

10. Калориметричний пристрій для визначення питомої теплоти випаровування вологи і органічних рідин з матеріалів: пат. 84075 Україна: МПК⁸ G01 N25/26, G01 N25/28. № a200613266; заявл. 15.12.06; опубл. 10.09.08.
11. Никитина Л.М. Таблицы равновесного удельного влагосодержания и энергия связи влаги с материалами. – М.-Л.: «Госэнергоиздат», 1963. – 176 с.
12. Сушка древесины: справочник / Составители С. Алюшин и др. – К.: «Тристан», 2004. – 448 с.
13. Згурський А.В., Поліщук Г.С., Кропивницька І.О. Перерозподіл пектинових речовин в овочевій сировині при виробництві морозива // Харчова промисловість. – 2011. – № 10. – С. 50-55.
14. Химический состав пищевых продуктов : справочные таблицы : в 2 кн. / Под ред. И.М. Скурихина и М.Н. Волгарева. – М.: «Агропромиздат», 1987.
15. Гупало О. П., Тушницький О. П. Хімія деревини : навч. посібник – К.: «Знання», 2008. – 276 с.

References

1. Lykov A. V. (1968). Teoriya sushki. Moscow: Energiya, 472.
2. Zaytsev I.D., Aseev G.G. (1988). Fiziko-khimicheskie svoystva binarnykh i mnogokomponentnykh rastvorov neorganicheskikh veshchestv: spravocnoe izdanie. Moscow: Khimiya, 416.
3. Mosin O.V. Sposobnost vody k rastvorenuyu. Sayt o8ode.ru. – Available at: <http://www.o8ode.ru/article/water/>
4. Mikhaylik V.A. (2006). Eksperimentalnoe issledovanie gidratsii sakharozy. Naukovi pratsi Odeskoї natsionalnoї akademії kharchovikh tekhnologii, no. 28, vol. 2, pp. 370-374.
5. Mikhaylik V.A., Davidova O.O., Mank V.V. (2000). Doslidzhennya gidratsii D-glyukozi ta D-fruktozi. Proceedings of the Problemi ta perspektivi stvorenniya i vprovadzhennya novikh resurso- ta energooshchadnykh tekhnologii, obladnannya v galuzyakh kharchovoї i pererobnoї promislivosti (Ukraine, Kiev, October 19-21, 1999). Kiev: UDUKht, vol.1, pp. 106.
6. Isakov V.T. Yestestvennoe i iskusstvennoe strukturirovanie vody. Sayt o8ode.ru. – Available at: http://www.o8ode.ru/article/learn/water_structure.htm
7. Frenks F. (1980). Voda, led i rastvory prostykh molekul. Voda v pishchevykh produktakh, eds. R.B. Dokuorta. Moscow: Pishchevaya promyshlennost, pp. 14-32.
8. Brunauer S. (1948). Adsorbtsiya gazov i parov. Moscow: Gos. izdatelstvo inostrannoy literatury, 768.
9. Simatos D., Four M., Bonzhur I., Kouch M. (1980). Primenenie differentsialnogo termicheskogo analiza i differentsialnoy skaniruyushchey kalorimetrii pri izuchenii vody v pishchevykh produktakh. Voda v pishchevykh produktakh, eds. R.B. Dokuorta. Moscow: Pishchevaya promyshlennost, pp. 156-170.
10. Snezhkin Yu.F., Dekusha L.V., Dubovikova N.S., Grishchenko T.G., Vorobyov L.Y., Boryak L.A. (2008). UKR. Patent No. 84075.
11. Nikitina L.M. (1963). Tablitsy ravnovesnogo udelnogo vlagosoderzhaniya i energiya svyazi vlazi s materialami. – Moscow-Leningrad: Gosenergoizdat, 176.
12. Alyushin S. et al. (2004). Sushka drevesiny: spravocnik. Kiev: Tristan, 448.
13. Zgurskiy A.V., Polishchuk G.C., Kropivnitska I.O. (2011). Pererospodil pektinovykh rechovin v ovochevyi sirovini pri virobnitstvi moroziva. Kharchova promislivost, no. 10, pp. 50-55.
14. Skurikhin I.M., Volgarev M.N. (1987). Khimicheskiy sostav pishchevykh produktov. Spravochnye tablitsy, 2 vol. Moscow: Agropromizdat.
15. Gupalo O. P., Tushnitskiy O. P. (2008). Khimiya derevini. Navchflnyi posibnik. Kiev: Znannya, 276.

Отримано в редакцію 12.05.2018
 Прийнято до друку 30.06.2018

Received 12.05.2018
 Approved 30.06.2018

УДК 602.4:[577.15:577.114.4]:635.342

DOI: <http://dx.doi.org/10.15673/swonaft.v82i1.1016>

ДІЄТИЧНА ДОБАВКА ІМУНОТРОПНОЇ ДІЇ НА ОСНОВІ ПРОДУКТІВ ДЕСТРУКЦІЇ ПРОБІОТИЧНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ КУЛЬТУР

Капустян А. І., к.т.н., доцент, Черно Н. К., д.т.н., професор
 Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

