

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

293 310

(13) Druh dokumentu:

B6

(51) Int. Cl. : ⁷

C 08 B 37/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2003-1404**
(22) Přihlášeno: **27.04.2001**
(30) Právo přednosti: **23.04.2001 SK 2001/548**
(40) Zveřejněno: **13.08.2003**
(Věstník č: **08/2003**)
(47) Uděleno: **02.02.04**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **17.03.2004**
(Věstník č: **3/2004**)
(86) PCT číslo: **PCT/SK2001/000014**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/085950**

(73) Majitel patentu:

PLEURAN, S. R. O., Bratislava, SK

(72) Původce:

Gabrižová Leona Ing., Bratislava, SK

(74) Zástupce:

**Dušková Hana Ing., Travná 1285, Praha 14 - Kyje,
19800**

(54) Název vynálezu:

**Způsob izolace imunostimulačního glukanu z
hlívy ústříčné**

(57) Anotace:

Způsob izolace imunostimulačního glukanu z plodnic hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*), s výhodou ze tření plodnic defibrací, následným bělením peroxidem vodíku při teplotě 15 až 25 °C po dobu 15 až 25 h v prostředí roztoku hydroxidu sodného a dehydrataci spočívá v tom, že defibrace, která předchází bělení peroxidem vodíku v prostředí roztoku hydroxidu sodného při hustotě nerozpustného glukanu 4 až 5 % hmotn. a dehydrataci se uskutečňuje do 26 hodin po sběru hlívy ústříčné, skladované při teplotě 4 až 8 °C. Defibrace probíhá v prostředí nejméně dvojnásobného množství vodného roztoku uhličitanu sodného nebo draselného s koncentrací 0,05 až 0,15 % hmotn., při pH roztoku 8 až 9, po dobu 1 až 8 min za vzniku reakční suspenze, která se dále bělí peroxidem vodíku v prostředí roztoku hydroxidu sodného s koncentrací 0,05 až 0,09 % hmotn. a získaný nerozpustný glukan se dehydratuje etanolem nebo acetonem a/nebo lyofilizací.

CZ 293310 B6

Způsob izolace imunostimulačního glukanu z hlívy ústříčné

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu izolace imunostimulačního glukanu z hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*), s výhodou z tření plodnice houby defibrací, následným bělením peroxidem vodíku a dehydratací.

Dosavadní stav techniky

Je dostatečně známo, že některé přírodní polysacharidy se vyznačují imunostimulačními a jinými farmakologickými vlastnostmi. Jsou to zpravidla ty polysacharidy, které mají v hlavním polysacharidovém řetězci přísně β -(1,3)-D-glykosidickou vazbu, která je hlavním nositelem jejich imunostimulační aktivity.

Imunostimulační polysacharidy se vyskytují v buněčných stěnách bakterií, kvasinek a mnohých hub, hlavně rodu *Basidiomycetes* /Di LUZIO, N.R., CHIHARA, G.: Adv. Immunopharmacol. 1, 477 (1981); JACQUES, P.J.: Immunomodulator polysacharides, str. 429-438 v Current concept in human immunology and cancer immunomodulation; Eds. SCRIRON, B. et al.: Elsevier Biomed. Press B.V. (1982); CHIHARA, G.: EOS riv. Immunol. Immunofarm.4, 85 (1984).

Imunofarmakologicky aktivní látky, tj. také β -(1,3)-D-glukany působící na základní obranné systémy hostitele, mohou pozitivně ovlivnit počet, funkční aktivitu a interakce makrofágů T a B lymfocytů, NK buněk, jakož i jejich humorální a sekreční komponenty. Mohou tedy nespecificky modifikovat rozsáhlý soubor bakteriálních, houbových, parazitních a virových infekcí. Mechanismus působení glukanu se tedy výrazně liší od mechanismu působení chemoterapeutik a antibiotik (TRNOVEC a spol.: Farm. obzor 56, 271 (1987); OSTAD, E., SELJELICH, R.: Acta path. Microbiol. Scand. 88, 97 (1980); LEHNBORG, G., HEDSTRÖM, K.G., C.E.: J. Reticuloendothel. Soc. 32, 347 (1987)).

