

Sposób ekstrakcji bioaktywnych składników tkanki chrzęstnej, zwłaszcza drobiowej

Przedmiotem wynalazku jest sposób ekstrakcji bioaktywnych składników tkanki chrzęstnej.

Tkanka chrzęstna zbudowana jest z białek kolagenowych, proteoglikanów oraz elementów peptydowych wiążących polimery węglowodanów w struktury wyższego rzędu. Włókna kolagenowe w chrząstce są tworzone przez tzw. heteropolimery II:IX:XI (Eyre D. 2002. Collagen of articular cartilage. Arthritis Research, 4: 30 – 35), które oprócz kolagenu typu II zawierają także typ IX i XI (Temenoff J.S., Mikos A.G. 2000. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. Biomaterials, 21, 431 – 440). W chrząstce młodych ptaków proporcje poszczególnych białek kolagenowych są następujące: typ II stanowi ok. 80%, natomiast IX i XI po ok. 10%. W chrząstce dorosłego ptaka udział kolagenu typu II zwiększa się do poziomu $\geq 90\%$, z kolei typ IX stanowi ok. 1% a XI ok. 3% [Eyre D. 2002. Collagen of articular cartilage. Arthritis Research, 4: 30 – 35].

Głównym składnikiem proteoglikanów są polisacharydy (95%) określane wspólnym mianem glikozaminoglikanów (GAG). Podstawową jednostką polimerów są cząsteczki disacharydowe składające się z jednego aminocukru i jednej cząsteczki heksozy. W chrząstce znajdują się następujące GAG: kwas hialuronowy (HA), siarczan chondroityny (CS), siarczan keratanu (KS), siarczan dermatanu (DS) i siarczan heparanu (HS) (Gandhi N. S., Mancera R. L. 2008. The structure of

glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical Biology and Drug Design*, 72: 455 – 482). W zależności od rodzaju aminocukru GAG dzieli się na galaktozaminoglikany (siarczan chondroityny i siarczan dermatanu) lub glukozaminoglikany (heparyny i siarczany heparanu, zawierające glukozaminę). W proteoglikanach występują dwa typy glikozaminoglikanów – siarczan chondroityny i siarczan keratanu (Mikami T., Kitagawa H. 2013. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830: 4719 – 4733). Proteoglikany, które ulegają agregacji przyłączane są do kwasu hialuronowego (HA). Duży kompleks powstaje w momencie jednoczesnego przyłączenia się wielu monomerów PG do pojedynczej nici HA. Przykładami agregatów PG i HA są agrekan i wersikan (Culav E. M., Clark C. H., Merrilees M. J. 1999. *Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. Physical Therapy*, 79: 308 – 319). W strukturze agrekanu dominuje siarczan chondroityny tworząc wielkie cząsteczki o masie ok. $1 - 3 \times 10^6$ Da (Muir H. 1978. Proteoglycans of cartilage. *Journal of Clinical Pathology*, 31: 67 – 81).

Spośród preparatów wytwarzanych ze składników chrząstki, najbardziej rozpowszechnione są produkty, które zawierają siarczan chondroityny. CS stosuje się głównie jako suplement diety oraz produkt biomedyczny (m.in. w postaci kapsułek lub tabletek, kropli do oczu) lub biomateriał do odtwarzania tkanek. Jest on także dodatkiem do żywności i napojów oraz składnikiem kosmetyków (Vázquez J. A., Rodríguez - Amado I., Montemayor M. I., Fraguas J., del Pilar González M., Murado M. A. 2013. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: characteristics, applications and eco-friendly processes: a review. *Marine Drugs*, 11: 747 – 774). Kolagen ze względu na swoje właściwości biologiczne i funkcjonalne, doskonałą biokompatybilność i biodegradowalność, jak również niską immunogenność jest szeroko stosowany w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym i medycynie do produkcji materiałów

biomedycznych (Lin Y. C., Tan F., Marra K. G., Jan S. S., Liu D. C. 2009. Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 5: 2591 – 2600; Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F. 2010. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*, 3: 1863 - 1887; Veeruraj A., Arumugam M., Balasubramanian T. 2013. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry*, 48: 1592 – 1602; Veeruraj A., Arumugam M., Ajithkumar T., Balasubramanian T. 2015. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). *Food Hydrocolloids*, 43: 708 – 716].

Z opisu wynalazku P.406889 znana jest metoda wykorzystująca obróbkę termiczną powyżej temperatury denaturacji kolagenu typu II prowadzącej do powstania żelatyny i do przeprowadzenia hydrolizy chrząstki.