Анотація. У роботі розглянуто можливість отримання імунотропної дієтичної добавки на основі низькомолекулярних продуктів деградації пептидогліканів клітинних стінок пробіотичних бактерій. Встановлено раціональні режими автолізу біомаси як первинного етапу деградації пептидогліканів бактеріальних клітинних стінок. Показано, що найбільш інтенсивний лізис клітин відбувається при експозиції культуральної рідини при 90°C протягом 15 хв після 8-ї години культивування, про що свідчить максимальне накопичення амінокислот у реакційному середовищі (1,8 мг/см³). Проведено оптимізацію процесу деградації пептидогліканів бактеріальних клітин, які піддавали лізису, ферментним препаратом панкреатином. Ефективність ферментолізу визначали за накопиченням імунотропних низькомолекулярних пептидів залежно від концентрації ферменту (C_E), субстрату (C_S) в реакційній суміші та тривалості процесу (τ). Встановлено, що раціональний режим ферментолізу, який забезпечує максимальне накопичення низькомолекулярних пептидів (0,569 мг/см³, досягається за наступних значень факторів: C_E=12,5 мг/см³, C_S=70,0 мг/см³, τ=245,6 хв. Зразок низькомолекулярних пептидів, отриманий за раціональних режимів деградації, досліджено методом ІЧ-спектроскопії. Встановлено, що у його ІЧ-спектрі присутні смуги поглинання, які відповідають коливанням аміногруп, пептидних зв'язків, піранозної форми глюкози, залишки якої входять до складу мурамової кислоти, та N-ацетилглюкозаміну пептидоглікану. Приведено загальну схему, що ілюструє послідовність процесів виробництва імунотропної дієтичної

добавки .У дослідях на щурах встановлено ефективну дозу отриманої дієтичної добавки $-0,06$ мг/кг маси тіла.

Ключові слова: дієтична добавка, пробіотичні культури, пептидоглікани, мурупептиди, автоліз, ферментоліз, панкреатин.

DIETARY IMMUNOTROPIC SUPPLEMENT BASED ON THE DESTRUCTION PRODUCTS OF PROBIOTIC BACTERIAL CULTURES

Kapustian A. I. PhD in Tech.Sci, Chernov N. K., Dr. in Tech.Sci
Odessa National Academy of Food Technologies, Odessa, Ukraine

Abstract. The possibility of obtaining an immunotropic dietary supplement based on low molecular weight degradation products of cell walls peptidoglycans of lactic and bifidobacteria composition has been considered. Rational regimes of autolysis of biomass as the primary stage of degradation of peptidoglycans of bacterial cell walls have been established. It was shown that the most intensive lysis of cells takes place when the culture liquid is treated at a temperature of $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the 8th hour of cultivation, as indicated by the maximum accumulation of amino acids in the reaction medium (1.8 mg/cm^3). Optimization of the destruction process of bacterial cell peptidoglycans exposed to lysis, by enzyme preparation with pancreatin, was carried out by the mathematical planning method of the multifactorial experiment. The effectiveness of enzymatic hydrolysis was determined by the accumulation of immunotropic low molecular weight peptides, depending on the concentration of the enzyme (C_E), the substrate (C_S) in the reaction mixture and the duration of the process (τ). The rational value of the factors C_E , C_S and τ that provide the maximum concentration of low molecular weight peptides (0.569 mg/cm^3) in the enzymatic hydrolysis are $C_E=12.5\text{ mg/cm}^3$, $C_S=70.0\text{ mg/cm}^3$, $\tau=245.6\text{ min}$. A sample of low molecular weight peptides obtained from rational degradation regimes was investigated using the IR spectroscopy method. It has been established that in its spectrum absorption bands corresponding to fluctuations of amino groups, peptide bonds are present, which, in fact, take place in the structure of peptides. Fluctuations of the pyranose glucose form, which is included in the muramic acid and N-acetylglucosamine of peptidoglycan, have also been observed. The general scheme of the sequence of production processes of an immunotropic dietary supplement has been given. In animal experiments, it has been established that this additive, in accordance with the classification of chemical substances to the degree of danger, belongs to class 4 (low-toxic substances). The effective dose of the obtained dietary supplement is 0.06 mg/kg body weight.

Key words: dietary supplement, probiotic cultures, peptidoglycans, muropeptides, autolysis, enzymatic hydrolysis, pancreatin.

Постановка проблеми та її зв'язок з найважливішими науковими і практичними завданнями. Реактивне збільшення випадків захворювання серед населення, викликаних бактеріальними та вірусними збудниками, провокується пригніченням функціональної активності імунної системи. На фармакологічному ринку України присутні ряд імунологічних препаратів природного, штучного або напівштучного походження. Найбільш поширеними серед природних є екстракти деяких лікарських рослин, пробіотики, інтерферон та його похідні. Імунологічною активністю володіють також продукти переробки дріжджів та пробіотичних бактерій, що містять відповідно такі біологічно-активні сполуки як глюкани та фрагменти пептидогліканів. Особливе значення надається низькомолекулярним продуктам деградації пептидогліканів – мурупептидам, оскільки вони здатні ініціювати та активізувати еволюційно закріплений механізм вродженої імунної відповіді [1-3]. Використання їх у складі дієтичних добавок та харчових інгредієнтів з метою нутритивної підтримки населення зі зниженим імунним статусом є вельми актуальним [4].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Мурупептиди – складові пептидогліканів бактеріальних клітин, які використовують переважно у складі імунотропних фармацевтичних препаратів («Бронхомунал», «Імудон», «ІРС-19», «Постерізан», «ГМДП», «Ліастен») [5-7], але у літературі відсутня інформація про використання їхніх аналогів у якості імунотропних харчових інгредієнтів та у складі дієтичних добавок. У першу чергу це пов'язано зі складністю процесу виділення мурупептидів, оскільки більшість методів їхнього отримання досить складні у виконанні, особливо у промислових масштабах. Вони є багато-стадійними, із застосуванням специфічних та високоактивних реактивів. Окрім того, напрацьовано методи дезінтеграції переважно патогенних мікроорганізмів, використання фрагментів яких у харчування може бути небезпечним. Перевагу доцільно віддавати пробіотичним культурам бактерій, оскільки вони визнані безпечними і мають «GRAS» статус (generally recognized as safe). До того ж, пробіотичні мікроорганізми в переважній більшості містять до 70% пептидоглікану, що є передумовою збільшення виходу мурупептидів у результаті деструкції клітинних стінок бактерій.