Rovněž tak i další práce potvrzují, že imunostimulační glukany jsou látky, které si zasluhují mimořádnou pozornost při léčbě a prevenci mnohých onemocnění. Tak například je ověřeno, že imunoglukany zvyšují imunitu proti různým bakteriálním a virovým onemocněním, mají protirakovinný účinek, potencují účinek při radioterapii onkologických pacientů (KOMASU, N. a spol.: US pat. 3 943 247 (1976), MIYACHI, M. a spol.: Ger. Offen 3, 032636 (1981), PATCHEM, M.: Surv. Immunol. Re. 2, 237 (1983), POSPÍŠIL a spol.: Experientia 38, 1232 (1982).

V současnosti se v průmyslovém měřítku vyrábějí β -(1,3)-D-glukany hlavně z kvasinek a některých hub rodu *Basidiomycetes*.

Hlavními nedostatky glukanu z kvasnic je poměrně náročná technologie, nízký výtěžek glukanu (kolem 5 % na sušinu kvasnic) a vysoké nároky na eliminaci odpadních alkalických roztoků. Výhodou fungálních glukanu je především technologická jednoduchost a kolem 30 až 50% výtěžek glukanu na sušinu vstupní suroviny.

V současné době jsou známy dva způsoby izolace glukanu z hlívy ústříčné, a to buď studenou, nebo horkou extrakcí plodnic (KUNIAK, L. a spol.: patent CS 274 918 a patent CS 276 192), při kterých lze dosáhnout až 50% výtěžek imunostimulačního glukanu na sušinu hlívy ústříčné.

Při způsobu podle patentu CS 274 918, při kterém se použije v prvním stupni k extrakci neglukonových složek hydroxid sodný s koncentrací 0,1 až 0,2 M/l, se po dobu extrakce rozpouští rovněž i část vodorozpustného glukanu v množství 10 až 15 % na sušinu vstupní suroviny.

Podrobnějším studiem chemických změn proteinové části hlívy ústříčné, které probíhají při teplotě 95 až 100 °C s 0,1 až 0,2 M roztokem NaOH, se zjistilo, že část proteinů se denaturuje a stává se nerozpustnou, tj., zvyšuje se obsah dusíku ve finálním glukanu a část se alkalickou hydrolýzou transformuje na oligopeptidy, respektive na aminokyseliny, za tvorby tmavých kondenzačních produktů, které se sorbují na glukanu a snižují bělost hotového nerozpustného glukanu.

Cílem předkládaného vynálezu je zvýšit výtěžek nerozpustného glukanu a jeho bělost při minimální tvorbě odpadních alkalických roztoků.

Podstata vynálezu

Tento cíl do značné míry řeší způsob izolace imunostimulačního glukanu z hlívy ústříčné, s výhodou z tření plodnice, defibrací, následným bělením peroxidem vodíku při teplotě 15 až 25 °C po dobu 15 až 24 hodin, v prostředí hydroxidu sodného a dehydratací, jehož podstata spočívá v tom, že defibrace, která předchází bělení peroxidem vodíku v prostředí roztoku hydroxidu sodného, se uskutečňuje do 26 hodin po sběru hlívy ústříčné.

Důkladnějším studiem glukanového podílu hlívy ústříčné bylo zjištěno, že tento se skládá ze dvou částí, jedna část je vodorozpustná a představuje oligopeptidy respektive aminokyseliny, a druhá část je ve vodě nerozpustná a je tvořena denaturovanými proteiny, to znamená, že obsahuje zvýšený obsah dusíku. Poměr vodorozpustného glukanu k nerozpustnému glukanu je asi 1:2. Tento poměr však platí v době, kdy se plodnice oddělí od substrátu, to je v době bezprostředně po sběru. Je-li však hlíva ústříčná po sběru skladována, tak dochází k autolýze glukanu přítomným enzymem β -(1,3)-D-glukanázou. Aby se zpomalila autolýza glukanu, je zapotřebí defibraci hlívy ústříčné uskutečnit nejdéle do 26 hodin po jejím sběru.

