremgangsmåde er et enzymatisk nedbrydningstrin udført ved en temperatur på 40 til 50°C og et pH på 6,0 til 7,0 ved tilsætning af en med *Koji* skimmelsvamp fremstillet proteinase. Der er ingen grund til at justere pH-værdien af reaktionskarrets indhold inden dette trin. Et særligt anvendeligt enzym til brug ved dette trin fremstilles i Japan af Kinki Yakuruto Manufacturing Co., Ltd. og sælges gennem Yakuruto Biochemistry Co., Ltd., som salgsgagent, under varemærket "PUNCHDAZE". Eftersom den med *Bacillus subtilis* fremstillede proteinase fuldstændig er blevet deaktiveret inden dette trin, indvirker kun den med *Koji* skimmelsvamp fremstillede proteinase på de i det forudgående nedbrydningstrin fremstillede proteoser til at nedbryde disse til peptidaminosyrer, hver med en

molekylvægt på væsentligt mindre end 3000 og til frie aminosyrer. Varigheden af dette nedbrydningstrin er fra 1 til 3 timer, fortrinsvis ca. 2 timer. Eftersom nedbrydningstrinnet udføres under mere moderate betingelser i sammenligning med betingelserne i den tidligere kendte fremgangsmåde, nemlig ved en lavere temperatur indenfor et pH-område i den svagt sure eller neutrale zone, kan der opnås den tilstræbte særlige sammensætning af aminosyrer. Såfremt varigheden af dette nedbrydningstrin er mindre end 1 time, efterlades dele af proteoserne, hvilket resulterer i, at det mislykkes at opnå den tilstræbte særlige sammensætning af aminosyrer. Såfremt tidsrummet for dette nedbrydningstrin overstiger 3 timer, påvirkes produktets farmaceutiske funktioner derimod uheldigt.

Umiddelbart efter nedbrydningstrinnet hæves temperaturen af indholdet i reaktionskarret til ikke mindre end 75°C, fortrinsvis ikke mindre end 80°C for fuldstændig at deaktivere den med Koji skimmelsvamp fremstillede proteinase for at undgå yderligere indvirkning fra proteinasen, der fører til nedbrydning af produktet, og for at undgå, at produktets farmaceutiske funktioner nedsættes.

Nedbrydningsprodukterne separeres derefter ved sædvanlige metoder under anvendelse af en centrifugalseparator eller andre kendte apparater til et fiske- og/eller skaldyrsekstraktlag, et olielag og en rest inkluderende benstykker og ikke nedbrudte materialer. Fiske- og/eller skaldyrsekstrakten kan derefter filtreres og koncentreres under reduceret tryk ved en temperatur, der ikke er større end 60°C.

De ved den omhandlede fremgangsmåde opnåede fiske- og/eller skaldyrsekstrakter indeholder et antal peptidaminosyrer og frie aminosyrer, inklusiv glutamin, asparaginsyre, lysin, arginin, glycin, alanin, leucin, prolin, histidin, phenylalanin, serin osv. og er i det

væsentlige sammensat af de, der hver har en molekylvægt på væsentligt mindre end 3000. Ifølge den omhandlede opfindelse kan der fremstilles fiske- og/eller skaldyrseks-
trakter, der indeholder ca. 30 vægt% vand, mere end 50
5 vægt%, f.eks. ca. 60 vægt% råproteiner, og ikke mere end
1 vægt% råfedtstoffer. De ekstrakter, der fremstilles
ved den omhandlede fremgangsmåde, har forskellige far-
maceutiske funktioner, som det angives nedenfor i de an-
førte eksempler.

10 Den omhandlede opfindelse beskrives i detaljer
under henvisning til nogle eksempler derpå. I de føl-
gende eksempler angiver "%" vægt% med mindre andet er
angivet.

