

ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО ГІДРОЛІЗАТУ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Черно Н.К., д-р техн. наук, професор, Капустян А.І., канд. техн. наук, Сейрик В.В., студент
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

Здійснено гідроліз молочнокислих бактерій *Lactobacillus acidophilus* ферментативним методом із метою отримання біологічно активних компонентів клітинних стінок, що володіють імунотропною дією. Обрано оптимальні умови гідролізу *Lactobacillus acidophilus*, при яких утворюється максимальна кількість низькомолекулярних біологічно активних продуктів. Вивчено склад отриманого гідролізату.

Hydrolysis of the lactic acid bacteria Lactobacillus acidophilus by enzyme method in order to obtaining the biologically active components of the cell walls having immunotropic action was made. The optimal conditions of Lactobacillus acidophilus hydrolysis process under which formed a maximum amount of low molecular weight biologically active products was selected. The composition of received hydrolyzate was studied.

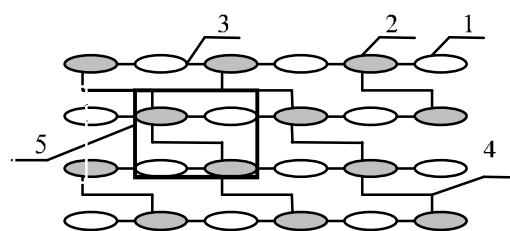
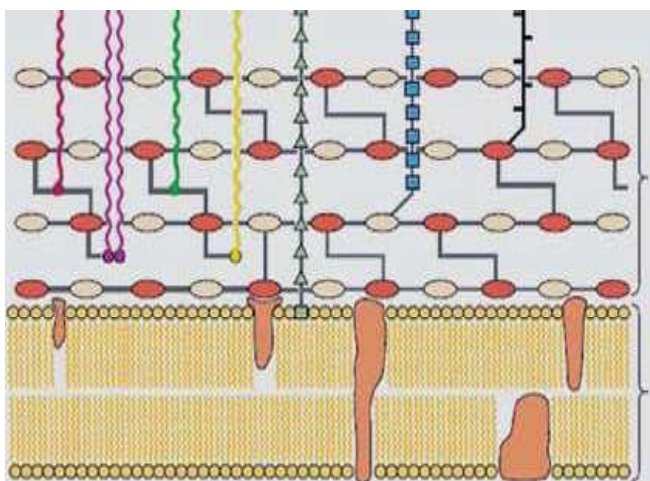
Ключові слова: молочнокислі бактерії, ферментативний гідроліз, пептидоглікани, мурамилдипептид.

Стрімкий науково-технічний прогрес визначає стиль життя сучасної середньостатистичної людини, який характеризується інтенсивним ритмом та браком часу на адекватне харчування та оздоровлення. Крім того, організм людини піддається шкідливому впливу навколишнього середовища та хіміотерапевтичних препаратів. У комплексі дія таких несприятливих факторів може викликати стрес основних систем життєдіяльності організму та призводить до пригнічення імунної системи, що провокує виникнення безлічі тяжких захворювань – імунодефіцити, алергічні, аутоімунні, пухлинні процеси. Лікування та профілактика таких захворювань проводиться за допомогою сполук, що володіють імунотропною властивістю.

Особливий інтерес серед таких сполук викликають продукти руйнування клітинних стінок бактерій (рис.1), імуномодельовальна та імуностимулювальна дія яких обумовлена наявністю в їхньому складі біологічно активних пептидогліканів, низькомолекулярних пептидів та амінокислот.

Значною імунотропною дією володіє складова пептидоглікану клітинної стінки – мурамилдипептид (МДП) (рис. 2), який є структурною субодиницею глікозамінілмурамилдипептиду (ГМДП) (рис. 1).

Низькомолекулярні продукти руйнування глікозамінілмурамилдипептиду бактерій, у тому числі МДП, сприяють активації вродженої та адаптивної імунної системи, прискорюють ріст, підвищують резистентність до радіаційного опромінення [1-4].



1 – *N*-ацетилглюкозамін; 2 – *N*-ацетилмурамова кислота, 3 – β -(1 → 4) глікозидний зв'язок між *N*-ацетилглюкозаміном і *N*-ацетилмурамовою кислотою; 4 – пептидний місток; 5 – глюкозамінурамилдипептид.

