

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **227382**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **406889**

(51) Int.Cl.
A61K 31/726 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61K 35/32 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **20.01.2014**

(54) **Sposób otrzymywania bioaktywnego preparatu zawierającego glikozaminoglikany i żelatynę**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
10.11.2014 BUP 23/14

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.11.2017 WUP 11/17

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODniczy
WE WROcŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANNA PUDŁO, Gubin, PL
WIESŁAW KOPEĆ, Wrocław, PL
DOROTA CHORAŻYK, Nowe Żabno, PL
TERESA SKIBA, Wrocław, PL
REMIGIUSZ ZAPOLSKI, Wałbrzych, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Olszewska

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania bioaktywnego preparatu zawierającego glikozaminoglikany i żelatynę z tkanki chrzęstnej drobiu.

Wynalazek może znaleźć zastosowanie do wytwarzania składników suplementów diety, wspomagających funkcjonowanie układu kostno-stawowego ludzi i zwierząt.

Glikozaminoglikany (GAG) są to liniowe, nierozgałęzione heteropolisacharydy, zbudowane z powtarzających się disacharydowych jednostek (heksosaminy i kwasu heksuronowego lub galaktozy) [Nadkarni V.D., Toida T., Van Gorp C.L., Schubert R.L., Weiler J.M., Hansen K.P., Caldwell E.E.O., Linhardt R.J. 1996. Preparation and biological activity of N-sulfonated chondroitin and dermatan sulfate derivatives. *Carbohydrate Research* 290, 87–96.]. GAG dzielą się na następujące grupy: heparynowe (siarczany heparanu, heparyna), keratynowe (siarczany keratanu), chondroityno-dermatanowe (siarczany dermatanu, chondroityno-4-siarczany, chondroityno-6-siarczany, chondroityna), kwas hialuronowy [Sadowska M., Łagocka J. 1997. Mukopolisacharydy – właściwości fizykochemiczne, izolacja i wykorzystanie. *Żywność. Technologia. Jakość* 2, 23–39.].

Siarczany chondroityny (CS), obok kolagenu typu II, są ważnym składnikiem strukturalnym tkanki chrzęstnej. CS należą do grupy glikozaminoglikanów, które znajdują się na powierzchni chondrocytów i w macierzy zewnątrzkomórkowej chrząstki [Wang L., Shen S., Lu S. 2003. Synthesis and characterization of chondroitin sulfate-methacrylate Hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 52, 389–396]. Glikozaminoglikany w połączeniu z rdzeniem białkowym tworzą proteoglikany (PG). Najważniejszym PG chrząstki jest agrekan (zbudowany z łańcuchów siarczanu chondroityny oraz siarczanu keratanu). GAG stosuje się głównie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, do produkcji różnego rodzaju suplementów diety, w postaci preparatów z hydrolizatami enzymatycznymi kolagenu lub w formie oczyszczonej. W kosmetyce GAG stosuje się m.in. jako środek aktywujący procesy fizjologiczne i regulacyjne komórek skóry oraz do rekonstrukcji tkanki łącznej (Lauder R.M. 2009. Chondroitin sulfate: A complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. *Complementary Therapies in Medicine* 17, 56–62).

W wielu badaniach klinicznych wykazano efekt terapeutyczny CS podawanych doustnie pacjentom z zapaleniem kości. Obserwowano między innymi poprawę funkcjonowania stawów oraz zmniejszenie bólu (Wang L., Shen S., Lu S. 2003. Synthesis and characterization of chondroitin sulfate-methacrylate hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 52, 389–396). W wielu preparatach wpływających na stan stawów i kości, stosuje się ekstrakty lub hydrolizaty zawierające zarówno GAG oraz pochodne kolagenu II, w tym również żelatynę, tj. oba główne składniki bioaktywne uzyskane z chrząstek zwierząt.

Chrząstka drobiowa należy do surowców odpadowych, bogatych w tkankę łączną. Charakteryzuje się niską zawartością związków mineralnych, tj. 0,9%, tj. zasadniczo mniej niż w chrząstkach ryb, gadów oraz ssaków wykorzystywanych do produkcji preparatów GAG i żelatyny kolagenu typu II.

Kolagen typu II różni się zasadniczo, w tym strukturalnie, od innych rodzajów kolagenu (typ I i III) dominujących w skórze czy kościach, w zakresie właściwości oraz funkcji pełnionych w tych tkankach. Kolagen typu II jest białkiem bardzo trudno rozpuszczalnym ze względu na tworzenie nierozpuszczalnych związków kompleksowych, na skutek oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowaną jego cząstką a kwaśnymi proteoglikanami, będącymi nośnikami ładunku ujemnego.