15 Eksempel 1

Fremstilling af fiskeekstrakt

4 tons makrel i form af hele fisk (angivet med
20 Saba i tabellerne og figurerne) anbragtes uden nogen
forbehandling i et reaktionkar med en omrører sammen med
4 tons vand, og karrets indhold opvarmedes til 80°C.
Efter 15 minutter sænkedes temperaturen af karrets ind-
hold til 55°C og tilsattes 4 kg proteinase fremstillet
25 af *Bacillus subtilis* til omsætning ved pH 6,2 i 1,5
time. Derefter hævedes temperaturen af indholdet af
karret til 80°C og holdtes ved den temperatur i 15
minutter efterfulgt af afkøling til 45°C, hvor 2 kg med
Koji skimmelsvamp fremstillet proteinase tilsattes og
30 holdtes ved den temperatur i 2 timer til omsætning af
indholdet ved pH 6,5.

Derefter opvarmedes indholdet i karret igen til
80°C for at deaktivere proteinasen. Reaktionsproduktet
separeredes efter en almindelig metode ved anvendelse af
35 en centrifugalseparator i et ekstraktlag, et olielag
og en rest indeholdende benstykker og ikke omsatte ma-

terialer. Ekstraktlaget filtreredes og koncentreredes under reduceret tryk ved 60°C til opnåelse af en makrelekstrakt eller Sabaekstrakt.

Makrelekstrakten analyseredes, hvorved man fandt, at den indeholdt 35,4% vand, 57,4% råproteiner, 0,4% råfedtstoffer, 0,5% carbohydrater og 6,3% askeindhold, og at den havde en brændværdi på 235 kalorier/g. Den chromatografiske analyse af ekstrakten viste, at molekylvægtene havde tre toppe ved 2500, 1300 og 760, hvilket viste, at molekylvægten af aminosyrekomponenterne var i det væsentlige mindre end 3000. Sammensætningen af grupperede aminosyrer og frie aminosyrer er angivet i tabel I.

15 T A B E L I

<u>Grupperede og frie aminosyrer i kompositionen (g/100 g).</u>			
	Arginin	3,40	Alanin: 3,62
	Lysin	4,37	Glycin: 4,37
20	Histidin	2,76	Prolin: 2,53
	Phenylalanin	1,44	Glutamin: 7,46
	Tyrosin	1,27	Serin: 2,24
	Leucin	3,31	Threonin: 2,14
	Isoleucin	1,70	Asparaginsyre: 4,43
25	Methionin	1,23	Tryptophan: 0,31
	Valin	2,38	Systein: 0,27

Eksempel 2

30 Ernæringsbalancerende virkning

Den i eksempel 1 fremstillede makrelekstrakt fortyndedes 30 gange med vand og 10 cm³ fortyndet ekstrakt indgaves fedesvin hver dag efter afvænnningstiden ved at blande den i føden, og fedesvinene dræbtes efter 6 måneders opfodring og underkastedes sammenligning med fede-

svin, der ikke var indgivet ekstrakten.

Resultaterne af anatomiske observationer er
anført i tabel II.

5

10

15

20

25

30

35

T A B E L II

5	Lungerne	Bedre end lunger på andre fedesvin (uden indgivning af ekstrakten) med klar farve og uden sygeligt fokus. (Se note 1)
10	Hjerte	Bedre end hjerter fra andre fedesvin (uden indgivning af ekstrakten) med ydervæge uden vedhæftet fedt. (Se note 2).
15	Lever	Leverne på fedesvin indgivet ekstrakten havde ingen sygelige fokus eller fjernede dele og havde en smuk brun farve. (Se note 3)
20	Tyk- og tyndtarme	Kun lidt fedt omgav tarmene på fedesvine, der havde fået ekstrakten.
25	Krop	Kødet på fedsvinene, der var indgivet ekstrakten havde god form og tyk masse vedhæftet passende fedt. Kødet på fedesvinene indgivet ekstrakten var tæt og havde god struktur og farve med fedt med god
30		farve.

I sammenligning med almindelige fedesvin (uden ekstraktindgivning) observeredes klare forskelle i, at de mængder fedt, der hæftede til organerne nedsattes, og at der ikke observeredes nogen sygelige eller fjernede dele.

Note 1: Fedesvinenes lunger er vist i fotografiet i fig. 1, hvor A viser lungerne på et fedesvin indgivet makrelekstrakten ifølge opfindelsen, og B viser lungerne på et fedesvin uden ekstraktindgivning. Som vist har A en klar farve og intet sygeligt fokus, hvorimod B har en uklar farve og et sygeligt fokus 1.

