

В. А. Самойлов<sup>1</sup>, Н. М. Гостищева<sup>1</sup>, Г. В. Сеньчукова<sup>2</sup>,  
М. В. Гаврилин<sup>2</sup>, С. П. Сенченко<sup>2</sup>

## ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ПРЕПАРАТА, ПОЛУЧЕННОГО НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

<sup>1</sup> ФГУП НИИ комплексной переработки молочного сырья, Ставрополь;

<sup>2</sup> Пятигорская государственная фармацевтическая академия

Проведено сравнительное изучение содержания углеводов, молочной кислоты, натрия лактата и аминокислот в гидролизатах молочнокислых бактерий, полученных разными способами. Для анализа использовали методы алкалометрии, тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Установлено, что гидролизат, полученный термокислотным способом при pH 0,2, содержит наибольшее количество кислоты молочной и натрия лактата, восстанавливающих сахаров в пересчёте на лактозу и суммы аминокислот в пересчёте на глюкозамин.

Изменение качественного или количественного состава кишечной микрофлоры, сопровождающееся селекцией штаммов с более патогенными свойствами, с последующим развитием метаболических и иммунологических нарушений с возможным развитием желудочно-кишечных расстройств определяет этиологию дисбактериозов, а также вторичных воспалительных процессов, в том числе и аутоиммунных [1].

Для лечения дисбактериозов фирмой Меркле ГмбХ, Блаубойрен (Германия) выпускаются капли Хилак форте, представляющие собой лекарственный препарат, полученный на основе стерильного концентрата продуктов обмена веществ лактобактерий и других симбионтов тонкого и толстого кишечника. Данный препарат также находит применения в качестве иммуномодулятора. В России аналогов данного препарата не существует. В связи с этим целью настоящей работы была разработка отечественного препарата, соответствующего прототипу по своему составу. Для этого была использована технология, предусматривающая гидролиз молочнокислых бактерий, так как при этом из клеток микроорганизмов выделяются или образуются также и те вещества, что и в результате их нормальной жизнедеятельности [2].

### Экспериментальная часть

Для реализации поставленной цели в ФГУП «НИИ комплексной переработки молочного сырья» были получены различными способами гидролизаты молочнокислых бактерий, штамма *Lactobacillus acidophilus* В 2505 (зарегистрирован 09.04.01 ВКПМ, депозитор ФГУП НИИКИМ).

Гидролизат № 1 был получен термокислотным способом при pH 1,5; гидролизат № 2 — путем автолиза бактериальной массы с последующим термокислотным гидролизом.

Все гидролизаты серии 3 получали по типу солянокислого гидролизата казеина. При этом гидролизат № 3 получали при стерилизации в течение 10 мин, 3а — 20 мин; 3б — 15 мин (при культивировании среда обогащалась лактозой) и 3в (при культивировании

среда обогащалась молочной сывороткой) — 15 мин. Гидролизат № 4 представляет собой продукт автолиза бактерий.

Для изучения углеводного состава гидролизатов использовали систему растворителей пропанол – кислота уксусная ледяная – вода (9:6:1) с последующим детектированием зон адсорбции при помощи смеси растворов резорцина в спирте (20 г/л) и кислоты серной (200 г/л) [3]. Данной смесью обрабатывались пластинки после хроматографирования, а затем нагревались при 80 °С в течение 15 мин. При этом зоны адсорбции углеводов визуализировались в виде пятен розового цвета. В качестве свидетелей были использованы лактоза, арабиноза, мальтоза, галактоза, рамноза и фруктоза.

В ходе проведения экспериментов установлено наличие во всех образцах лактозы (преимущественно), галактозы и следов глюкозы.

Этим же методом, с использованием в качестве детектирующего реагента раствора фенолового красного, проведено изучение состава органических кислот. При этом установлено, что все исследованные образцы и препарат сравнения содержат кислоту молочную.

