

Винахід стосується харчової добавки, що має профілактичні протиракові ефекти.

Були відомі різні харчові добавки для доповнення до їжі, особливо людської їжі, які мають корисний вплив на стан здоров'я і, доволіно, інгібуючу дію щодо виникнення деяких хвороб.

[Чеський патент номер 285721 (WO 99/50434)] розкриває штам мікроорганізму *Penicillium oxalicum* вар. *Armeniasa* CCM 8242, що продукує червоний барвник, і використання вказаного барвника як, *inter alia*, харчового. Штам був задепонований в Міжнародному Депозитарному Органі CCM - Чеська Колекція Мікроорганізмів Masaryk Університету, Tvrdeho 14, 602 00 Брно, Чеської Республіки, 19 березня 1998. Це - природний мікроорганізм, отриманий з ґрунту долини нижче гори Арапат.

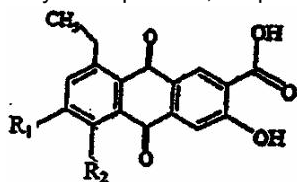
Тепер було знайдено, що продукт, отриманий біосинтезом мікроорганізму *Penicillium oxalicum* вар. *Armeniasa* CCM 8242, використовуваний в харчових добавках, надає протиракові властивості згадуваним добавкам.

Відповідно, винахід полягає в харчовій добавці, що має профілактичні протиракові ефекти, причому добавки включають від 20 до 99,99ваг.% продукту біосинтезу мікроорганізму *Penicillium oxalicum* вар. *Armeniasa* CCM 8242, отриманого ферментацією живильного середовища, що містить карбогідрати й амонійний азот, і від 0,01 до 80ваг.% фізіологічно інертного носія, і необов'язково допоміжні добавки.

Щоб одержати продукт біосинтезу, можливо культивувати продуктивний штам загальними процесами ферментації. Коли червоний барвник, отриманий, методом ізолювання від культивуваного водного середовища після сепарації біомаси, був підданий спектральному аналізу, було знайдено, що наявність змісту сухої речовини не менше, ніж 85ваг.% , містить не менше, ніж 52ваг.% барвної речовини.

Принцип, забарвлення базується на хромофорі типу антрахінону. Барвник складається з суміші субстанцій, що містять, згаданий хромофор і які відрізняються від основної структури бічними ланцюгами, олігопептидів або олігосахаридів.

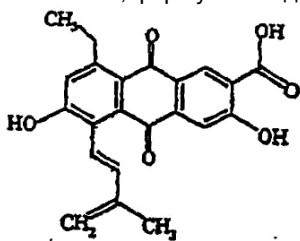
Сам хромофор - пента-заміщений антрахінон, що має три ізольованих водневих каркаси. Така сполука може бути зображена, наприклад, загальною формулою



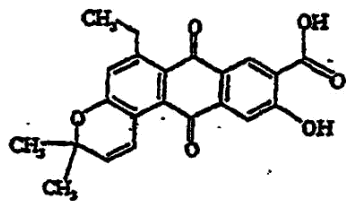
(I),

в якій R₁ - гідрокси, і R₂ - 3-метил-1,3-бутадієніл, і необов'язково R₁ і R₂ - циклізовані разом через атом кисню гідроксиду.

Таким чином, формула Ia відповідає основному варіантові, і формула Ib відповідає циклізованому.



(Ia)



(Ib)

Відповідно, формули, Ia і Ib виразно зображують 8-етил-3,6-дигідрокси-5[(1E)-3-метил-1,3-бутадієніл]-9,10-діоксо-9,10-дигідроантрацен-карбонову кислоту і 6-етил-10-гідрокси-3,3-диметил-7,12-дигідро-3H-нафто[2,3-f]хромен-9-карбонову кислоту, відповідно.

У продукті біосинтезу забарвлювальна субстанція може бути присутня у поєднанні з катіонами амонію, калію або натрію, що можуть бути присутнім у надлишку. Як побічні, можуть бути присутні субстанції білкової природи (амінокислоти, пептиди) з початкового живильного середовища у цих продуктах.