Note 2: Fedesvinenes hjerter er vist i fotografiet i fig. 2, hvor A er hjertet på et fedesvin indgivet makrelekstrakten ifølge opfindelsen, og B er hjertet på et fedesvin uden indgivning af ekstrakten. Som vist har hjertet A ikke noget vedhæftet fedt, hvorimod hjertet B har en stor mængde fedt 2.

Note 3: Fedesvinenes lever er vist i fotografierne i figurerne 3 og 4, hvori leveren A i fig. 3 viser leveren fra et fedesvin indgivet makrelekstrakten ifølge opfindelsen, og B i fig. 3 viser leveren fra et fedesvin uden indgivning af ekstrakten. Leveren A har intet sygeligt fokus, hvorimod leveren B har et sygeligt fokus 3. Fig. 4 er et fotografi af en opskåret prøve fra fedesvinsleveren vist ved B i fig. 3, hvoraf det ses, at det sygelige fokus 4 strækker sig dybt ind i det indvendige.

Eksempel 3

Anti-ulcusfunktion

30

Ved anvendelse af den i eksempel 1 opnåede makrelekstrakt afprøvedes makrelekstraktens anti-ulcusfunktion under anvendelse Shay Ulcer, der er en af de ulcusdannelsesmodeller, hvor der anvendes rotter. Ekstraktdoseringens indflydelse på mavesaftsekretionen afprøvedes med den såkaldte maveportafsnøringsmetode.

Prøvemethoder:

1) Anti-ulcusfunktion (maveportafsnøringsulcer).

Hankønsrotter af Wistar-familien, hver med en
5 legemsvægt på 150 til 200 g udsattes for faste i 24 ti-
mer og derefter afsnøredes maveportområderne, generelt
ifølge Shay et al's metode (se note (1)) under etherbe-
døvelse.

Efter henstand af rotterne i 12 timer uden til-
10 førsel af foder og vand, fjernedes rotternes maver og de
ulcera, der hver var udviklet forrest i maveområdet, in-
dikeredes med ulcusindeks ifølge Narumi et al's metode
(se note (2)).

De afprøvede rotter var hver blevet tildoseret
15 500 mg/kg makrelekstrakt opløst i vand gennem munden
én time inden maveportafsnøringen.

2) Hæmmende virkning på mavesaftsekretionen.

Virkningen bestemtes generelt ifølge Shay et al's
20 metode. Nærmere angivet udsattes hankønsrotter af
Wistar-familien (legemsvægt: 150 til 200 g) for faste i
48 timer, og derefter afsnøredes deres maveportområder.
Efter 4 timer opsamledes den mavesaft, der var oplagret
i maverne og henholdsvis gastrisk volumen, total syre-
25 produktion og dets totale peptiske virkning målt.

Den totale syreproduktion bestemtes ved titrering
med 0,02 N NaOH med phenolphthalein som indikator, og
den totale peptiske virkning bestemtes generelt ifølge
Anson metoden (se note (3)) med kasein som basis-
30 materialet.

De afprøvede rotter indgaves hver ekstrakten gen-
nem munden 1 time inden maveportafsnøringen.

Note (1): H. Shay, S.A. Kowarov, S.S. Fels, D. Me-
ranze, M. Gruentein og M. Siplet, Gastro-
35 enterology, 5, 43 (1945)

Note (2): S. Narumi, T. Hirata, K. Gomaibashi og M. Kanno, J. Takeda Res. Lab., 29, 85 (1970)

Note (3): M.L. Anson, J. Gen. Physiol., 22, 79 (1938)

Prøveresultater:

5 Detaljer og resultater fra de ovennævnte undersøgelser er anført i tabel III.

Til sammenligning er resultater opnået ved indgivelse af Atropinsulfat medtaget. Atropinsulfat er et anæstetikum som hæmmer mavefunktionen. Som vist i Fig. 10 5C udviste maven behandlet med Atropinulfat samme transparens som maven behandlet med sabaekstrakter ifølge opfindelsen (A i fig. 5). Sammenligningen viser således at sabaekstrakten medfører bevarelse af den levende maves transparens.