Серед існуючих методів дезінтеграції бактеріальних клітин, перевагу надають як правило ензиматичним та хімічним факторам впливу у поєднанні з обробкою ультразвуком. Так, в роботі [8] здійснювали гідроліз *Lactobacillus bulgaricus* послідовною обробкою пепсином, лізоцимом і ультразвуком. У праці [9]

отримано гідролізат молочнокислих бактерій штаму *L. acidophilus* У 2505 термокислотним методом. Описано також спосіб отримання препарату [10], що містить глікопептиди, який передбачає напрацювання біомаси клітин *L. bulgaricus* на спеціальних поживних середовищах, обробку біомаси трипсином, дезінтеграцію біомаси ультразвуком, повторну обробку біомаси трипсином і пепсином, центрифугування, гідроліз лізоцимом, хроматографію. У роботах [11,12] деградацію пептидогліканів мікроорганізмів здійснювали за допомогою високоспецифічних ендо- та екзопротеаз бактеріального походження, в тому числі мутанолізином.

Варто зазначити, що одним із шляхів зменшення стадійності процесу отримання імунотропних складових пептидогліканів клітинних стінок бактерій є проведення процесів автолізу [13-15], які при отриманні фрагментів пептидогліканів у наведених роботах не використовувались.

У даній роботі розглянуто можливість отримання імунотропних харчових інгредієнтів на основі продуктів деструкції клітинних стінок пробіотичних культур шляхом застосування процесу автолізу та ферментолізу. Завдяки автолітичним змінам бактеріальних клітин можна нівелювати необхідність первинної деструкції бактерій із залученням фізичних методів впливу, що значно скоротить кількість технологічних операцій, і, в результаті, собівартість дієтичної добавки. У роботі не передбачається застосування агресивних хімічних реагентів, яке є недопустимим у харчових технологіях.

Мета роботи – розроблення загальної схеми послідовності технологічних процесів для отримання дієтичної добавки імунотропної дії на основі продуктів ферментолізу пептидогліканів пробіотичних бактерій, визначення раціональних параметрів ключових процесів деструкції пептидогліканів – автолізу та ферментолізу, проведення медико-біологічних випробувань отриманої добавки у досліді на тваринах.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили на кафедрі харчової хімії та експертизи Одеської національної академії харчових технологій (Одеса, Україна), у науковій лабораторії НВП «Аріадна» (Одеса, Україна), лабораторії Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок (м. Львів, Україна).

У роботі використовували композицію молочнокислих та біфідобактерій (МКБ та ББ), що представляє собою суму тест-культур: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Streptococcus thermophilus* із колекції НВП «Аріадна». Дана бактеріальна композиція має комерційну назву «Бактеріальна закваска Симбінорм».

Ферментативну деградацію пептидогліканів клітинних стінок бактеріальної композиції здійснювали обробкою ферментним препаратом «Панкреатин» (Гернофарм, Тернопіль) з протеолітичною активністю 370 Од.

На першій стадії експерименту проводили вирощування першої генерації кожної з бактеріальних монокультур окремо на спеціальних живильних середовищах, розроблених підприємством «Аріадна». Бактеріальні штами вирощували в стерильних умовах при 37°C. Після досягнення чисельності бактерій $5-9 \cdot 10^9$ КУО, культуральні рідини поєднували, додавали живильне середовище та вирощували другу генерацію бактерій в стерильних умовах при 37°C. Автоліз біомаси досліджували починаючи з 4-ї год культивування протягом 10 год при експозиції культуральної рідини при 70 та 90°C протягом 15 хв. Хід автолізу контролювали за накопиченням амінокислот у реакційному середовищі. Вміст амінокислот визначали за допомогою формольного титрування [16].

Для проведення ферментолізу здійснювали виділення бактеріальних клітин із культуральної рідини шляхом центрифугування протягом 15 хв при 8000 хв^{-1} . Осад клітин відмивали дистильованою водою та ресуспендували. Ферментоліз проводили за температури 37°C та рН=7,4. Варіювали масову частку ферменту у межах 0,1 – 20 мг/см³, субстрату (клітин МКБ) у межах 10 – 70 мг/см³, та тривалість інкубації реакційної суміші – 10 – 300 хв.

Ферментоліз зупиняли екстремним нагріванням до температури 100 °C, суміш охолоджували, центрифугували протягом 10 хв при 8000 хв^{-1} , проводили декантацію. У надосадовій рідині контролювали вміст низькомолекулярних пептидів (НМП) методом Бенедикта [16] після осадження високомолекулярних білків 10 %-вим розчином три хлороцтової (ТХО) кислоти. Відомо, що пептиди з молекулярною масою до 1500 Да не осаджуються розчинами ТХО кислоти та можуть належати до сполук мурамилпептидного ряду, що володіють високою імунотропною активністю [9].

Із метою скорочення кількості дослідів і отримання достовірних даних про закономірності процесу ферментолізу композиції МКБ та ББ доцільно використовувати методи математичного планування багатofакторних експериментів. Для цього було реалізовано план повного трьохфакторного експерименту ПФЕ-2³.