Znana jest metoda izolacji glikozaminoglikanów wg Garnjanagoonchorn i in. (Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. *Chemical Engineering and Processing* 2007, 46, 465–471). Metoda ta obejmuje izolację enzymatyczno-termiczną GAG z chrząstki rekina, przy użyciu stosunkowo dużej ilości enzymu papainy, tj. 4 mg/g surowca.

Znana jest również metoda ekstrakcji glikozaminoglikanów przy użyciu 3 M chlorowodoru guanidyny i 3 M chlorku magnezu wg Luo i in. (Chicken keel cartilage as a source of chondroitin sulfate. *Poultry Science*, 2002, 1086–1089). Zaproponowana metoda pozwala na uzyskanie GAG wysokiej czystości, lecz w przypadku stosowania produktu jako środka spożywczego, wymagane jest całkowite usunięcie soli z preparatów, co negatywnie wpływa na wydajność procesu i powoduje wzrost kosztów produkcji.

Znane jest rozwiązanie według patentu nr US 4,350,682, w którym ujawniono sposób wytwarzania produktu aktywnego z chrząstki, przez ogrzewanie mieszaniny surowej tkanki ssaków, ryb lub gadów w wodzie pod ciśnieniem, w celu wytworzenia wodnego ekstraktu chrząstki, usuwając zawieszone cząstki z ekstraktu i zatężając ekstrakt pod zmniejszonym ciśnieniem.

W świetle powyższego należy poszukiwać metod uproszczonych w stosunku do procedur cytowanych wyżej, jak również eliminujących zastosowanie w procesie technologicznym substancji niedopuszczonych do stosowania w przemyśle spożywczym.

Dzięki temu, że chrząstka drobiowa zawiera niski poziom niepożądanych soli mineralnych, możliwe jest otrzymywanie z niej bioaktywnych substancji, które bez dodatkowego oczyszczania, mogą być wykorzystane do produkcji preparatów wspomagających funkcjonowanie układu kostno-stawowego ludzi i zwierząt.

Istotą wynalazku jest to, że surową, oczyszczoną i rozdrobnioną tkankę chrząstki drobiowej, poddaje się ekstrakcji w wodzie o temperaturze od 60°C do 90°C, w czasie od 4 do 48 godzin, przy stosunku wagowym chrząstki do wody w zakresie od 1:4 do 1:10. Prowadzi to do uwolnienia do roztworu żelatyny powstałej w wyniku denaturacji kolagenu typu II oraz glikozaminoglikanów. Otrzymuje się ekstrakt, z którego oddziela się nierozpuszczoną tkankę łączną, natomiast pozostałość utrwała się do formy preparatu, dowolną metodą.

Korzystnie jest, gdy chrząstkę drobiową rozdrabnia się do wielkości cząstek nie większych niż 4 mm.

Korzystnie również jest, gdy ekstrakcję prowadzi się przy zastosowaniu wody destylowanej.

Korzystnie także jest, gdy ekstrakcję prowadzi się przy stosunku wagowym chrząstki drobiowej do wody 1:8.

Korzystnie również jest, gdy oczyszczony ekstrakt utrwała się metodą liofilizacji.

Zaletą wynalazku jest to, że pozwala na jednoczesne otrzymywanie glikozaminoglikanów i żelatyny kolagenu typu II, w sposób prosty i tani, bez użycia substancji niedozwolonych w przemyśle spożywczym. Dodatkową zaletą metody jest wykorzystanie surowca będącego produktem odpadowym przemysłu drobiarskiego, jakim jest chrząstka kostna. Surowiec ten zawiera niski poziom soli mineralnych, dzięki czemu nie ma konieczności usuwania ich na etapie procesu.

Sposób równoległego uzyskania kolagenu typu II w formie żelatyny oraz GAG przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

P r z y k ł a d 1: Chrząstkę grzebienia mostka kurcząt oczyszcza się mechanicznie z białek mięśniowych. Surowiec rozdrabnia się na młynie o średnicy oczek 4 mm.

Do próbki odważa się 1,0 g oczyszczonej i rozdrobnionej chrząstki grzebienia mostka kurcząt i dodaje wody destylowanej w stosunku wagowym 1:8 (w/w). Jednocześnie ekstrakcję glikozaminoglikanów i kolagenu typu II w formie żelatyny prowadzi się w łaźni wodnej o temperaturze 80°C przez 48 godzin. Po zakończonej ekstrakcji, hydrolizaty wiruje się (23 000 x g, 20 min) w celu usunięcia pozostałości nierozpuszczonej tkanki łącznej. Supernatanty zawierające glikozaminoglikany (siarczan chondroityny, siarczan keratanu) i żelatyny poddaje się liofilizacji. Ogólną ilość wyizolowanych glikozaminoglikanów wyraża się jako procentowy odzysk siarczanów chondroityny z surowca. Natomiast ogólną ilość wyizolowanego kolagenu (żelatyny) wyznacza się na podstawie hydroksyproliny, z uwzględnieniem odpowiedniego współczynnika.