15

T A B E L III

	Behandling (p.o.)	Kontrol ^{a)}	Saba ekstrakt	Atropin- sulfat
20	Dosis (mg/kg)	-	500	10
	Antal rotter	8	8	8
	Ulcusindeks (middelt ± s.e.)	3,13 ± 0,55	2,63 ± 0,46	0,00 ± 0,00*
	Gastrisk volumen (ml/100 g l.v.)	4,24 ± 0,36	2,75 ± 0,50**	0,62 ± 0,18***
25	Totalt syreudbytte (μEq/100 g l.v.)	470,8 ± 42,5	303,9 ± 76,1**	43,7 ± 17,1***
	Total peptisk aktivitet mg som tyrosin/100 g l.v.	217,7 ± 38,2	157,3 ± 43,6	23,6 ± 7,4***
30	a) 0,2% C.M.C. (carboxymethylcellulose) i vand klart forskellig fra kontrolgruppen:			
	*p < 0,001	**p < 0,05	***p < 0,001	

Som det tydeligt fremgår af tabel III bemærkes 35 der betydelige forskelle i hæmningen af gastrisk volumen og total syreproduktion og den hensigt at hæmme dannel-

sen af af ulcus erkendes, når den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede makrelekstrakt indgaves i en mængde på 500 mg/kg. Fig. 5 er et fotografi, der viser maverne fra rotter, der var underkastet de undersøgelser, der er beskrevet ovenfor i dette eksempel, hvor A viser maven på en rotte indgivet den ved den omhandlede fremgangsmåde fremstillede makrelekstrakt, B viser maven på en rotte (kontrol) uden indgivning af ekstrakten, og C viser maven på en rotte indgivet atropinsulfat. Som det fremgår af fig. 5 er de opskårne maver A og C transparente og uden ulcus, hvorimod den opskårne mave B er ulcereret ved stykket 5.

Eksempel 4

15

Insulinlignende funktion

Ved anvendelse af den i eksempel 1 fremstillede makrelekstrakt undersøgtes ekstraktens insulinlignende virkning ved som indeks at anvende makrelekstraktens virkning på adrenalininduceret lipolyse i frie fedtceller.

Prøvemethode:

25

Bitestiklerne på hver rotte udtoges og de ved collagenasebehandling præparerede fedtceller anvendtes til testning ud af den hæmmende virkning på afgivelse af frie fedtsyrer fra fedtcellerne induceret ved lipolyse på grund af tilstedeværelsen af adrenalin. Undersøgelsesresultater er vist i fig. 6.

Undersøgelsesresultater:

Som vist i fig. 6 isoleredes der 5,5 μ Eq/ml frie fedtsyrer, såfremt der sattes 1 μ g/ml adrenalin til de frie fedtceller. Mængden af isolerede frie fedtsyrer reduceredes til 2,3 μ Eq/g, når der sattes 1 mIU/ml insulin

dertil.

Såfremt makrelekstrakten anvendtes i stedet for insulin observeredes der en betydelig hæmmende virkning for isolering af frie fedtsyrer, når koncentrationen af makrelekstrakten i det undersøgte system hævedes til 500 µg/ml.

Det bemærkes ud fra de i fig. 6 angivne resultater, der er beskrevet ovenfor, at den ved den omhandlede fremgangsmåde fremstillede makrelekstrakt har en insulinlignende funktion og kan anvendes som en virkningsfuld medicin til helbredelse af diabetes.

Eksempel 5

15 Cholesterolsænkende virkning

Den farmaceutiske aktivitet af den i eksempel 1 fremstillede makrelekstrakt til sænkning af cholesterolinholdet i blod eller til helbredelse af mindre leverdefekter i tilfælde med fodring med meget fedtrig kost eller foder undersøgte.

Undersøgelsesmetode:

25 En salatolie opvarmedes ved 170 til 180°C i 2 timer, mens oxygen bobledes gennem, hvorved der dannedes peroxiderede fedtstoffer. Der fremstilledes en foderblanding ved blanding af pulveriseret fodermateriale indeholdende natriumcholesterolcholat med salatolien, der indeholdt de peroxiderede fedtstoffer, og foderblandingen blev givet til en gruppe rotter. Efter 5 uger blev rotterne syge af for meget kolesterol og lette leverdefekter.