Наведена на рис. 1 схема, наочно демонструє, що для визначення оптимальних параметрів деструкції пептидогліканів клітинних стінок молочнокислих бактерій з метою отримання низькомолекулярних пептидів, необхідно встановити вплив концентрації ферменту (C_E , мг/см³), концентрації субстрату (клітин молочнокислих бактерій, C_S , мг/см³) і тривалості процесу ферментативної деструкції (τ , хв).

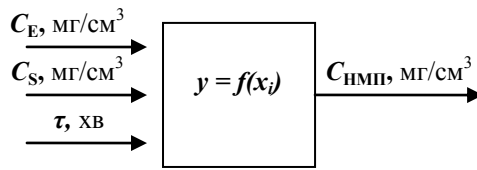


Рис. 1. Параметрична схема ферментативного гідролізу.

Таким чином, вихідним параметром є концентрація низькомолекулярних продуктів ферментативної деструкції клітинних стінок – пептидів у ферментолізаті ($C_{\text{НМП}}$, мг/см³). Рівні та інтервали варіювання факторів при ферментолізі наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Рівні та інтервали варіювання факторів при ферментолізі пептидогліканів лізату пробіотичних культур

Рівні та інтервали варіювання факторів	Фактори		
	C_E , мг/см ³	C_S , мг/см ³	τ , хв
Нижній рівень	0,1	10	10
Верхній рівень	20,0	70	360
Нульовий рівень	10,05	40	185
Інтервали	9,95	30	175

Однорідність результатів дослідів оцінювали за критерієм Кохрена, щоб виключити вплив систематичних помилок, викликаних зовнішніми умовами і зменшити випадкові помилки, досліди було рандомізовано [17].

ІЧ-спектри зразків реєстрували у діапазоні довжин хвиль від 4000 до 400 см⁻¹ на спектрометрі з фу-рє-перетворювачем FTIR IR Affinity-1, Shimadzu (Японія). Зразки для ІЧ-спектроскопії готували за допомогою йонообмінної хроматографії з використанням йонообмінника КУ-2. Для цього ферментолізат, отриманий за раціональних умов, обробляли 10 %-вим розчином ТХО, центрифугували протягом 10 хв при 8000 хв⁻¹, осад, що містив високомолекулярні сполуки, видаляли, а супернатант пропускали через йонообмінну колонку (H=30 см, D=1,8 см). Отриманий елюат містив амінокислоти, низькомолекулярні пептиди та був позбавлений від кислот, нейтральних вуглеводів та солей.

Результати дослідження та їхнє обговорення. Клітинні стінки мікроорганізмів, особливо грампозитивних, до яких і відносяться МКБ та ББ, володіють високою механічною міцністю, що створює значну перепону для їхньої дезінтеграції. Враховуючи здатність бактеріальних клітин до автолізу його було використано як первинний етап деструкції пептидогліканів їхніх клітинних стінок.

Для протікання процесів автолізу бактеріальну масу в процесі культивування піддавали температурній обробці. Хід автолітичних змін біомаси досліджували за накопиченням вільних амінокислот у культуральній рідині (рис. 2).

Встановлено, що найвищий вміст амінокислот, а, відповідно, і ступінь деградації композиції МКБ та ББ має місце при обробці культуральної рідини за температури 90°C після 8-ми годин культивування, що відповідало закінченню логарифмічної фази росту бактерій [18]. Це узгоджується з даними літератури про те, що наприкінці логарифмічної фази росту бактеріальні клітини є найбільш вразливими до дії агресивних факторів, що можуть порушити цілісність бактеріальної клітини шляхом руйнування їхньої захисної оболонки, або часткової перфорації бактеріальної стінки [19].

До того ж, проведення автолізу на цій стадії росту клітин дозволяє мінімізувати вміст бактеріальних нуклеїнових кислот у складі культуральної рідини, адже відомо, що наприкінці саме цієї фази росту їхній вміст мінімальний [19].

Автолітичні зміни біомаси не приводять до отримання низькомолекулярних муропептидів, тому для досягнення цієї мети, застосували ферментативний гідроліз пептидоглікану автолізату біомаси ферментним препаратом панкреатином.

У складі панкреатину міститься ряд екзо- та ендопротеаз, що здатні розщеплювати специфічні пептидні зв'язки високомолекулярного пептидоглікану клітинних стінок бактерій, утворюючи продукти його деградації: амінокислоти, низькомолекулярні муропептиди, що володіють потужним імунотропним ефектом.

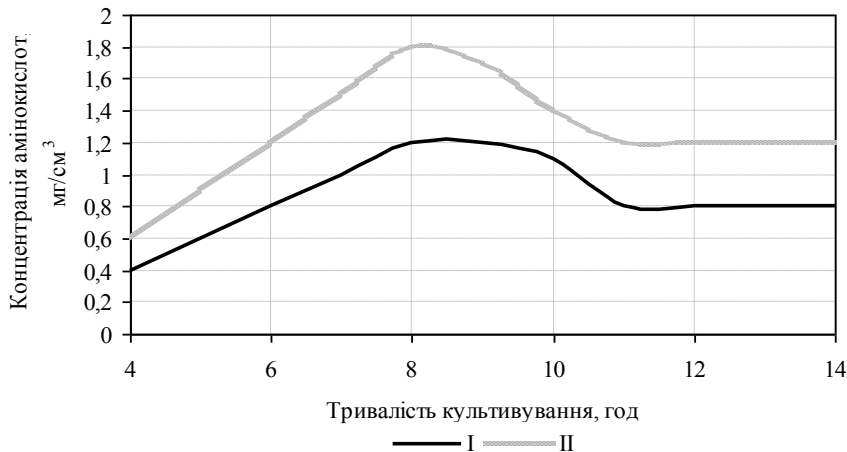


Рис. 2. Накопичення амінокислот при автолізі композиції МКБ та ББ в залежності від тривалості культивування та температурної обробки (I – 70°C, II – 90°C).