ГМДП

Рис.1 – Фрагмент клітинної стінки G^+ бактерій у розрізі

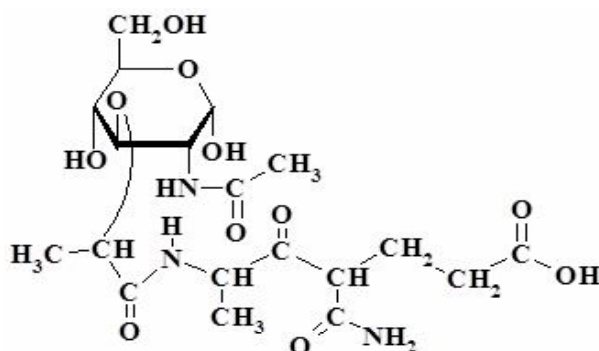


Рис.2 – Структура N-ацетилмурамил-L-аланіл-D-ізоглутаміна (МДП)

Відомі різноманітні способи руйнування клітинної стінки бактерій, які передбачають фізичне, хімічне, або біохімічне втручання, тобто дію високих температур, ультразвуку, обробку мінеральними кислотами або гідролітичними ферментами [2-7]. Так, у роботі [2] здійснювали гідроліз *Lactobacillus bulgaricus* послідовною обробкою пепсином, лізоцимом та ультразвуком, в результаті якого отримували 0,7% очищеного ГМДП. Відомий також спосіб гідролізу клітинної стінки бактерій *Lactobacillus acidophilus* штаму В 2505 термокислотним методом, який забезпечує вихід аміноцукорів у кількості 0,02...0,03 % та низькомолекулярних пептидів – 2 % [7].

Руйнуванню клітинної стінки бактерій шляхом їх ферментативного гідролізу сприяє їхня попередня термообробка при температурі 95...100 С, при якій відбувається денатурація білка клітини, що супроводжується руйнуванням третинної структури, в наслідок чого підвищується його здатність до ферментативного гідролізу [6-8].

Дане дослідження присвячено обґрунтуванню умов ферментативної деструкції *Lactobacillus acidophilus* бактеріального препарату «Наріне» з метою отримання біологічно активних продуктів його гідролізу. *Lactobacillus acidophilus* є цінним джерелом пептидогліканів, оскільки у складі грампозитивних бактерій міститься до 70 % цих біополімерів [2,3,8,9].

У якості ферментів як засобів руйнування клітинної стінки використовували трипсин та лізоцим. Вибір саме цих ферментів аргументується тим, що вони гідролізують специфічні зв'язки, які є у складі клітинної стінки бактерій (рис. 1). Так, лізоцим каталізує розрив β -(1 \rightarrow 4) глікозидних зв'язків (3) між N-ацетилглюкозаміном (1) і N-ацетилмурамовою кислотою (2), а трипсин – пептидних зв'язків між мурамовою кислотою в паралельних ланцюгах.

Ефективність руйнування клітинної оболонки бактерій оцінювали за кількісним вмістом амінокислот, пептидів та аміноцукрів у рідкій фазі гідролізату.

Вміст амінокислот у гідролізаті визначали методом формольного титрування, пептидів – за допомогою біуретової реакції спектрофотометрично після осадження високомолекулярних білків розчином трихлороцтової кислоти (ТХОК). Загальний вміст білків у гідролізатах знаходили тим же методом, але без попередньої обробки розчином ТХОК.

Кількість аміноцукорів, що входять до складу пептидогліканів бактерій і також обумовлюють імуностимулювальну дію гідролізатів, визначали спектрофотометрично за реакцією Ельсона-Моргана в перерахунку на глюкозамін [7].

Для гідролізу використовували 0,2 % розчини трипсину і лізоциму при масовому співвідношенні ферменти : субстрат (1 : 40, 1 : 20, 1 : 10). Гідроліз субстрату проводили при рН 7,5 і 37 °С, що відповідає оптимумам дії ферментів.

Гідроліз клітинної стінки бактерій здійснювали двома способами – по черговим та одночасним використанням трипсину і лізоциму, адже обидва ферменти проявляють максимальну активність у однаковому діапазоні значень температури і рН середовища. При по черговому ферментативному гідролізі бактеріальної маси варіювали послідовність обробки субстрату ферментами: трипсин-лізоцим та лізоцим-трипсин. Виявлено, що обробка субстрату в послідовності трипсин-лізоцим є ефективнішою ніж лізоцим-трипсин, оскільки утворюється більша кількість низькомолекулярних продуктів гідролізу.