35 En gruppe rotter indoseredes makrelekstrakten for at finde ekstraktens cholesterolsænkende virkning hæmatologisk. Rotternes indre organer observeredes ud fra et

patologisk-morfologisk synspunkt. Ekstrakten indgaves hver rotte en gang om dagen gennem munden.

Undersøgelsesresultater:

- Detaljer og resultater fra undersøgelsen er vist
- 5 i tabellerne 4 og 5. Værdierne opnåedes som middel-
værdier $\pm$ standardafvigelsen ved testning af syv rotter.
Som det fremgår af tabellerne 4 og 5 erkendes
der en signifikant virkning til reduktion af indholdet
af de frie fedtsyrer, der fås fra neutrale fedtstoffer,
10 der er tegn på sygdom pga. for højt kolesterolindhold,
såfremt der tilsættes 500 mg/kg makrelekstrakt. Også
GOT-værdien (GOT = aspartataminotransaminase) viser
for den gruppe, der var indgivet ekstrakten, en signi-
fikant reduktion, GOT-værdien indikerer leversygdomme.
- 15 Ved sammenligning af kontrolværdien på 359 ± 58 for tests,
hvor Sabaekstrakt ikke tilførtes, med værdien 398 ± 68 ses
det, at denne sidste ligger indenfor standardafvigelsen.
Det samme kan siges om værdierne 56 ± 4 og 56 ± 2 , hvorfor
det ikke kan fastslås, at ekstrakterne har virkninger på
- 20 LDH og kolesterolindhold. Heller ingen af de øvrige
testværdier viser signifikante forskelle.
- Den patologisk-morfologiske observation af leverne af-
slørede, at de grupper, der var fodret med peroxideret
salatolie, havde et antal døde celler, og at antallet af
- 25 døde celler i rotterne fra den gruppe, der er doseret
med makrelekstrakten var nedsat.

T A B E L IV

Virkning af Saba-ekstraktion på peroxidation af salat-
olie.

5

Behandling

(p.o.)

Normal

Kontrol

Saba-ekst.

Saba-ekst.

Dosis

(mg/kg)

200

500

10 Antal

rotter

7

7

7

7

GOT

88±5

93±6

94±2

81±3*

GPT

26±2

39±5

38±3

33±3

ALP

13,2±1,0

19,2±1,8

17,6±1,6

18,3±0,9

15 LDH

252±65

359±58

398±68

316±56

Total

bilirubin

0,3±0

0,3±0

0,3±0

0,3±0

Direkte

bilirubin

0,1±0

0,1±0

0,1±0

0,1±0

20

Cholesterol 40±3

55±3

56±4

56±2

*Signifikant forskellig fra kontrolgruppen: $p < 0,05$

GPT = Alaninaminotransferase

ALP = Alkalisk phosphatase

LDH = Lactatdehydrogenase

25

30

35

T A B E L VVirkning af Saba-ekstrakt på peroxidation af salatolie

5	Behandling				
	(p.o.)	Normal	Kontrol	Saba-ekst.	Saba-ekst.
	Dosis				
	(mg/kg)			200	500
	Antal				
10	rotter	7	7	7	7
	Tri-				
	glycerid	28 $\pm$ 4	26 $\pm$ 6	23 $\pm$ 4	11 $\pm$ 2
	Total				
	protein	6,9 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,1	7,1 $\pm$ 0,1	7,1 $\pm$ 0,1
15	Alb.	3,2 $\pm$ 0	3,1 $\pm$ 0	3,2 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0
	A/G-				
	forhold	0,84 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,02	0,77 $\pm$ 0,02
	F.F.A.	446 $\pm$ 29	578 $\pm$ 45	516 $\pm$ 44	480 $\pm$ 29*
	β -lipo-				
20	protein	78 $\pm$ 5	107 $\pm$ 6	107 $\pm$ 8	108 $\pm$ 4
	HDL	40 $\pm$ 2	33 $\pm$ 2	38 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2
	Peroxi-				
	dation	8,9 $\pm$ 0,4	10,3 $\pm$ 0,6	10,0 $\pm$ 0,3	10,3 $\pm$ 0,8

*Signifikant forskellig fra kontrolgruppen: $p < 0,05$.

- 25 A/G = forholdet mellem indholdet af albumin og globulin
FFA = frie fedtsyrer

Eksempel 6

- 30 Helbredende virkning på rheumatisme og arthritis.