Оценку качества имеющихся образцов проводили по отдельным показателям действующей НД 42-8608-98 на Хилак форте капли 30 мл (Меркле ГмбХ, Блаубойрен, Германия): описание, pH, количественное определение (молочной кислоты, лактозы). Дополнительно были проведены испытания по определению сухого остатка, количественного содержания молочной кислоты в свободном состоянии и натриевой соли, а также по установлению количества аминокислот. Все полученные результаты были статистически обработаны ( $n = 6$ ,  $P = 95\%$ ) и приведены в таблице.

Для определения содержания свободной молочной кислоты использовали метод прямой нейтрализации (титрант 0,1 М раствор натрия гидроксида).

Так как при получении гидролизатов одной из стадий является нейтрализация раствором натрия гидроксида до pH 3,0 – 4,0 (для гидролизатов № 1 и 2 — до 5,0 – 6,0), то возможно образование натриевой соли

Результаты анализа гидролизатов молочнокислых бактерий № 1 – 4 и капль Хилак форте (n = 6)

Показатель	Требования НД	Капли Хилак форте	Гидролизат						
			№ 1	№ 2	№ 3	3а	3б	3в	№ 4
Описание	прозрачный коричнево-желтый раствор со слабым запахом молочной кислоты	прозрачный коричнево-желтый раствор со слабым запахом молочной кислоты	прозрачный светло-желтый раствор со слабым запахом молочной кислоты	мутный светло-желтый раствор почти без запаха, сильно пенящийся	прозрачный коричнево-желтый раствор со слабым специфическим запахом молочной кислоты	прозрачный коричнево-желтый раствор со слабым специфическим запахом молочной кислоты	прозрачный коричнево-желтый раствор со слабым специфическим запахом молочной кислоты	прозрачный коричнево-желтый раствор со слабым специфическим запахом молочной кислоты	прозрачный темно-коричневый раствор со слабым специфическим запахом молочной кислоты
рН	3,0 – 3,4	3,23	6,18	5,46	5,11	3,01	3,76	3,47	3,44
Сухой остаток	–	13,22 ± 0,14	3,65 ± 0,027	2,36 ± 0,02	10,91 ± 0,31	12,06 ± 0,11	12,64 ± 0,13	10,27 ± 0,11	9,30 ± 0,08
Молочная кислота, %	5,6 – 9,3	7,62 ± 0,21	0,09 ± 0,009	0,12 ± 0,005	2,15 ± 0,02	0,96 ± 0,05	3,14 ± 0,04	3,94 ± 0,09	1,69 ± 0,06
Натриевая соль молочной кислоты, %	–	4,09 ± 0,12	3,51 ± 0,14	1,77 ± 0,08	10,61 ± 0,02	4,30 ± 0,044	10,59 ± 0,05	10,41 ± 0,06	1,73 ± 0,008
Восстанавливающие вещества в пересчете на лактозу, мг/мл	не менее 50	66,67 ± 1,52	13,3 ± 0,32	16,1 ± 0,22	57,7 ± 1,74	111,7 ± 2,89	75,3 ± 1,38	48,1 ± 1,12	64,56 ± 1,75
Аминосакхар, мг/мл	–	0,097 ± 0,008	0,043 ± 0,003	0,043 ± 0,004	0,28 ± 0,014	0,162 ± 0,051	0,192 ± 0,011	0,164 ± 0,081	0,234 ± 0,0132

молочной кислоты. Содержание натрия лактата устанавливали методом ионообменной хроматографии на катионите КУ-2-8 с последующей нейтрализацией. Параллельно методом меркуриметрии определяли содержание натрия хлорида. Полученный объем титранта вычитали из объема натрия гидроксида, пошедший на титрование элюата, после промывки ионообменной колонки.