Встановлено, що ефективність гідролізу клітинних стінок бактерій значно зростає у випадку їхньої обробки композицією гідроліз (рис. 3). При по черговій взаємодії трипсину і лізоциму з бактеріальною масою вміст амінокислот у гідролізаті значно менший. Така тенденція спостерігається при різних співвідношеннях ферментна складова : субстрат.

Отримані результати дозволяють припустити, що лізоцим і трипсин у даному реакційному середовищі є взаємними активаторами, які забезпечують синергетичний ефект.

Можна припустити, що зменшення виходу амінокислот у гідролізаті при почерговій обробці бактерій ферментами обумовлено тим, що низькомолекулярні продукти першого етапу гідролізу можуть інгібувати каталітичну дію другого ферменту.

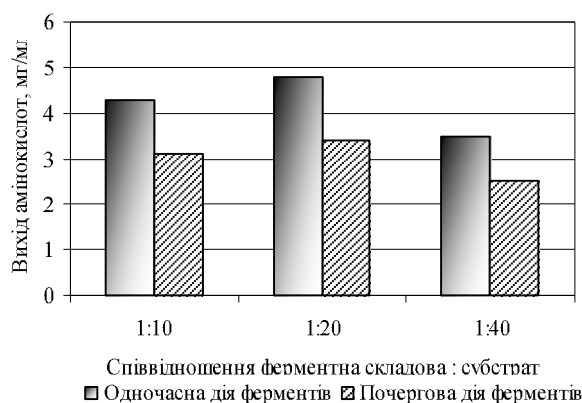


Рис. 3 – Залежність виходу амінокислот в гідролізаті бактерій від масового співвідношення ферментна складова : субстрат та способу ферментативної обробки

Вивчено залежність ефективності гідролізу *Lactobacillus acidophilus* від часу їхньої попередньої термообробки (гідромодуль бактеріальна маса : вода складає 1 : 60). У табл. 1 наведено дані, які характеризують вміст амінокислот у гідролізаті залежно від співвідношення ферментна композиція : субстрат і часу попередньої термообробки.

Таблиця № 1 – Вплив тривалості попередньої термообробки і масового співвідношення ферментна композиція : субстрат на вихід амінокислот

Масове співвідношення ферментна композиція : субстрат	Тривалість попередньої термообробки				
	Без кип'ятіння	15 хв.	30 хв	45 хв	60 хв
	Вихід амінокислот, мг/мл				
1 : 10	0,01	2,12	4,33	5,26	5,84
1 : 20	0,01	2,06	3,68	4,94	5,41
1 : 40	0,01	0,52	1,53	2,18	3,23

Результати експериментальних досліджень підтверджують доцільність використання попередньої термообробки молочнокислих бактерій, оскільки в результаті ферментативного гідролізу при всіх масових співвідношеннях ферментна композиція : субстрат, кількість амінокислот у гідролізаті збільшується, порівняно зі зразками контролю (без термообробки). Максимальний вміст амінокислот у гідролізаті має місце при кип'ятінні субстрату протягом 60 хв.

Досліджено залежність накопичення низькомолекулярних продуктів гідролізу *Lactobacillus acidophilus* від тривалості взаємодії ферменту з субстратом (рис. 4,5). Співвідношення бактеріальної маси як субстрату до ферментної композиції (20 : 1) і час попередньої термообробки (протягом 60 хв) було обрано з урахуванням результатів експериментів, представлених в табл. 1. Час взаємодії субстрату з ферментною композицією варіювали в інтервалі 1...24 год.

Як видно із графічної залежності, зображеної на рис. 4, вміст амінокислот в гідролізатах поступово збільшується протягом майже 16 год, після чого накопичення амінокислот припиняється.

Ефективність гідролізу клітинної стінки бактерій оцінювали також за кількісним вмістом аміноцукрів у рідкій фазі гідролізату (рис. 5)

Наведені дані підтверджують факт руйнування клітин бактерій, оскільки спостерігається поступове збільшення концентрації в розчині гідролізату аміноцукрів – однієї із мінімальних структурних одиниць пептидогліканів клітинної стінки *Lactobacillus acidophilus*. Час досягнення максимальної кількості аміноцукрів у гідролізаті (0,08 мг/мл) корелює з таким, при якому спостерігається і максимальна кількість амінокислот та складає 16...18 год.