Щоб одержати червоний барвник, можливо виконати культивування продуктивного штаму в рідких живильних середовищах звичайними методами, наприклад поверхневим методом на тарілках або пластинах або методом занурення у ферментери. Кількість інокульованого матеріалу - від 3 до 7% за об'ємом. Для інокуляції в капусту, зерно або дріжджовий екстракт, дріжджовий аутолізат використовували культури, інкубовані протягом п'яти днів.

Оптимальні умови для проведення процесу мікробіологічного синтезу включають температури від 27 до 29°C, безперервне перемішування з вектором периферійної швидкості від 160 до 280хв⁻¹, постачання повітря в пропорціях на 1,2 об'ємів повітря 1,0 об'ємів живильного середовища, тиск в експлуатаційному ферментері від 50 до 80кПа. Вже після ферментації мікроорганізму від 24 до 35 годин, рідина вище культури стає червоною, і інтенсивність червоного кольору - у його максимумі - темний світло-вишневий колір - після інкубаційного періоду від 64 до 72 годин.

Як компоненти живильного середовища використовуються карбогідрати, різні сахариди, багатоатомні спирти і вуглеводні, і також відходи цукрового виробництва - патока - у кількості від 10 до 20г на 1 літр води.

Як постачальники азоту, можуть використовуватись, наприклад зерновий екстракт, аутолізат дріжджів або екстракт, і також сполуки, що містять азот у різних формах (такі як амінокислоти) у кількості азоту від 0,5 до 0,7ваг.%.

Фахівець в даній галузі оцінить, що цей винахід не обмежений вище описаним використанням особливо переважного штаму *Penicillium oxalicum* вар. *Armeniaca* CCM 8242, але використання інших штамів або мутантів згаданого мікроорганізму, що продукують червоний барвник, отриманий звичайними методами, наприклад, опромінюючи рентгенівськими променями або УФ, або дією фага і т.п. також охоплені концепцією і областю даного винаходу.

Після завершення біосинтезу, отриманий червоний барвник може бути ізольований від живильного середовища звичайними методами відділення. Ферментаційне середовище може бути, після сепарації біомаси або без сепарації біомаси, піддане ультрафільтрації і потім сконцентроване нано-фільтрацією у концентрат, що має зміст від 80 до 100г/л барвника. Альтернативно, рідину фільтрують або центрифугують від живильного середовища у порядку сепарації біомаси. Для осадження барвника, рідину підкислюють до рН від 3,0 до 2,5. Підкислення може бути здійснене будь-якою органічною або неорганічною кислотою, прийнятною в харчовій промисловості. Осадження може бути виконане з сульфатом алюмінію-калію $AlK_2(SO_4)_3$. Після осадження, барвник відокремлювали від рідини, наприклад центрифугуванням або фільтруванням.

В аналітичній оцінці, таким чином ізольований продукт показує наступні характеристики.

Барвник темно-червоний до чорного порошку, що є розчинним у лужному середовищі при рН від 8 до 9 (NH₃), у крижаній оцтовій кислоті, у яєчному білку, в етиловому спирті, у метанолі, у бутанолі, частково в ацетоні, і нерозчинним в гексані, в ефірі, в бензолі, тетрахлорметані, і утворює нерозчинні у воді хелати з металами.

Виготовлені розчини - малиново-червоні до темного червоного, стабільний при значеннях рН від 9 до 4, і вони майже не змінюють відтінок в залежності від значень рН. Забарвлення нейтрального розчину не змінюється (на відміну від карміну, бетаніну, антоціану) навіть при кип'ятінні розчину протягом 30 хвилин. Розчинність у воді - приблизно 100г/л.