Для визначення раціональних умов ферментолізу з метою отримання максимальної кількості НМП проведено п'ятнадцять дослідів, умови яких наведено у табл. 2, де, крім матриці плану експериментів, наведено також середні (за трьома паралельними) значення результатів дослідів $C_{\text{НМП}}$ ($y_{\text{сеп}}$), розрахункові значення (y_p) за рівнянням регресії та відносні похибки (%) між ними.

Таблиця 2

Матриця плану дослідів і результати залежності вмісту НМП у ферментолізаті при різних умовах ферментативної деструкції

Номер дослідів	Умови дослідів			Результати		
	C_E , мг/см ³	C_S , мг/см ³	τ , хв	$y_{\text{сеп}}$, мг/см ³	y_p , мг/см ³	, %
1	0,1	10	10	0,019	0,018	3,83
2	20	10	10	0,092	0,089	3,40
3	0,1	70	10	0,085	0,085	0,32
4	20	70	10	0,159	0,156	1,97
5	0,1	10	360	0,095	0,092	2,66
6	20	10	360	0,163	0,163	0,04
7	0,1	70	360	0,372	0,369	0,68
8	20	70	360	0,439	0,440	0,24
9	0,1	40	185	0,341	0,347	1,62
10	20	40	185	0,412	0,417	1,24
11	10,05	10	185	0,371	0,368	0,69
12	10,05	70	185	0,545	0,540	0,83
13	10,05	40	10	0,153	0,160	4,39
14	10,05	40	360	0,335	0,339	1,17
15	10,05	40	185	0,458	0,454	0,77

Після реалізації дослідів методом найменших квадратів та послідовного регресійного аналізу, реалізованих у програмі PLAN [17], було отримане рівняння регресії у кодованих змінних, яке адекватно (за критерієм Фішера) описує залежність $C_{\text{НМП}}$ від факторів C_E , C_S та τ :

$$Y=0,454+0,0353x_1+0,086x_2+0,0896x_3-0,0726x_1^2-0,2051x_3^2+0,0525x_2x_3,$$

де x_1 , x_2 , x_3 – кодовані значення факторів відповідно C_E , C_S та τ , які визначаються за такими співвідношеннями: $x_1=(C_E-10,05)/9,95$; $x_2=(C_S-40)/30$; $x_3=(\tau-185)/175$.

Використовуючи отримане рівняння були визначені раціональні значення факторів C_E , C_S та τ , які забезпечують максимальну концентрацію низькомолекулярних пептидів $C_{\text{НМП}}$ у ферментолізаті: $C_E=12,5$ мг/см³, $C_S=70,0$ мг/см³, $\tau=245,6$ хв, $C_{\text{НМП}}=0,569$ мг/см³. Зразок НМП, отриманий за раціональних умов ферментолізу, вивчали за допомогою методу ІЧ-спектроскопії на предмет наявності у його структурі функціональних груп та специфічних зв'язків, притаманних імунотропним мурапептидам (рис.3). В ІЧ-спектрі НМП виявлено низку інтенсивних смуг поглинання, характерних для коливань специфічних функціональних груп та зв'язків, притаманним низькомолекулярним продуктам деградації пептидогліканів клітинних стінок бактерій. Так, в області спектру 3380–3450 см⁻¹ присутня широка смуга, яка свідчить про наявність вільних аміногруп. Смуга при 1642 см⁻¹ відповідає за коливання пептидних зв'язків, при 1155 см⁻¹ – піранозної форми глюкози, при 1013 см⁻¹ – β -глікозидного зв'язку [20].

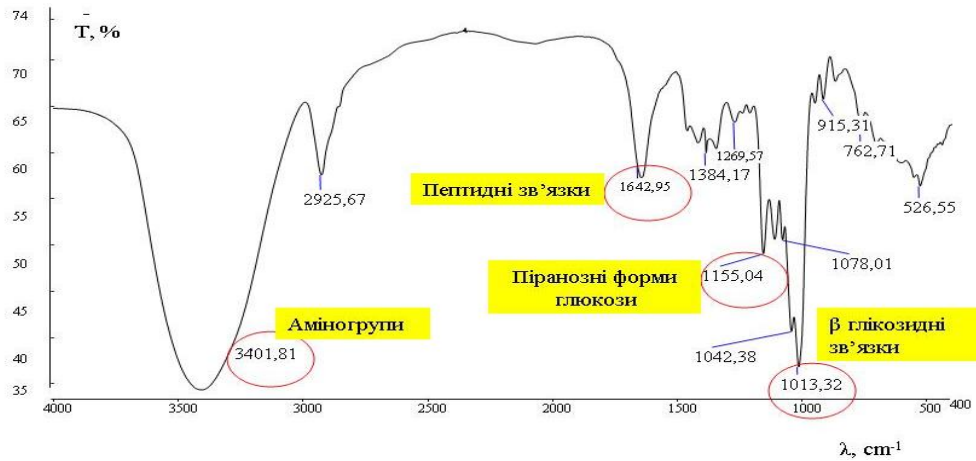


Рис. 3. ІЧ-спектр НМП ферментолізату.