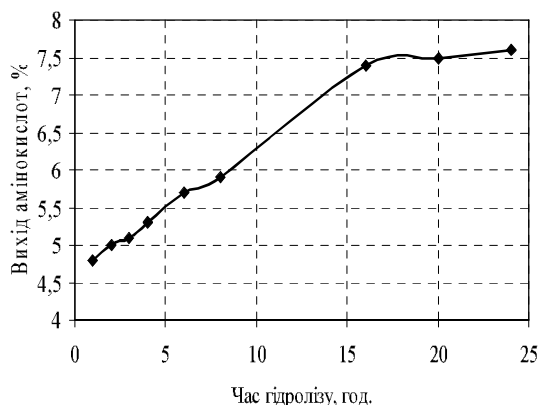


Рис. 4 – Вплив тривалості ферментативного гідролізу *Lactobacillus acidophilus* на вихід амінокислот у рідку фазу гідролізату

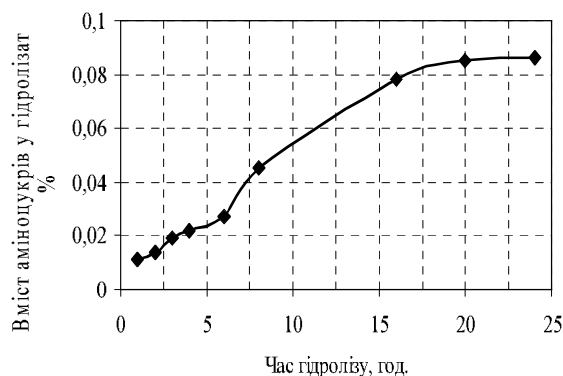


Рис. 5 – Вплив тривалості ферментативного гідролізу *Lactobacillus acidophilus* на вихід аміноцукрів у рідку фазу гідролізату

Залежно від співвідношення ферментної композиції з субстратом, утворюються гідролізати з різною варіацією нітрогеновмісних компонентів (табл. 2).

Таблиця 2 – Склад компонентів гідролізату бактерій

Компонент гідролізату	Компоненти гідролізату			
	Співвідношення ферментна складова : субстрат			
	Контроль (без ферментолізу)	1 : 10	1 : 20	1 : 40
Білок, %	9,54	0,52	1,15	5,56
Пептиди, %	0,03	3,04	3,31	2,04
Амінокислоти, %	0,01	8,64	7,57	4,83
Аміноцукри, %	-	0,08	0,09	0,04

Так, при збільшенні концентрації ферментів спостерігається зменшення частки розчинного білка з паралельним збільшенням кількості амінокислот у гідролізаті. При цьому кількість пептидів при різних варіантах співвідношення ферментна складова : субстрат суттєво не відрізняється. Слід відмітити, що саме фракція пептидів (до 1500 Да) [5], яка не осаджується ТХОК, володіє імуноотропною активністю [7]. Найбільша кількість пептидів – 3,3 мг/мл та аміноцукорів – 0,09 % міститься у гідролізаті при співвідношенні ферментів до бактерій 1 : 20.

Отже, представлені результати доводять ефективність використання запропонованого способу ферментативної обробки бактерій *Lactobacillus acidophilus* з метою руйнування їх клітинної стінки, оскільки він забезпечує накопичення біологічно активних компонентів у гідролізаті в кількості, яка перевищує такі показники відомих способів отримання гідролізатів молочнокислих бактерій [1,2,8]. Оптимальними параметрами процесу деструкції бактеріальної маси, що зумовлюють максимальне накопичення біологічно активних низькомолекулярних продуктів, є її попередня термообробка протягом 60 хв та ферментативний гідроліз протягом 18 год при співвідношенні ферментна складова : субстрат 1 : 20.

Література

1. Сенченко С.П. Изучение состава препарата, полученного на основе гидролизата молочнокислых бактерий / С.П. Сенченко, В.А. Самойлов, Н.М. Гостищева, Г.В. Сеньчукова, М.В. Гаврилин // Хим.-фармац. журн. – Т. 39, – № 3. – 2005. – С. 51-53.
2. Пат. на полезную модель RU (11) 2304167 (13) C2 (51) МПК C12P21/00 (2006.01) Способ получения гликопептидов и гликопептидный продукт, полученный этим способом, для использования в медицине / Ермолаев Е. Д., Софронова О. В., Орлов Н. С., Полякова Л. Л., Пешкова Л. М. // Заявитель: ООО «МЕДБИОФАРМ-БИОТЕХ». – Заявка № 2005128653/13, 15.09.2005; опубл. 20.03.2007.
3. Пинегин Б.В. Препараты мурамилдипептидного ряда – иммуноотропные лекарственные средства нового поколения / Б.В.Пинегин, Т.М. Андропова, М.И. Карсонова // International journal on immunorehabilitation. – N 6, – P. 34.
4. Земляков А.Е. б-Диалкилметилгликозиды N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина: синтез, протективное антиинфекционное и цитотоксическое действие / Земляков А.Е., Цикалова В.Н., Цикалов