При оцінці хімічної чистоти, в одержаному продукті були знайдені наступні значення (у мас.%):

Хімічна чистота:		Метод оцінки
Суша речовина	не менше, ніж 85%	гравіметрія
Зміст забарвлювальної субстанції	не менше, ніж 52%	спектрометрія
Зола	не більше, ніж 12%	гравіметрія
α-аміно азот	не більше, ніж 2,7%	формольне титрування
Важкі метали:		
миш'як:	не більше, ніж 3мг/кг	AAC
свинець	не більше, ніж 10мг/кг	AAC
ртуть	не більше, ніж 1мг/кг	AAC
кадмій	не більше, ніж 1мг/кг	AAC
Мікотоксини:		
Афлатоксини (сум. B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	не більше, ніж 10нг/кг	HPLC-FLD
Охратоксин А	не більше, ніж 20мкг/кг	HPLC-FLD
Стеригматоцистин	не більше, ніж 10мкг/кг	TLC-fluoresc.
T-2 токсин	не більше, ніж 50мкг/кг	GLC-ECD
Секалонова кислота	не більше, ніж 12,5мкг/кг	HPTLC
Антибіотична активність:	відсутня	Codex Alimentarius
Мікробна чистота:		
загальна кількість бактерій	не більше, ніж 5000/г	
загальна кількість грибків	не більше, ніж 100/г	
Сальмонелла	відсутня в 25г зразка	
<i>Escherichia coli</i>	відсутня в 10г зразка	

Прим.:

AAC - атомно-сорбційна спектрофотометрія;

HPLC - високоефективна рідинна хроматографія;

TLC - тонкошарова хроматографія;

HPTLC - високоефективна тонкошарова хроматографія;

GLC - газорідинна хроматографія.

Червоний барвник, ізольований при вищезгаданих описаних умовах і наявності вищезгаданих характеристик, тестували на гостру оральну токсичність, на 90-денну субхронічну токсичність, гостре шкірне/очне подразнення, антибіотичний вплив, цитотоксичність, мутагенність і протиракову активність.

Гостра оральна токсичність:

У тесті на гостру оральну токсичність на мишах, виконаному відповідно до принципів OECD для тестування хімічних сполук, ніякі токсичні ефекти і летальні випадки у тварин не спостерігалися після разової дози 2г/кг ваги тіла.

Субхронічна токсичність:

При 90-денному субхронічному токсикологічному вивченні на пацюках відповідно до принципів OECD Номер 408, тестований барвник призначався сумарно 120 SPF Hap: пацюкам лінії Вістар в дозах 0,5, 10,0 і 25,0мг/кг щодня протягом 90 днів. Пероральне введення здійснювали через зонд. При наступній гістопатологічній експертизі ніякі зміни, приписувані тестованій субстанції не були знайдені; ні гепатотоксичні ні нефротоксичні ефекти не були знайдені. При гістопатологічній експертизі тестована

субстанція виявила не достовірну гематотоксичність і при біохімічній експертизі тестована субстанція не мала ніякого явного ефекту при моніторингу біохімічних параметрів.

Шкірне/очне подразнення:

Тест гострого шкірного подразнення виконували відповідно до принципів OECD, номер 404 і ніякі гострі подразнювальні ефекти не були знайдені. Не спостерігалися ніякі симптоми подразнення протягом до 48 годин після введення. Тест гострого очного подразнення був виконаний відповідно до Принципів OECD Номер 405. Червоний барвник показав помірні ефекти в тесті гострого подразнення (тільки на кон'юнктиві); ніякі ознаки не спостерігалися після 72 годин після введення.

Антибіотична активність:

Субстанція була протестована на штаммах *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Streptococcus pyogenes* і *Serratia marcescens* виконували на трьох паралельних доріжках для кожного штаму (усього 18 Чашок Петрі). Ніяке гальмування росту не спостерігалось навколо нанесеного диска в кожній із чашок, навіть в тих, що зберігались при зниженій температурі протягом 16 годин перед 24-годинним культивуванням безпосередньо (які повинні були поліпшити прояв субстанцій, що повільно мігрують в агарі).