Po ekstrakcji w czasie 48 godzin w temperaturze 80°C, odzysk GAG wyniósł 98%, natomiast żelatyny 66%.

P r z y k ł a d 2: Chrząstkę grzebienia mostka kurcząt oczyszcza się mechanicznie z białek mięśniowych. Surowiec rozdrabnia się na młynie o średnicy oczek 4 mm.

Do kolby stożkowej o pojemności 250 cm³ odważa się 10,0 g oczyszczonej i rozdrobnionej chrząstki grzebienia mostka kurcząt i dodaje wody destylowanej w stosunku wagowym 1:8 (w/w). Ekstrakcję prowadzi się w łaźni wodnej o temperaturze 90°C przez 32 godziny. Dalej postępuje się jak w przykładzie 1.

Po ekstrakcji w czasie 32 godzin w temperaturze 90°C, odzysk GAG wyniósł 83%, natomiast żelatyny 100%.

P r z y k ł a d 3: Chrząstkę grzebienia mostka kurcząt oczyszcza się mechanicznie z białek mięśniowych. Surowiec rozdrabnia się na młynie o średnicy oczek 4 mm.

Do kolby stożkowej o pojemności 100 cm³ odważa się 4,0 g oczyszczonej i rozdrobnionej chrząstki grzebienia mostka kurcząt i dodaje wody destylowanej w stosunku wagowym 1:8 (w/w). Izolację składników tkanki chrzęstnej (glikozaminoglikanów i kolagenu) prowadzi się w łaźni wodnej o temperaturze 60°C przez 16 godzin. Dalej postępuje się jak w przykładzie 1.

Po ekstrakcji w czasie 32 godzin w temperaturze 60°C, odzysk GAG wyniósł 55%, natomiast żelatyny 10%.

P r z y k ł a d 4: Oczyszczoną chrząstkę grzebienia mostka kurcząt rozdrabnia się na młynie o średnicy oczek 4 mm.

Do kolby stożkowej o pojemności 500 cm³ odważa się 150,0 g materiału badawczego i dodaje wody wodociągowej w stosunku wagowym 1:4 (w/w). Równoległą ekstrakcją GAG i kolagenu (w formie żelatyny) prowadzi się w łaźni wodnej o temperaturze 70°C przez 16 godzin. Dalej postępuje się jak w przykładzie 1.

Po ekstrakcji, odzysk GAG wyniósł 65%, natomiast żelatyny 22%.

P r z y k ł a d 5. Chrząstkę drobiową oczyszcza się mechanicznie z białek mięśniowych, następnie rozdrabnia na młynie o średnicy oczek w siatce 4 mm.

Do próbki o pojemności 20 cm³ odważa się 0,5 g chrząstki kurcząt dodaje wody demineralizowanej w stosunku wagowym 1:10 (w/w).

Izolację prowadzi się w łaźni wodnej o temperaturze 90°C przez 4 godziny. Dalej postępuje się jak w przykładzie 1.

Po ekstrakcji odzysk GAG wyniósł 55%, natomiast żelatyny 35%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania bioaktywnego preparatu zawierającego glikozaminoglikany oraz żelatynę, **znamienny tym**, że surową, oczyszczoną i rozdrobnioną tkankę chrząstki drobiowej, poddaje się ekstrakcji w wodzie o temperaturze od 60°C do 90°C, w czasie od 4 do 48 godzin, przy stosunku wagowym chrząstki do wody w zakresie od 1:4 do 1:10, w wyniku czego otrzymuje się ekstrakt zawierający glikozaminoglikany i żelatynę kolagenu typu II, przy czym z ekstraktu oddziela się nierozpuszczoną tkankę łączną, natomiast pozostałość utrwała się do formy preparatu, dowolną metodą.
2. Sposób według, zastrz. 1, **znamienny tym**, chrząstkę drobiową rozdrabnia się do wielkości cząstek nie większych niż 4 mm.
3. Sposób według, zastrz. 1, **znamienny tym**, że ekstrakcję prowadzi się przy zastosowaniu wody destylowanej.
4. Sposób według, zastrz. 1, **znamienny tym**, że ekstrakcję prowadzi się przy stosunku wagowym chrząstki drobiowej do wody 1:8.
5. Sposób według, zastrz. 1, **znamienny tym**, że oczyszczony ekstrakt utrwała się metodą liofilizacji.