- В.В., Чирва В.Я., Мулик Е.Л., Кузовлев Ф.Н., Калюжин О.В., Киселевский М.В. // Биоорган. химия. – 2008. – Т. 34, № 1. – С. 114-120.
5. Кленов Р.О. Спектры пептидных соединений в эритроцитах разного возраста в условиях действия экзогенного АТФ. / Р.О. Кленов, Е.В. Чернова, Н.А. Кленова // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. – 2009. – № 2 (68). – С. 155-160.
 6. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение / Л.Я. Телишевская // Аграрная наука, Москва. – 2000.
 7. Гаврилин В.М. Выбор оптимальных условий получения гидролизатов молочнокислых бактерий термостойким способом / М.В. Гаврилин, Г.В. Сенчукова, С.П. Сенченко, В.А. Самойлов, Н.А. Гостишева // Химико-фармацевтический журнал. – Т. 41, – №2. – 2007. – С. 54-56.
 8. Самойлов В.А. Изучение состава препарата, полученного на основе гидролизатов молочнокислых бактерий / В.А. Самойлов, Н.А. Гостишева Г.В. Сенчукова, М.В.Гаврилин, С.П. Сенченко // Хим.-фармац. журн. – Т.39, – № 3. – 2005. – С. 51-53.
 9. Гараян Г.С. Химическое обоснование и биологическое исследование гидролизата на основе культур молочнокислых бактерий / Г.С. Гараян, Р.А. Ханферян, Э.Т. Оганесян // Хим.-фармац. журн. – Т. 44, – № 8. – 2010. – С. 46-49.

УДК [577.114.4+577.15]:66.096.4:001.891

ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ БРОМЕЛАЙНУ З АРАБІНОГАЛАКТАНОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМИ МЕТОДАМИ

Черно Н.К., д-р техн. наук, проф., Гураль Л.С., канд. техн. наук, доц., Ломака О.В., асп.
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

*Методами ізомольних серій, мольних співвідношень досліджено комплексоутворення бромелайну та арабіногалактану сосни *Pinus sylvestris* L. Визначено, що фермент та полісахарид взаємодіють при мольному співвідношенні 2 : 1, що відповідає однаковим об'ємним співвідношенням 0,5 % розчинів обох складових. Розраховано константу стійкості комплексу бромелайн-арабіногалактан. Установлено, що бромелайн при комплексоутворенні з арабіногалактаном зберігає високу протеолітичну активність (80,8 %).*

*The complexation of bromelain and arabinogalactan of pine *Pinus sylvestris* L. has been studied by the methods of isomolar series and molar ratios. It has been determined that enzyme and polysaccharide interact at a molar ratio 2 : 1, that corresponds to the same volume ratio of 0.5% solutions of the both components. The stability constant of the complex bromelain-arabinogalactan has been calculated. It has been found that bromelain at the complexation with arabinogalactan preserves high proteolytic activity (80.8 %).*

Ключові слова: арабіногалактан, бромелайн, комплексоутворення, метод ізомольних серій, метод мольних співвідношень, константи нестійкості та стійкості комплексів.

Стрімко розвиваються дослідження в напрямі створення комплексів на основі біополімерів із включенням широкого спектру біологічно активних речовин. Одним із перспективних полісахаридів, який може бути використаний з цією метою, є арабіногалактан (АГ). Високомолекулярна природа, водорозчинність, мембранотропні та функціонально-технологічні властивості дозволяють використовувати його як у харчовій промисловості, так і в медицині [1, 2].

Арабіногалактан найчастіше отримують із модрина [3], застосовують як матрицю для іммобілізації багатьох сполук, яким притаманна біологічна активність, з метою їхньої стабілізації та підвищення біодоступності.

Раніше нами було показано доцільність отримання комплексу арабіногалактану з протеолітичним ферментом бромелайном [4, 5].

Метою даної роботи є обґрунтування стехіометричного співвідношення складових комплексу бромелайн-арабіногалактан спектrophотометричними методами.

Для отримання комплексу застосували арабіногалактан, виділений із сосни звичайної *Pinus sylvestris* L. з молекулярною масою 65 kDa [6] та ферментний препарат бромелайн фірми Merck (Німеччина) з молекулярною масою 30 kDa.