Результати досліджень низькомолекулярних компонентів ферментолізату свідчать, що за визначених раціональних умов деструкції пептидогліканів композиції МКБ та ББ досягнуто головної мети – отримано продукти деструкції, які за своєю хімічною структурою та молекулярною масою відповідають муропептидам, що володіють потужним імунотропним ефектом. На рис. 4 представлено послідовність основних процесів виробництва дієтичної добавки на основі низькомолекулярних продуктів деградації пептидогліканів пробіотичних бактерій.

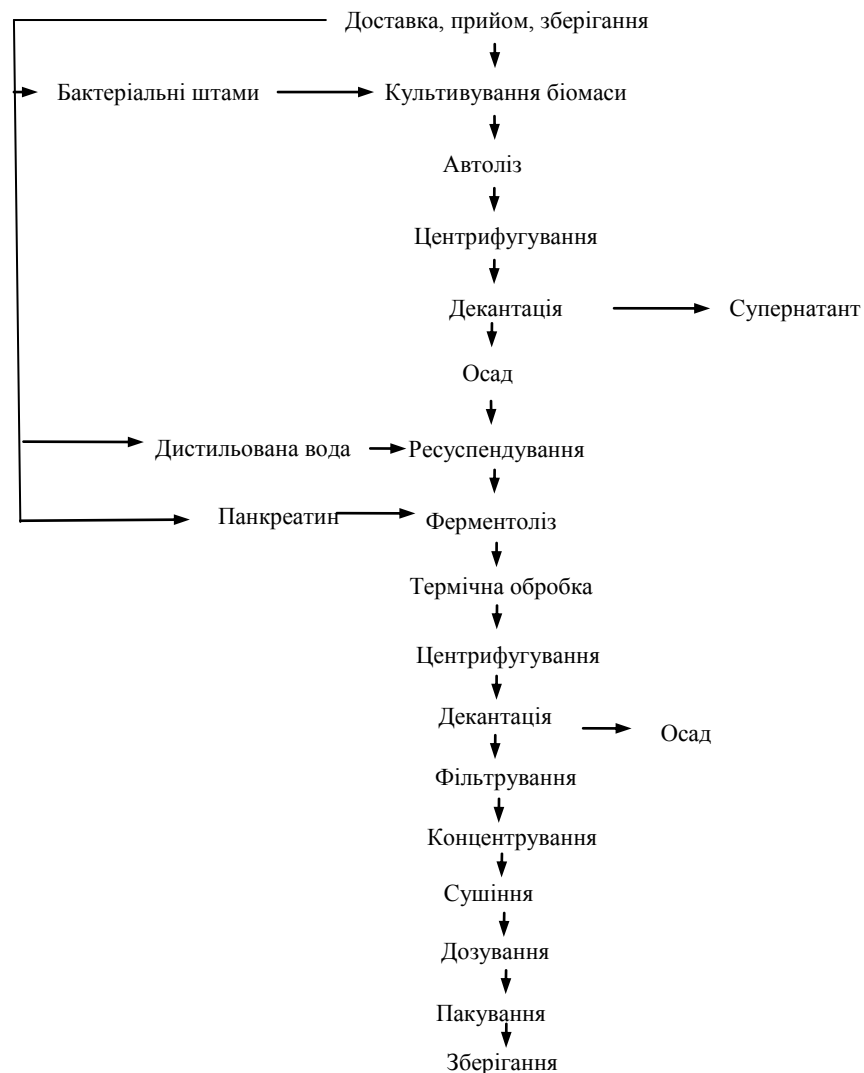


Рис. 4. Загальна схема виробництва дієтичної добавки імунотропної дії на основі продуктів деградації пептидогліканів клітинних стінок пробіотичних бактерій.

За розробленою схемою отримано дослідну партію дієтичної добавки для медико-біологічних досліджень, які проводили на білих безпорідних щурах віком 2–3 місяці, масою тіла 160–180 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію. Встановлено, що вона ефективно впливає на динаміку гематологічних, біохімічних та імунологічних показників, результатами гістологічних та морфологічних досліджень доведено збільшення імунологічної реактивності тимуса. Уведення у раціон шурів розробленої добавки сприяє зростанню кількості фагоцитів та їхньої поглинальної здатності. Відмічено зростання кількості γ -глобулінів у тварин, що вказувало на активацію білоксинтезувальної функції печінки [21].

Отже, отримані результати свідчать про доцільність здійснення подальших досліджень із розроблення технології дієтичної добавки на основі низькомолекулярних продуктів деградації пептидогліканів пробіотичних бактерій, здійснення її клінічної апробації та визначення шляхів її використання у харчових раціонах.

Висновки. У роботі визначено раціональні параметри ключових процесів деструкції пептидогліканів композиції МКБ та ББ – автолізу та ферментолізу. Результати ІЧ-спектроскопії довели, що у структурі продуктів ферментолізу (НМП), містяться специфічні функціональні групи та хімічні зв'язки, притаманні мурапептидам. Розроблено загальну схему послідовності технологічних процесів отримання дієтичної добавки імунотропної дії на основі продуктів деградації пептидогліканів клітинних стінок пробіотичних культур. У дослідях на тваринах визначено її ефективну дозу – 0,06 мг/кг маси тіла. Показано її позитивний вплив на динаміку гематологічних, біохімічних та імунологічних показників крові, білоксинтезувальну функцію печінки. Доцільно проведення подальших досліджень із розроблення технології дієтичної добавки на основі низькомолекулярних продуктів деградації пептидогліканів пробіотичних бактерій, здійснення її клінічної апробації та визначення шляхів використання у харчових раціонах.