Цитотоксичність:

Цитотоксичність була оцінена стандартним мікронуклеарним тестом на мишах. Червоний барвник, призначений в разовій дозі per os 2,15 і 50мг/кг, не показав ніякого цитотоксичного ефекту. Кількість мікроядер в еритроцитах не збільшилися після введення. Субстанція, яку піддавали тестуванню не показала ніякого мутагенного ефекту.

Мутагенність:

Тест на мутагенність (реверсійно-мутаційний тест на канцерогенність) виконали на гістидин-ауксотрофному штамі *Salmonella typhimurium* відповідно до Принципів OECD Номер 471. За даних умов ніякого впливу продукту на мутації бактерій не спостерігалось.

Протиракова активність:

Червоний барвник виділений згідно з вищеописаними умовами, що мають вищеописані характеристики був підданий скринінговому вивченню на протиракові властивості.

Субстанція, що підлягає тестуванню, була введена мишам з асцитичною формою лімфосаркоми Гарднера (IP-LsG). 6-(2-(2-гідроксиетил)аміно етил)-5,11-діоксо-5,6-дигідро-11H-індено[1,2-с]ізохіноліну гідроклорид, загальної формули $C_{20}H_{18}N_2O_3 \cdot HCl$ використовувався як еталонна сполука.

Використовувалися миші жіночої статі C₃H, вагою від 26,1 до 27,3г. Тварини зберігалися в пластмасових контейнерах і знаходилися на NOE дієті, розробленій RATIO, s.r.o., Breclav, Чеська Республіка, і вживали питну воду ad libitum. В камері підтримувалася температура, відносна вологість становила 60%, і світловий режим не регулювався.

Лімфосаркому Гарднера у C₃H мишах підтримували в асцитичній формі, інюкуючи асцитичні клітини віддалені тижнем після попередньої інюкації через пункцію черевної порожнини. Мишам вводили 0,2мл асцитичної рідини, розведеної розчином натрію хлориду для ін'єкцій інтраперитонеально до 20 разів. Клітинний матеріал для тестів отримали пункцією черевної порожнини на сьомий день після інюкації. Для терапевтичного тесту, був введений інюкулят асциту, розведений ізотонічним розчином натрію хлориду, 10^7 клітин в об'ємі 0,2мл і.р. кожній тварині.

C₃H миші були 6 тижнів старшими, з вагою від 26,1 до 27,3г, у групах 10 тварин, контроль був загальний. Два типи дозувань використовувалися для кожного шляху введення і для однієї тестованої субстанції.

Рівні дозувань: 200 і 100мг/кг x 5 p.o. і 100 і 50мг/кг x 5 s.c. в об'ємі від 0,2 до 0,4мл і від 0,2 до 0,4мл p.o. (еталонної субстанції), відповідно на 20г ваги тіла. Частота введення: 1х щоденно, починаючи з першого дня. Тестована субстанція призначалася по безперервній схемі з першого по 5-й день у дозах, наведених в Таблиці 1 і контрольна субстанція призначалась p.o. один раз в 1-ий день.

Після завершення введення, тварини були залишені для моніторингу часу виживання. Дозозалежний період виживання був оцінений у порівнянні з необробленим контролем. Період часу як біологічна відповідь був оцінений за допомогою непараметричного тесту згідно Hajek [Fabian V.: Zakladnı statistické metody ("Основні Статистичні Методи"), NCSAV, Прага 1963].

Після того, як експеримент був завершений, був оцінений період часу у випадку оцінки характеристик, використовуючи тест тотожності двох засобів (t-тест Стюдента) на основі припущення розподілення н-логарифмічних значень часу і на основі припущення різних невідомих дисперсій [Roth Z., Josffko M., Maly V., - Trska V.: "Статистичні Методи в Експериментальній Медицині"; p.278, SZN, Прага 1962]. Геометричні середні були розраховані від індивідуальних значень часу до смерті. Розходження в середніх значеннях, у яких значення тестового критерію перевищило критичне значення для рівня значимості 5%, були позначені як статистично істотні.