Rovněž tak bylo zjištěno, že hydrolyza glukanu se značně zvyšuje při vyšší teplotě. Je-li teplota skladování kolem 20 °C a vyšší, potom je rozsah hydrolyzy úměrný teplotě a délce skladování. Při autolýze stoupá vodorozpustný podíl glukanu na úkor vodonerozpustného podílu. Bylo zjištěno, že je nevyhnutelné hlívu ústříčnou skladovat při teplotě 4 až 8 °C.

Defibrace se uskutečňuje v prostředí nejméně dvojnásobného množství vodního roztoku uhličitanu sodného anebo draselného s koncentrací 0,05 až 0,15 % hmotn. Defibrace probíhá při pH roztoku 8 až 9 po dobu 1 až 8 min. za vzniku reakční suspenze. Defibrace vykonávaná v takovémto krátkém časovém úseku 1 až 8 min. způsobí maximální eliminaci enzymové aktivity přítomné β -(1,3)-D-glukanázy. Potom se suspenze filtruje a dokonale promyje vodou, čímž dochází k odstranění vodorozpustných složek. Dále se reakční suspenze bělí peroxidem vodíku v přítomnosti hydroxidu sodného nebo draselného při koncentraci nerozpustného glukanu 4 až 5 % hmotn. Dehydratace se uskutečňuje etanolem, acetonem nebo lyofilizací.

Bylo zjištěno, že je výhodné defibraci realizovat po dobu 5 min.

Dále bylo zjištěno, že se při filtraci odstraňují vodorozpustné složky, jako jsou například proteiny, popeloviny, enzymy, sacharidy a jiné.

Kromě doposud používaných dehydratačních činidel, jako je etanol a aceton, bylo zjištěno, že je výhodné uskutečňovat dehydrataci lyofilizací. Při takto zvolené dehydrataci se získává glukan o čistotě 94 %. Glukan s touto čistotou je vhodný pro přípravu vakcín.

Hlavní výhodou způsobu podle vynálezu je, že umožňuje získat o 15 až 20 % vyšší výtěžek na sušinu výchozí suroviny. Další výhodou je o 20 až 30 % vyšší bělost získaného glukanu oproti dosud známým způsobům. Nezanedbatelnou výhodou je ekologická výhoda tohoto způsobu, při kterém se dosáhne maximálního snížení nákladů na čištění odpadních vod. Podle vynálezu se obsah organických látek v pracích odpadních vodách sníží o 30 % a obsah vodorozpustného glukanu o 15 až 20 %.

Příklady provedení vynálezu40 Příklad 1

V průmyslovém mixéru se defibruje 5 h po sběru 20 kg tření plodnic hlívy ústříčné v prostředí vodního roztoku uhličitanu sodného, který sestává z pitné vody v množství 40 l a uhličitanu sodného v množství 60 g. Defibrace probíhá v mixéru po dobu 3 min. za vzniku zhomogenizované suspenze.

Přítomný uhličitán sodný zabezpečuje pH prostředí 8, při kterém se eliminuje enzymová aktivita přítomné β -(1,3)-D-glukanázy a současně se zabráňuje dalšímu rozpouštění vodonerozpustného glukanu. Po defibraci se reakční suspenze přefiltruje přes textilní filtr a dokonale se promyje pitnou vodou při odstranění všech vodorozpustných látek, jako jsou proteiny, popeloviny, enzymy, sacharidy, jakož i vodorozpustný glukan. Takto získaný nerozpustný podíl glukanu se nechá dobře odtéci od kapalné fáze, vloží se do reaktoru o obsahu 50 l a zalije se 200 ml vody, do které