Ved anvendelse af den i eksempel 1 fremstillede makrelekstrakt undersøgtes dens farmaceutiske virkning på Adjuvans Arthritis, der er et modelforsøg for inflammation, herunder rheumatisme og arthritis.

35 Undersøgelsesmetode:

Undersøgelsen udførtes generelt efter Sele-metoden. Ved anvendelse af rotter med hver en legemsvægt på 140 til 160 g injiceredes 0,05 ml blanding af steriliserede kimlegemer af *Mycobakterium butyricum* (DIFCO) i
5 Bayol blandet i et forhold på 10 mg/ml subkutant i højre pote på hver rotte og 0,05 ml af den samme blanding injiceredes subkutant i halen på hver rotte. Hævningsprocenten opnåedes ved at måle rumfanget af det ødem, der fremkom på poten og halen på hver rotte. Resultaterne er
10 vist i fig. 7.

Efter 1 måneds forløb udtoges blodet fra hver rotte fra hjertet og underkastedes hæmologisk undersøgelse. Nedbrydning af knoglerne på begge ben observeredes ved hjælp af røntgenfotografi. Ekstrakten indgaves
15 hver rotte i den undersøgte gruppe en gang om dagen gennem munden. Resultaterne af målingerne er anført i tabellerne VI og VII.

Undersøgelsesresultater:

20

Ved den subkutane injektion fik det højre bagben en primær inflammation med en topinflammation på den 5. dag efter injektionen, og en sekundær inflammation begyndende fra den 15. dag fra injektionen. Den inflammation, der begyndte fra den 15. dag fra injektionen dæmpedes ved tilsætning af 500 mg/kg makrelekstrakt (jvf. fig. 7).

Undersøgelsen af røntgenfotografierne afslørede, at ødemets hævning også dæmpedes.

30

Det fremgår af tabel 6 og 7, at albuminindholdet og indholdet af total protein i blodet er reduceret i grupperne, der har fået indgivet ekstrakten ifølge opfindelsen, i forholdet til kontrolgruppen. Der ses ikke signifikante forskelle for de øvrige værdier.

35

T A B E L VI

Virkning af Saba-ekst. på serum hos rotter					
Behandling	Dosis	Antal	GOT	GPT	ALP
(p.o)	(mg/kg)	rotter			
5 Normal		7	126±7	30±3	23,0±2,5
Kontrol		10	118±6	23±3	23,1±2,8
Saba-ekst.	200	10	117±5	23±2	19,3±1,8
Saba-ekst.	500	10	127±12	29±7	19,5±2,7
10 Phenylbutazon	50	7	118±6	22±2	16,4±0,5

T A B E L VI (fortsat)

Behandling	Dosis	Antal	Urinstof	Cu
(p.o)	(mg/kg)	rotter	N	
15 Normal		7	20±2	152±13
Kontrol		10	25±2	207±11
Saba-ekst.	200	10	22±1	214±10
20 Saba-ekst.	500	10	25±3	217±7
Phenylbutazon	50	7	19±2	193±22

T A B E L VII

Virkning på Saba ekst. på serum hos Adjuvansrotter					
Behandling	Dosis	Antal	Alb.	α ₁ -G	α ₂ -G
(p.o)	(mg/kg)	rotter			
25 Normal		7	2,59±0,2	0,84±0,07	0,39±0,03
Kontrol		10	2,08±0,08	1,37±0,06	0,37±0,06
30 Saba ekst.	200	10	2,07±0,16	1,09±0,06	0,50±0,04
Saba ekst.	500	10	1,85±0,18	1,28±0,10	0,47±0,06
Phenylbutazon	50	7	2,62±0,22	0,94±0,14	0,43±0,04

23

T A B E L VII (fortsat)

	Behandling (p.o)	Dosis (mg/kg)	Antal rotter	β -G	γ -G
5	Normal		7	$0,83 \pm 0,1$	$0,87 \pm 0,1$
	Kontrol		10	$0,88 \pm 0,09$	$1,07 \pm 0,14$
	Saba ekst.	200	10	$0,89 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,09$
	Saba ekst.	500	10	$0,95 \pm 0,05$	$0,79 \pm 0,04$
	Phenylbutazon	50	7	$0,88 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,11$