Установлено, что содержание кислоты молочной в свободном виде и в виде соединений в каплях Хилак форте выше в 2 – 7 раз, чем в изучаемых гидролизатах. Однако следует отметить, что в Хилак форте, согласно нормативной документации, молочная кислота вносится дополнительно. Гидролизаты № 3, 3б и 3в по содержанию натриевых солей молочной кислоты значительно превосходят прототип, что, вероятно, объясняется способом их получения.

В связи с тем, что лактоза является субстратом, используемым молочнокислыми бактериями в процессе метаболизма [3], представлялось необходимым определение ее содержания в гидролизатах.

Количественное содержание лактозы в изучаемых объектах определяли методом обратной йодиметрии. Гидролизаты № 3, 3а, 3б, 3в и 4 по содержанию восстанавливающих сахаров в пересчете на лактозу сопоставимы с прототипом. При этом установлено, что добавление молочной сыворотки или лактозы принципиально не приводит к увеличению ее накопления.

Как следует из представленных данных, гидролизаты 1 и 2 имеют достаточно высокие значения рН, что объясняется проведением стадии нейтрализации при получении конечного продукта [4].

Иммуностимулирующий эффект препаратам на основе гидролизатов микроорганизмов придают основные компоненты их клеточных стенок — пептидогликаны [5], содержащиеся в своем составе аminosа-

хара N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота. Для их обнаружения была использована специфическая реакция Эльсона-Моргана на аminosахара [6], подтверждающая их присутствие во всех гидролизатах и каплях Хилак форте. Методом спектрофотометрии установлено, что содержание аminosахаров в каплях Хилак форте меньше в 1,5 – 2,5 раза, чем в гидролизатах № 3, 3а, 3б, 3в и 4.

Из данных таблицы следует, что гидролизаты № 1 и № 2 идентичны по своему качественному и количественному анализу. Капли Хилак форте являются более концентрированными по сравнению с гидролизатами № 1 и № 2. Гидролизаты 3, 3б и 3в по своему составу наиболее близки к прототипу, но превосходят его по содержанию аminosахаров.

Таким образом, проведенные исследования показывают сходство химического состава препарата Хилак форте и полученных гидролизатов и открывают возможность разработки отечественного препарата для лечения дисбактериозов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника* (ОСТ 91500.11.0004-2003) (приложение).
2. Л. Я. Телишевская, *Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение*, журнал “Аграрная наука”, Москва (2000).
3. Е. В. Компанцева, М. В. Гаврилин, С. А. Кудрин, *Химическая промышленность и промышленность по производству минеральных удобрений. Науч. тех. реф. сборник*, Вып. 5, 27 – 28 (1990).
4. И. Н. Виноградова, *Производственные питательные среды*, Т. 1, Медгиз, Москва (1962), сс. 339 – 375.
5. Т. Андропова, Б. Пинегин, *Мурамилдипептиды — иммунотропные лекарственные средства нового поколения*, Медицинская картотека, № 3, 1 – 5 (1999).
6. А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смиidt, *Основы биохимии*, Т. 1, Мир, Москва (1981).

Поступила 15.05.03.

## THE INVESTIGATION OF THE COMPOSITION OF THE PREPARATION BASED ON THE HYDROLYSATES OF THE LACTOACIDS OF THE BACTERIA

V. A. Samoylov<sup>1</sup>, N. M. Gostischeva<sup>1</sup>, G. V. Sen'chukova<sup>2</sup>, M. V. Gavrilin<sup>2</sup>, S. P. Senchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy

<sup>2</sup> Research Institute of Complex Use of Dairy Row Material, Stavropol'

The comparative study of the contents of carbohydrates, lactic acid, sodium lactate and aminoacids in hydrolysates of the lactoacids bacteria received by different ways was carried out. For the analysis were used methods of the alcalimetry, thin-layer chromatography and spectrophotometry. It was established that hydrolysate received thermoacids way at pH 0,2, contained the greatest amount of the an lactic acid and sodium lactate, restoring sugars in recalculation on lactose and sum aminoacids in recalculation on glucosamine.