- se přidá 80 g NaOH. Po dokonalém promíchání se k reakční směsi za nepřetržitého míchání přidají po částech 2 l 30% peroxidu vodíku a reakční směs se nechá staticky bělit 18 h. Po vybělení se získaný glukán promývá pitnou vodou až do zmizení červeného zabarvení fenolftaleinového indikátoru na červenou. K filtračnímu koláči se přidá 5 l pitné vody okyselené 20 ml kyseliny octové a po promíchání se filtrační koláč opět promyje 10 l pitné vody. Mokřý glukán se lisuje v hydraulickém lisu a odlisovaný koláč se v reaktoru zalije 20 l koncentrovaného etanolu, nechá se 1 h odstát, potom se suspenze přemístí do lisu s textilní vložkou a po odtěžení se vylisuje. Dehydratace s etanolem se opakuje ještě dvakrát a poté se získaný glukán vysuší při teplotě 60 °C. Vysušený glukán se dále mele v suchém mlýně a proseje se přes síto s velikostí ok 0,5 mm.
- 10 Výsledný glukán s výtěžkem 70 % na hmotnost sušiny tření plodnice hlívy ústříčné je nerozpustný ve vodě, ve zředěných kyselinách, jakož i v organických rozpouštědlech a obsahuje 0,6 % chitinového dusíku, 1,5 % popele a má velikost částic 0,5 mm.

Příklad 2

- Postupuje se jako v příkladě 1 s tím rozdílem, že se na bělení použije 1,5 l peroxidu vodíku o koncentraci 30 % hmotn. a bělení probíhá po dobu 24 h při teplotě 23 °C.
- 15 Výtěžek a kvalitativní parametry glukánu jsou srovnatelné s kvalitativními parametry glukánu v příkladě 1.

Příklad 3

- Postupuje se jako v příkladě 2 s tím rozdílem, že dehydratace mokrého glukánu se uskutečňuje lyofilizací, přičemž se získá velmi jemný práškový glukán vhodný na přípravu vakcín ve veterinární medicíně.
- 20

Příklad 4

- Postupuje se jako v příkladě 3 s tím rozdílem, že při mixování čerstvé hlívy se použije místo uhličitanu sodného 80 g uhličitanu draselného.
- 25 Výtěžek a kvalitativní parametry glukánu jsou srovnatelné s kvalitativními parametry glukánu v příkladě 1.

Průmyslová využitelnost

- Glukán izolovaný způsobem podle vynálezu lze využít jako imunostimulační potravinový doplněk proti různým bakteriálním a virovým onemocněním, respektive s vysokým radioprotektivním účinkem při radioterapii onkologických pacientů.
- 30

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob izolace imunostimulačního glukánu z hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*), s výhodou z tření plodnice defibrací, následným bělením peroxidem vodíku při teplotě 15 až 25 °C po dobu 15 až 24 h v prostředí roztoku hydroxidu sodného a dehydratací, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že defibrace, která předchází bělení peroxidem vodíku v prostředí roztoku hydroxidu sodného při koncentraci nerozpustného glukánu 4 až 5 % hmotn. a dehydrataci, se uskutečňuje do 26 hodin po sběru hlívy ústříčné, skladované při teplotě 4 až 8 °C v prostředí nejméně dvojnásobného množství vodného roztoku uhličitanu sodného nebo draselného s koncentrací 0,05 až 0,15 % hmotn., při pH roztoku 8 až 9, po dobu 1 až 8 min. za vzniku reakční suspenze s eliminovanou enzymovou aktivitou přítomné β -(1,3)-D-glukanázy při odstranění vodorozpustných složek z reakční suspenze filtrací a dokonalým promytím vodou.
- 35
2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že bělení peroxidem vodíku probíhá v prostředí roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,05 až 0,09 % hmotn.
- 40

3. Způsob podle nároků 1 a 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že defibrace se s výhodou uskutečňuje po dobu 5 min.
4. Způsob podle nároků 1 až 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je výhodné defibraci uskutečnit do 24 h po sběru hlívy ústřičné.
- 5 5. Způsob podle nároků 1 až 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je výhodné defibraci uskutečnit u hlívy ústřičné skladované při teplotě 5 °C.
6. Způsob podle nároků 1 až 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dehydratace se uskutečňuje etanolem, acetonem nebo lyofilizací.
- 10 7. Způsob podle nároků 1 až 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se ze suspenze filtrací odstraní vodorozpustné složky, jako jsou proteiny, popeloviny, enzymy, sacharidy, vodorozpustný glukán.

Konec dokumentu