Сумарні результати наведені в наступних таблицях:

Таблиця 1

Таблиця ілюструє медіани періоду часу до смерті, статистично значимого, оціненого за допомогою непараметричного тесту згідно Hajek при рівні значимості $\alpha=0,05$ і оцінки числа тварин, що виживають, співвіднесених з початковим значенням в залежності від доз субстанцій

субстанція	Доза мг/кг/день	n (J)	Медіана часу до смерті (дні)	Виживання К-сть тварин, виживших на 65-й день	Примітка
контроль	0	10	14	0/10	
Червоний Барвник	200 p.o.	10	15	1/10	
Lot 290698	100 p.o.	10	14	0/10	
	100 s.c	10	13	0/10	1)

	50 s.c.	10	13	0/10	
еталон	200 p.o.	10	>65	10/10	1)
	100 p.o.	10	>48	5/10	1)

n - число тварин у групі

1) Статистично істотна різниця проти контролю при рівні значимості $\alpha=0,05$

Таблиця 2

Таблиця ілюструє середні періоди життя, довірчі інтервали для геометричного середнього для $P=1-\alpha=0,95$ і відносні значення середнього часу життя в % контролю в залежності доз субстанцій

субстанція	Доза мг/кг/день	n(J)	Геометрич. середня (дні)	Довірчі інтервали (дні)	Вживання (% контролю)	Примітка
контроль	0	10	14,05	/12,6; 15,7/	100	
Червоний Барвник	200 p.o.	10	>17,50	/12,5;24,6/	>125	
Lot 290698	100 p.o.	10	14,33	/13,3; 15,4/	102	
	100 s. c	10	12,87	/12,3; 13,5/	92	
	50 s.c.	10	13,86	/11,9; 16,2/	99	

n - число тварин у групі

Таблиця 3

Таблиця ілюструє середню вагу тварин на початку експеримента і коефіцієнт втрати ваги у порівнянні з контрольною групою в залежності від дозування субстанцій в перший тиждень після початку терапії

субстанція	Доза мг/кг/день	n(J)	Середня вага (г)	Коефіцієнт ваги %	Примітка
контроль	0	10	26,1	0,00	
Червоний Барвник	200 p.o.	10	27,2	-5,00	
Lot 290698	100 p.o.	10	27,2	-5,00	
	100S.C.	10	27,3	-5,99	
	50 s.c.	10	26,7	-1,60	
еталон	200 p.o.	10	26,7	-14,63	
	100 p.o.	10	26,1	-6,67	

n - число оцінених тварин у групі

Може бути встановлено, базуючись на результатах, наведених у вищезгаданих таблицях, що оптимальна доза може бути знайдена біля найвищої тестованої дози 200мг/кг x 5, тобто при кумулятивній дозі 11г/кг p.o. Можливо передбачити різницю в характеристиці активності кривої при оральних і підшкірних введеннях, метаболічного перетворення субстанції у печінці. Виходячи з припущення інтенсивного метаболізму, повторна доза 600мг/м² p.o. може бути визначена як допустима для людини. Ця доза відповідає 16,2мг/кг, p.o., яка відповідає повторній добовій дозі 1135мг p.o. x 5, тобто до сукупної дози 5,67г p.o. для людини вагою 70кг. Тестована субстанція не виявляє токсичності, хоча її введення пов'язане з втратою ваги менше, ніж 10%, особливо у порівнянні з еталонною субстанцією.

Крива активності на Фіг. представляє функцію натурального логарифма відносного ризику індексу R в залежності дози субстанції при різних шляхах введення.

Приклади

Приклад 1

Живильне середовище, що містить 12г/л цукру, 5г/л зернового екстракту, 0,002г/л сірчаноокислого цинку і 0,001г/л сульфату магнію інокулювали двох-денною культурою *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242, який був культивований в інокуляторі, в кількості 4об.% живильного середовища. Після закінчення біосинтезу червоного барвника, рідину від живильного середовища центрифугували для відділення від біомаси. Рідину підкислювали до pH від 3,0 до 2,5 оцтовою кислотою. Осадження виконували з сульфатом калію алюмінію $AlK_2(SO_4)_2$. Після осадження, барвник відділяли від рідини центрифугуванням.