Література:

1. Traub S. MDP and other muropeptides – direct and synergistic effects on the immune system. *J. Endotoxin Res.* 2006. V. 12(2).P. 69-85. DOI: [10.1179/096805106X89044](https://doi.org/10.1179/096805106X89044)
2. Matsui K., Ikeda R. Peptidoglycan in combination with muramyl dipeptide synergistically induces an interleukin-10-dependent T helper 2-dominant immune response // *Microbiol Immunol.* 2014. V. 58. P. 260-265. DOI: [10.1111/1348-0421.12139](https://doi.org/10.1111/1348-0421.12139)
3. Chernov N., Kapustyan A. Immunological properties of the bacterial origin compounds // *Food science and technology.* 2016.–10(3). P. 19-28. DOI: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v10i3.175>
4. Капустян А.И., Черно Н.К. Перспективы использования биологически активных бактериальных гидролизатов для нутритивной поддержки населения с расстройствами иммунной системы // *Пищевая наука и технология.* 2015. № 2(31). С. 18-25. DOI: [10.15673/2073-8684.31/2015.44263](https://doi.org/10.15673/2073-8684.31/2015.44263)
5. Ликопид (ГМПД) – современный отечественный высокоэффективный иммуномодулятор / Т. М. Андропова, Б. В. Пинегин, И. Г. Козлов. 4-е изд., доп. и перераб. М., 2008. –24 с.
6. Производные мурамилдипептида в клинике / А.В. Караулов и др. // *Актуальные вопросы клинической медицины.* 2002. Т. 2. С. 93-100.
7. The first ferrocene analogues of muramyl dipeptide / Lidija Barišić et al. // *Carbohydrate Research.* 2011. V. 346(5). P. 678-84 DOI: [10.1016/j.carres.2011.01.006](https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.006)
8. Гаврилин М.В., Сеньчукова Г.В., Сенченко С.П. Выбор оптимальных условий получения гидролизатов молочнокислых бактерий термостойким способом // *Хим.-фарм. журн.* 2007. Т. 41, № 2. С. 54-56.
9. Изучение состава препарата, полученного на основе гидролизата молочнокислых бактерий / Сенченко С.П. и др. // *Хим.-фармац. журн.* Т.39. №3. 2005. С. 51-53
10. Гаранян Г.С., Ханферян Р.А., Оганесян Э.Т. Химическое обоснование и биологическое исследование гидролизата на основе культур молочнокислых бактерий // *Хим.-фармац. журн.* Т.44. №8. 2010. С. 46-49.
11. Ku' hner, D., Stahl, M., Demircioglu, D.D., Bertsche, U. From cells to muropeptide structures in 24 h: Peptidoglycan mapping by UPLC-MS. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 74-94. DOI: [10.1038/srep07494](https://doi.org/10.1038/srep07494)
12. Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase Complement of *Lactobacillus casei* and Characterization of the Major c-D-Glutamyl-L-Lysyl-Endopeptidase / Regulski K. // *PLoS ONE.* 2012. V. 7(2). e32301. DOI: [10.1371/journal.pone.0032301](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032301)
13. Requirement of Autolytic Activity for Bacteriocin-Induced Lysis / Martinez-Cuesta M.-C. et al. // *Applied and environmental microbiology.* 2000. Aug. P. 3174-3179 DOI: [10.1128/AEM.66.8.3174-3179.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3174-3179.2000)
14. Simova E., Beshkova D. Effect of growth phase and growth medium on peptidase activities of starter lactic acid bacteria // *Le Lait, INRA Editions.* 2007. V. 87 (6). P. 555-573. DOI: [10.1051/laite:2007036](https://doi.org/10.1051/laite:2007036)
15. Regulski K, Courtin P, Meyrand M, Claes IJJ, Lebeer S, et al. (2012) Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase Complement of *Lactobacillus casei* and Characterization of the Major c-D-Glutamyl-L-Lysyl-Endopeptidase. *PLoS ONE* 7(2): e32301. doi: [10.1371/journal.pone.0032301](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032301)
16. Биохимия белков: практикум для студентов биол. Фак. спец. 1-31 01 01 «Биология» / И. В. Семак, Т. Н. Зырянова, О. И. Губич. Минск: БГУ, 2007. 49 с.
17. Математическое моделирование процессов пищевых производств: Сб. задач: Уч. пособие / Н.В. Остапчук, В.Д. Каминский, Г.Н. Станкевич, В.П. Чучуй. К.: Вища школа, 1992. – 175 с.
18. Kapustian A., Chernov N. Obtaining and characteristic of the autolysate of lactic acid bacteria // *EUREKA: Life Sciences.* 2018. V.1. P. 24-31. DOI: [10.21303/2504-5695.2018.00558](https://doi.org/10.21303/2504-5695.2018.00558)
19. Wood B.J., Warner P. J. *Genetics of Lactic Acid Bacteria.* 2012.
20. ИК-спектры основных классов органических соединений / Б.Н. Тарасевич. М., 2012. 54 с.
21. Кушнір В.І. Фармако-токсикологічна характеристика імуностимулюючого препарату на основі пептидогліканів: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.04: захист 25.05.2018 / наук. кер. Брезвин О. М. Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2017. 172 с.