10

T A B E L VII (fortsat)

	Behandling (p.o)	Dosis (mg/kg)	Antal rotter	T.P	A/G
15	Normal		7	$5,8 \pm 0,2$	$0,85 \pm 0,1$
	Kontrol		10	$5,8 \pm 0,1$	$0,56 \pm 0,03$
	Saba ekst.	200	10	$5,7 \pm 0,2$	$0,61 \pm 0,06$
	Saba ekst.	500	10	$5,4 \pm 0,2$	$0,54 \pm 0,07$
	Phenylbutazon	50	7	$5,8 \pm 0,2$	$0,86 \pm 0,13$

20

p.o. = per oralt

Alb. = albumin

T.P. = total protein.

25

30

35

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af farmakologisk virksomme fiske- og/eller skaldyrsektrakter ved enzymatisk nedbrydning af fiske- og/eller skaldyrsp
5 proteiner ved hjælp af proteinaser ved forhøjet temperatur, adskillelse af de dannede nedbrydningsprodukter fra oliefasen og remanensen og eventuelt efterfølgende koncentrering, k e n d e t e g n e t ved, at man
- 10 a) fuldstændigt inaktiverer de autolyseenzymmer, der findes i fiskene og/eller skaldyrene, ved opvarmning af hele, rå fisk og/eller skaldyr i 10 min. til 1 time ved en temperatur på mindst 75°C,
- 15 b) nedbryder proteinerne indeholdt i fiskene og/eller skaldyrene ved behandling af fiskene og/eller skaldyrene ved en temperatur på 50-60°C og en pH-værdi fra 6,0 til 7,0 med en proteinase fra *Bacillus subtilis* til de foreligger på
20 proteosetrinnet,
- c) fuldstændigt inaktiverer proteinasen, der stammer fra *Bacillus subtilis*, ved at hæve temperaturen til mindst 75°C,
- d) sætter en proteinase dannet af en Koji skimmel-
25 svamp til de således ud fra fiskene og/eller skaldyrene opnåede proteoser og behandler blandingen med proteinasen ved en temperatur på 40-50°C og pH-værdi fra 6,0 til 7,0 i 1-3 timer, indtil proteoserne er nedbrudt til peptidamino-
30 syrer med en molekylvægt, der er væsentligt lavere end 3.000 og frie aminosyrer, og
- e) fuldstændigt inaktiverer proteinasen opnået ud fra Koji-skimmelsvampen ved forhøjelse af temperaturen til mindst 75°C.
- 35 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at temperaturen er mindst 80°C

under trin a).

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at pH-værdien er fra 6,0 til 6,5 i trin b).

5 4. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene 1 til 3, k e n d e t e g n e t ved, at nedbrydningen af fiskene og/eller skaldyrene i trin b) sker i et tidsrum på 1 til 3 timer.

10 5. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene 1 til 4, k e n d e t e g n e t ved, at inaktivering i trin c) udføres ved opvarmning til en temperatur på mindst 80°C i 10 minutter til 1 time.

15 6. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene 1 til 5, k e n d e t e g n e t ved, at fiskene og/eller skaldyrene vælges fra gruppen bestående af hestemakrel, makrel, sardin, makrelgedde, tun, Atka-makrel, torsk, tiarmet blæksplutte, ottearmet blæksprutte, rejer, store rejer, østers, corbicula, kort-
20 halsede muslinger, ferskvandsmuslinger med hård skal, "ark shell"-arter, muslingearter samt blandinger deraf.

