

УДК 637.136.3:579.234.016:577.152

Наталья Черно, Антонина Капустян, Анастасия Черная

Одесская национальная академия пищевых технологий, Украина

**ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ  
КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК ПОЛИВИДОВОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ  
ЗАКВАСКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ СПОСОБОМ**

**Nataliya Cherny, Antonina Kapustyan, Anastasia Chernaya**

**THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS OBTAINING  
FROM CELL WALLS OF POLYSPECIFIC BACTERIAL  
STARTER BY ENZYMATIC METHOD**

Роль молочнокислых бактерий в питании значительна и разнообразна. Их использование в качестве компонентов пробиотических диетических добавок позволяет восстановить здоровый пищеварительный процесс и стабилизировать состояние иммунной системы. За иммуностропные свойства молочнокислых бактерий отвечают минимальные структурные фрагменты пептидогликанов клеточных стенок – мурамилдипептиды (МДП).

Использование целых микробных клеток в качестве пробиотиков и иммуностропных агентов часто является малоэффективным, поскольку они подвергаются агрессивному воздействию сред пищеварительного тракта. Расщепление мембран клеточных стенок молочнокислых бактерий в процессе пищеварения является непредсказуемым и хаотичным, что не позволяет получить регулярные продукты деградации пептидогликанов из целых микробных клеток – МДП и его производных.

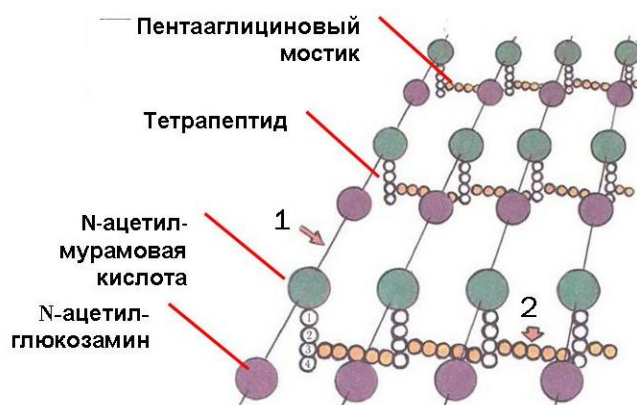
МДП распознается внутриклеточными Nod 2 подобными рецепторами организма хозяина и инициирует сигнальный каскад реакций, приводящий к синтезу иммунокомпетентными клетками провоспалительных цитокинов и активации механизмов иммунологической защиты организма.

Мурамилпептиды постоянно попадают в организм животных и человека в результате деградации клеточных стенок бактерий и содержатся во многих тканях в малых концентрациях оказывая различные нейро- и иммунорегуляторные эффекты. Экзогенное введение производных МДП воспроизводит физиологические и эволюционно закрепленные механизмы модуляции иммунного ответа.

Использование препаратов из целых бактерий для стимуляции фагоцитарного иммунитета малоэффективно. Это связано с тем, что при вторичных иммунодефицитах функциональная активность макрофагов понижена и, следовательно, понижена способность расщеплять пептидогликаны бактерий с образованием иммуностропных веществ мурамилпептидного ряда. В связи с этим актуально использование фрагментов клеточных стенок бактерий – пептидов с молекулярной массой 1000 – 1500 Да, обладающих иммуностропной активностью.

Для получения таких препаратов использовали в качестве субстрата поливидовую закваску молочнокислых бактерий, представляющей собой сумму тест культур *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus cremoris*, *Streptococcus thermophilus*.

Фрагментацию поливидовой закваски осуществляли посредством ферментативного гидролиза. В качестве гидролизующих агентов применяли лизоцим активностью 46000 Ед и панкреати с протеолитической активностью 370 Ед.



**Рис. 2. Схематическое изображение ферментативного гидролиза пептидогликанов:**

1 – направление действия лизоцима; 2 – направление действия протеаз

Постоянными параметрами гидролиза были температура (36 – 37 °С) и pH среды (7,0 – 8,0). Эффективность гидролиза оценивали по накоплению в ферментализате низкомолекулярных продуктов – аминокислот и низкомолекулярных пептидов (НМП) с  $MM < 1500$  Да.

Аминокислоты определяли методом формольного титрования, пептиды – спектрофотометрически с реактивом Бенедикта после осаждения высокомолекулярных белков 5 % раствором трихлоруксусной кислоты. На начальном этапе исследований изучали влияние предварительной тепловой обработки БМ на выход НМП при инкубации биомассы с панкреатином в течение 24 час (при соотношении фермент : субстрат 1:100).

Установлено, что максимальное содержание НМП в ферментализате с применением предварительного нагревания до 100 °С и без него достигается после 2 часов гидролиза. Содержание НМП в ферментализате с применением предварительного нагревания составляет 1,2 г/100 мл, что на 9 % выше, чем содержание НМП в ферментализате без применением предварительного нагревания.

Исследована зависимость накопления НМП в ферментализате от концентрации панкреатина, которую варьировали в интервале 0,5 – 14 мг/мл. Максимальное количество НМП в ферментализате 0,96 г/100 мл достигается при концентрации фермента 5 – 10 мг/мл.

Для изучения эффективности гидролиза использовали также композицию гидролаз панкреатин-лизоцим. Установлено, что использование лизоцима совместно с панкреатином значительно интенсифицирует процесс гидролиза. Так, максимальное накопление НМП в ферментализате с использованием композиции ферментов достигается через 1 час инкубации и составляет 0,92 г/100 мл, с использованием только панкреатина – через 2 часа и составляет 0,71 г/100 мл, что на 23 % ниже.

Таким образом, использование ферментативного гидролиза поливидовой закваски молочнокислых бактерий позволяет получить целевые низкомолекулярные продукты – аминокислоты, пептиды. Рациональными условиями проведения гидролиза является длительность инкубации фермента с субстратом в течении 2 – 3 часов при концентрации панкреатина 5 – 10 мг/мл. Более эффективной является обработка молочнокислых бактерий ферментной композицией трипсин-лизоцим, которая приводит к более высокому накоплению низкомолекулярных продуктов, обладающих иммуностропной активностью.

Первый катализирует разрыв пептидных связей, которые соединяют остатки мурамовой кислоты в составе пептидогликанов клеточных стенок, второй – катализирует разрыв  $\beta$ -(1→4) гликозидных связей между N-ацетилглюкозаминами и N-ацетилмурамовой кислотой.

Для определения рациональных условий ферментативного гидролиза биомассы (БМ) установлена зависимость накопления низкомолекулярных продуктов гидролиза от его продолжительности, природы и от концентрации ферментов в реакционной смеси.