Приклад 2

Живильне середовище, що містить 16г/л цукру, 7г/л екстракту дріжджів, 0,002г/л сірчаноокислого цинку і 0,001г/л сульфату магнію інокулювали двох-денною культурою *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242, що був культивований в інокуляторі, в кількості 6об.% живильного середовища. Після закінчення біосинтезу червоного барвника, рідину від живильного середовища центрифугували для відділення від біомаси. Рідину підкислювали до pH від 3,0 до 2,5 лимонною кислотою. Осадження виконували сульфатом алюмінію-калію $AlK_2(SO_4)_2$. Після осадження, барвник відділяли від рідини центрифугуванням і рекристалізовували.

Приклад 3

Живильне середовище, що містить 20г/л цукру, 10г/л аутолізата дріжджів, 0,002г/л сірчаноокислого цинку і 0,001г/л сульфату магнію інокулювали двох-денною культурою *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242, що був культивований в інокуляторі, у кількості 8об.% живильного середовища. Після закінчення біосинтезу червоного барвника, живильне середовище піддавали ультрафільтрації, використовуючи 10000

20000µm мембрани, наступному концентруванню за допомогою нано-фільтрації, використовуючи від 200 до 500µm мембрани до концентрату, що містить 100г/л барвника.

Приклад 4

Живильне середовище, що містить 18г/л цукру, 19г/л екстракту дріжджів, 0,002г/л сірчанокислового цинку і 0,001г/л сульфату магнію інокулювали двох-денною культурою *Penicillium oxalicum* вар. *Armeniaca* CCM 8242, що був культивованій в інокуляторі, у кількості 8об.%, живильного середовища. Після закінчення біосинтезу червоного барвника, біомасу центрифугували від живильного середовища, і рідину піддавали ультрафільтрації, використовуючи мембрани від 10000 до 20000µm, концентруванню за допомогою нано-фільтрації, використовуючи мембрани від 200 до 500µm до концентрату, що містить 80г/л барвника.

Приклад 5

25г концентрату, отриманого відповідно до Прикладу 3 гомогенізували з 75г мальтодекстрину і висушували розпилюванням при 180-220°C.

Приклад 6

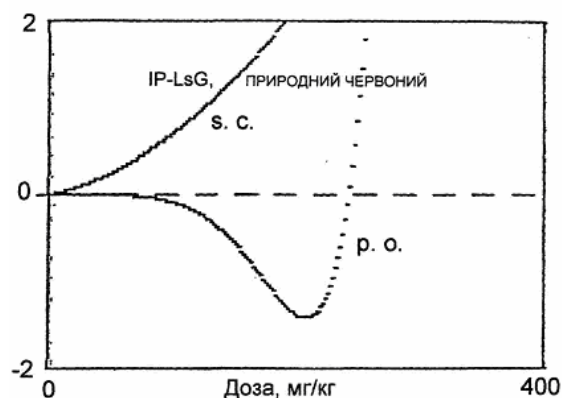
65г концентрату, отриманого відповідно до Прикладу 3 гомогенізували з 35г крохмалю і висушували розпилюванням при температурі від 180 до 220°C.

Продукти, отримані відповідно до Прикладів 1-6 можуть бути додані до харчових продуктів, таких як ковбаси, кондитерські вироби, йогурти, безалкогольні та алкогольні напої і т.п. у кількостях від 50 до 400мг/кг харчового продукту. Вони можуть надалі використовуватися для виготовлення водних, спиртових або водно-спиртових розчинів з концентраціями активної субстанції від 2 до 10об.%.

Приклад 7

Кристалічний продукт, отриманий відповідно до Прикладу 2, гомогенізували з фармацевтичним екціпієнтом у формі емульсії, гомогенізували з лактозою і пресували в таблетки, що мають зміст активної субстанції 350 і 450 міліграмів. Таблетки можуть бути виготовлені також із глюкозою та з іншими фармацевтично прийнятними носіями.

LnR



Фіг.