Fig. 1



Fig. 2

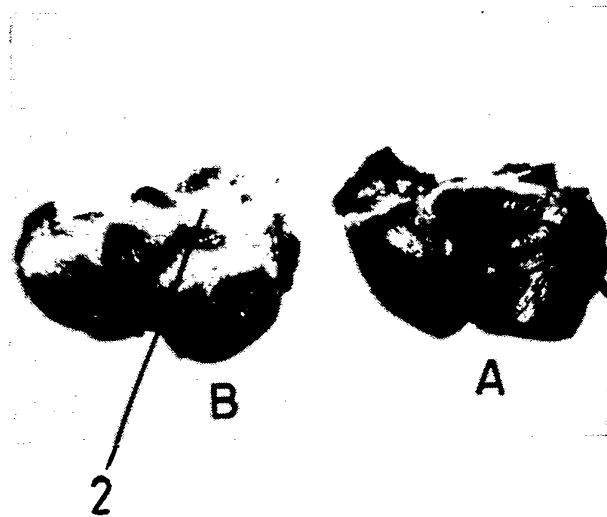


Fig. 3

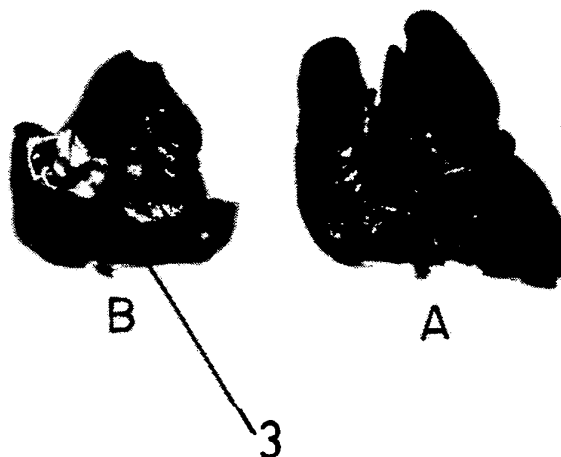


Fig. 4



Fig. 5

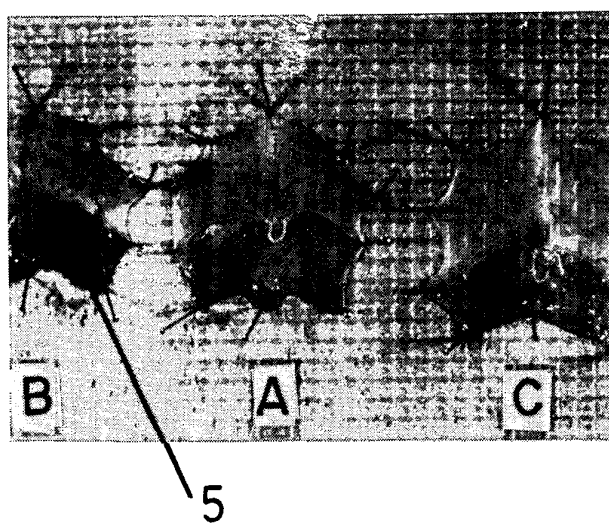


Fig. 6

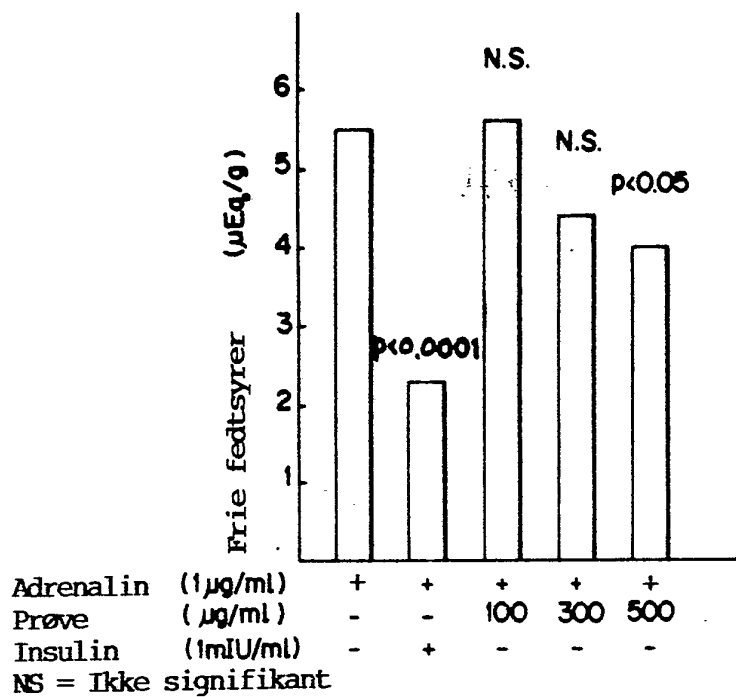


Fig. 7