References:

1. Traub, S. (2006). MDP and other muropeptides – direct and synergistic effects on the immune system. *J. Endotoxin Res.* 12(2), 69-85. DOI: [10.1179/096805106X89044](https://doi.org/10.1179/096805106X89044)
2. Matsui, K., Ikeda R. (2014). Peptidoglycan in combination with muramyl dipeptide synergistically induces an interleukin-10-dependent T helper 2-dominant immune response. *Microbiol Immunol.* 58, 260-265. DOI: [10.1111/1348-0421.12139](https://doi.org/10.1111/1348-0421.12139)

3. Chernov, N., Kapustyan, A. (2016). Immunological properties of the bacterial origin compounds. *Food science and technology*. 10(3), 19-28. DOI: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v10i3.175>
4. Kapustyan, A. I. Chernov, N. K. (2015). Perspektivy ispol'zovaniya biologicheskii aktivnykh bakterial'nykh gidrolizatorov dlya nutritivnoy podderzhki naseleniya s rastrojstvami immunnogo sistema. *Pishchevaya nauka i tekhnologiya*. 2(31), 18-25. DOI: 10.15673/2073-8684.31/2015.44263.
5. Andronova, T.M., Pinegin, B.V., Kozlov, I.G. (2008). Likopid (GMPD) – sovremennyyi otechestvennyy vyisokoeffektivnyy immunomodulyator. 4-e izd., dop. i pererab. M. 24.
6. Karaulov, A.V. (2002). Proizvodnyie muramildipeptida v klinike. *Aktualnyie voprosy klinicheskoy meditsiny*. 2, 93-100.
7. Lidija Barišić et al. (2011). The first ferrocene analogues of muramyl dipeptide. *Carbohydrate Research*. 346(5), 678-84. DOI: 10.1016/j.carres.2011.01.006
8. Gavrilin, M.V., Sen'chukova, G.V., Senchenko, S.P. (2007). Vybora optimal'nykh uslovii polucheniya gidrolizatorov molochnokislykh bakterii termokislonym sposobom. *Him.-farm. Zhurn.*, 41, 2, 54-56.
9. Senchenko, S.P. Samoilov, V.A., Gostisheva, N.M., Sen'chukova, G.V., Gavrilin M.V. (2005). Izuchenie sostava preparata, poluchennogo na osnove gidrolizata molochnokislykh bakterii. *Him.-farmac. Zhurn.*, 39, 3, 51-55.
10. Garanyan, G.S. Hanferyan, R.A., Oganessian, E.T. (2010). Himicheskoe obosnovanii i biologicheskoe issledovanie gidrolizata na osnove kul'tur molochnokislykh bakterii. *Him.-farmac. Zhurn.*, 44, 8, 46-49.
11. Ku'fner, D., Stahl, M., Demircioglu, D.D., Bertsche, U. (2014). From cells to muropeptide structures in 24 h: Peptidoglycan mapping by UPLC-MS. *Sci. Rep.* 4, 74-94. DOI:10.1038/srep07494
12. Regulski, K. (2012). Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase Complement of *Lactobacillus casei* and Characterization of the Major c-D-Glutamyl-L-Lysyl-Endopeptidase. *PLoS ONE*. 7(2). e32301. DOI:10.1371/journal.pone.0032301
13. Martinez-Cuesta, M.-C. et al. (2000). Requirement of Autolytic Activity for Bacteriocin-Induced Lysis. *Applied and environmental microbiology*. Aug. 3174-3179 DOI: 10.1128/AEM.66.8.3174-3179.2000
14. Simova, E., Beshkova, D. (2007). Effect of growth phase and growth medium on peptidase activities of starter lactic acid bacteria. *Le Lait, INRA Editions*. 87 (6), 555-573. DOI: 10.1051/laite:2007036
15. Regulski, K., Courtin, P., Meyrand, M., Claes, I.J., Lebeer, S. et al. (2012) Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase Complement of *Lactobacillus casei* and Characterization of the Major c-D-Glutamyl-L-Lysyl-Endopeptidase. *PLoS ONE*. 7(2): e32301. doi:10.1371/journal.pone.0032301
16. Semak, I.V., Zyryanova, T.N., Gubich, O.I. (2007). Biohimiya belkov: praktikum dlya studentov biol. Fak. spets. 1-31 01 01 «Biologiya», Minsk: BGU, 49.
17. Ostapchuk, N.V., Kaminskiy, V.D., Stankevich, G.N., Chuchuy, V.P. (1992). Matematicheskoe modelirovanie protsessov pischevykh proizvodstv: Sb. zadach: Uch. Posobie. K.: Vischa shkola, 175 s.
18. Kapustian A., Chernov, N. (2018). Obtaining and characteristic of the autolysate of lactic acid bacteria. *EUREKA: Life Sciences*. 1, 24-31. DOI: 10.21303/2504-5695.2018.00558
19. Wood, B.J., Warner, P.J. (2012). Genetics of Lactic Acid Bacteria.
20. Tarasevich, B.N. (2012). IR-spektryi osnovnykh klassov organicheskikh soedineniy. Moskva, 54.
21. Kushnir, V.I. (2017). Farmako-toksy'kologichna karakterystyka imunostymulyuyuchogo preparatu na osnovi pepty'doglikaniv: d's. ... kand. vet. nauk: 16.00.04: zaxyst 25.05.2018 / nauk. ker. Brezvyin O. M. Lviv: L'vivs'kyj nacional'nyj universytet vetryn'noyi medy'cy'ny' ta bioteknologij imeni S.Z. G'zhy'cz kogo, 172 .

Отримано в редакцію 25.05.2018
Прийнято до друку 30.06.2018

Received 25.05.2018
Approved 30.06.2018