Z opisu patentowego CN 103804518 A znana jest metoda rozkładu enzymatycznego w temperaturze powyżej typowej temperatury pokojowej, ale poniżej temperatury denaturacji kolagenu, łącząca obróbkę alkaliczną z działaniem enzymów trzustkowych (trypsyny).

Z opisu wynalazku CN102321193A1 znana jest również metoda łączona ekstrakcji chrząstki, polegająca na jednoczesnym zastosowaniu mikrofal z ultradźwiękami.

W opisie wynalazku CN101696246A podano metodę pozyskania siarczanu chondroityny z chrząstki przy użyciu enzymu pankreatyny w środowisku alkalicznym pH 8-9, prowadzone w 45°C (tj. w temperaturze poniżej denaturacji kolagenu) i wspomagane działaniem ultradźwięków przez 4 – 5 godzin.

Wszystkie te metody przyspieszają proces ekstrakcji składników z chrząstki ale nie są wykonywane jednocześnie, co powoduje, że nadal są długotrwałe, kosztowne i mało efektywne.

Nieoczekiwanie okazało się, że zastosowanie ultradźwięków powodujących równocześnie ogrzewanie tkanki chrzęstnej powyżej temperatury denaturacji kolagenu, połączone z działaniem enzymu papainy, pozwala na równoległą ekstrakcję bioaktywnych składników, tj. żelatyny, będącej produktem denaturacji kolagenu typu II i glikozaminoglikanów.

Istotą wynalazku jest ekstrakcja składników bioaktywnych glikozaminoglikanów i żelatyny z tkanki chrzęstnej, zwłaszcza drobiu, w wyniku zastosowania metody enzymatyczno-termicznej prowadzonej w roztworach wodnych, korzystnie buforowanych, w temperaturze od 50°C do 70°C. Do roztworu na dowolnym etapie dodaje się enzymu papainy w ilości powyżej 0,01 mg/g surowca, przy stosunku wagowym rozdrobnionej chrząstki do roztworu w zakresie od 1:2 do 1:10. Całość poddaje się działaniu ultradźwięków, które jednocześnie są źródłem ciepła dostarczanego do roztworu. Następuje podgrzewanie układu do odpowiedniej temperatury przy użyciu ultradźwięków, zintegrowane z jednoczesnym destrukcyjnym ich działaniem na strukturę tkanki połączone z działaniem enzymu papainy w temperaturach bliskich optimum. Po zakończeniu ekstrakcji składników bioaktywnych oddziela się tkankę łączną, natomiast preparat utrwala się dowolną metodą termiczną.

Korzystnie jest, gdy ekstrakcję prowadzi się przy zastosowaniu buforu fosforanowego.

Korzystnie także jest, gdy proces prowadzi się z użyciem chrząstki rozdrobnionej do wielkości nie więcej niż 4 mm.

Korzystnie także jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze 65°C.

Korzystnie również jest, gdy proces prowadzi się przez czas co najmniej 20 min.

Korzystnie jest, gdy do utrwalenia wyekstrahowanych glikozaminoglikanów i żelatyny stosuje się liofilizację.

Korzystnie także jest, gdy do utrwalenia wyekstrahowanych glikozaminoglikanów i żelatyny stosuje się suszenie rozpyłowe.

Zaletą wynalazku jest to, że jest to prosta i szybka metoda równoległej ekstrakcji bioaktywnych składników tkanki chrzęstnej tj. żelatyny i glikozaminoglikanów z chrząstki z wykorzystaniem ultradźwięków, powodujących równocześnie ogrzewanie materiału, połączone z działaniem enzymu papainy, umożliwiającą prowadzenie procesu ciągłego.

Sposób ekstrakcji bioaktywnych składników tkanki chrzęstnej z użyciem skojarzonego działania ultradźwięków i enzymu papainy przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

Przykład 1.

Oczyszczoną z białek mięśniowych chrząstkę grzebienia mostka kurczątkę rozdrabnia się przy użyciu młyna o średnicy oczek siatki 2,00 mm. Do szklanej zlewki o pojemności 100 cm³ odważa się 5,00 g rozdrobnionego surowca, dodaje się enzym papainę w ilości 1 mg/g surowca oraz roztwór buforu fosforanowego o pH 7,0 w stosunku wagowym do surowca jak 1:8 (w/w). Ekstrakcję prowadzi się w naczyniu z wodą wyposażonym w generator ultradźwięków, częstotliwość ultradźwięków wynosi 37 kHz a moc generatora 150 W. Proces ekstrakcji trwa przez 60 min w temperaturze 60°C, temperatura jest utrzymywana dzięki działaniu ultradźwięków. W celu utrzymywania małych wahań temperatury stosuje się wężownicę z termostatem. Po zakończonym procesie, w celu inaktywacji enzymu, uzyskane hydrolizaty podgrzewa się do temperatury 100°C i przetrzymuje się je w tych warunkach przez 5 min. Aby usunąć pozostałości tkanki łącznej po zakończonej ekstrakcji hydrolizaty wiruje się przy 23 000 x g, w ciągu 15 min. Następnie roztwory

zawierające glikozaminoglikany (kwas hialuronowy, siarczan-4-chondroityny, siarczan-6-chondroityny, siarczan keratanu) oraz żelatynę poddaje się liofilizacji.

Wydajność procesu ekstrakcji określa się jako procentowy odzysk glikozaminoglikanów (kwasu uronowego i siarczanu chondroityny) oraz żelatyny z surowca tj. chrząstki. W tym przypadku odzysk kwasu uronowego wyniósł 95%, siarczanów chondroityny 84%, a żelatyny 98%.

Przykład 2.

Ekstrakcję prowadzi się w jak w przykładzie 1. przy czym do szklanej kolby stożkowej o pojemności 500 cm³ odważa się 30,0 g oczyszczonej i rozdrobnionej do wielkości cząstek nie większych niż 4 mm, chrząstki grzebienia mostka kurcząt. Dodaje się enzym papainę w ilości 0,1 mg/g surowca w buforze fosforanowym o pH 7,0 (w stosunku wagowym 1:8 (w/w)). W temperaturze 70°C, przez 40 minut. Hydrolizaty poddaje się wirowaniu (23 000 x g, 15 min). Roztwory zawierające glikozaminoglikany i żelatynę są liofilizowane. Wydajność procesu ekstrakcji określa się jak w przykładzie 1.

Z chrząstki grzebienia mostka kurcząt wyizolowano 79% glikozaminoglikanów zawartych w surowcu oraz 88% żelatyny.

Przykład 3.

Ekstrakcję składników bioaktywnych z chrząstki drobiowej prowadzi się jak w przykładzie 1, przy czym do szklanej zlewki o pojemności 250 cm³ odważa się 4,0 g oczyszczonej i rozdrobnionej chrząstki grzebienia mostka kurcząt i dodaje enzym papainę w ilości 0,55 mg/g surowca oraz roztwór buforu fosforanowego (pH 7,0; w stosunku wagowym 1:6 (w/w)). Ekstrakcję prowadzi się w temperaturze 50°C, przez 40 minut. Po zakończonym procesie w celu oczyszczenia roztworów z pozostałości

tkanki uzyskane hydrolizaty wiruje się przez 15 min (23 000 x g). Roztwory zawierające glikozaminoglikany i żelatynę poddaje się suszeniu rozpyłowemu. Stopień ekstrakcji składników z tkanki chrzęstnej określa się jako procentowy odzysk żelatyny (na podstawie hydroksyproliny i współczynnika danego dla określonego surowca) oraz siarczanowanych glikozaminoglikanów.

Po 40 minutowej ekstrakcji termicznej w temperaturze 50°C połączonej z ultradźwiękami z dodatkiem enzymu na poziomie 0,55 mg/g wyizolowano 87% siarczanów chondroityny zawartych w surowcu, 84% kwasu uronowego oraz 75% żelatyny.

Przykład 4.

Postępuje się jak w przykładzie 1, przy czym do szklanej zlewki o pojemności 1000 cm³ odważa się 100,0 g rozdrobnionej chrząstki, dodaje się enzym papainę w ilości 0,55 mg/g surowca i roztwór buforu fosforanowego (pH 7,0; w stosunku wagowym 1:4 (w/w)). Ekstrakcję prowadzi się w temperaturze 70°C, przez 60 minut. Nie rozłożone pozostałości tkanki łącznej usuwa się poprzez wirowanie (23 000 x g, 15 min). Uzyskane hydrolizaty liofilizuje się. Wydajność procesu ekstrakcji GAG i żelatyny wyraża się jako procentowy odzysk hydroksyproliny z uwzględnieniem właściwego współczynnika jak również kwasu uronowego oraz siarczanu chondroityny (CS-4 i CS-6).

Po 1 godzinnej ekstrakcji termicznej (temperatura 70°C) połączonej z ultradźwiękami z dodatkiem enzymu na poziomie 0,55 mg/g wyizolowano 95% siarczanów chondroityny zawartych w surowcu, 87% kwasu uronowego oraz 95% żelatyny.