

М. В. Гаврилин¹, Г. В. Сеньчукова¹, С. П. Сенченко¹, В. А. Самойлов²,
Н. А. Гостищева²

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИЗАТОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ТЕРМОКИСЛОТНЫМ СПОСОБОМ

¹ Пятигорская государственная фармацевтическая академия;

² НИИ комплексного использования молочного сырья, Ставрополь

С целью разработки лекарственного препарата, обладающего иммуномодулирующим действием, проведено изучение влияния условий термокислотного гидролиза молочнокислых бактерий. В качестве параметров процесса гидролиза были выбраны температура, время и pH среды. Критериями оптимизации служили содержание общего и аминокислотного азота, белков, пептидов и аминокислот. На основании полученных данных были рассчитаны коэффициенты гидролиза и протеолиза. Анализ полученных данных позволил выбрать для дальнейшего изучения гидролизаты, содержащие около 2 % пептидов и 0,02 – 0,03 % аминокислот.

В настоящее время в качестве перспективных фармакологически активных средств можно рассматривать белковые гидролизаты. Для их получения используют различные методы: термокислотный, аутолиз, двухстадийный (аутолиз + термокислотный), кратковременной и длительной стерилизации, ферментативный. Однако все методики, даже в рамках одного способа получения, сильно отличаются между собой. Предлагается использовать различные соотношения белковой массы с водой, кислотой или ферментом; резко отличающиеся по продолжительности, температуре и pH условия проведения гидролиза; разнообразные способы очистки полученных гидролизатов от балластных соединений.

Целью настоящей работы является поиск оптимальных условий получения гидролизатов на основе белковых субстратов. Исследования проводили на примере термокислотного способа. В качестве субстрата использовали бактериальную массу молочнокислых бактерий штамма *Lactobacillus acidophilus* В 2505 (бактериальная масса предоставлена ФГУП “НИИ комплексного использования молочного сырья”, Ставрополь).

В качестве критериев оптимизации было выбрано содержание белка, пептидов, общего и аминокислотного азота. Основными факторами, определяющими процесс гидролиза, являются — pH реакционной массы, температура и время. При этом все факторы должны оптимально влиять на выход продуктов реакции и эффективность гидролиза.

При проведении исследований был использован метод математического планирования эксперимента по плану Плакетта-Бермана [1]. Эти исследования являются необходимыми для создания гидролизного препарата, содержащего максимальное количество структурного фрагмента пептидогликанов бактериальной стенки — глюкозаминилмурамилдипептида. По своей структуре это соединение представляет собой дипептид (L-аланин-D-изоглютамин), соединенный с двумя сахарными остатками (N-глюкозамин-N-ацетилмурамил). Это вещество является абсолютным агонистом образующих рецепторов патогенных бактерий, а его применение приводит к сильной активации врожденной и адаптивной иммунной системы [3, 4].

Экспериментальная часть

В полученных продуктах количественное содержание общего азота определяли спектрофотометрически по реакции с реактивом Несслера после минерализации кислотой серной концентрированной. Содержание аминокислотного азота определяли тем же методом, но после предварительного осаждения всех белков и пептидов раствором кислоты кремневольфрамовой (50 мг/мл).

Количество пептидов с молекулярной массой 700 – 1500 D определяли с помощью биуретовой реакции спектрофотометрически после осаждения тяжелых белков и пептидов раствором кислоты трихлоруксусной (200 мг/мл). В [2] приводится информация о том, что именно данная фракция пептидов (молек. масса 700 – 1500) оказывает биологическое действие на макро- и микроорганизмы (ускоряет рост, стимулирует иммунитет, повышает резистентность к радиационному облучению и др.).

Общее содержание белков в гидролизатах находили тем же методом, но без предварительного добавления раствора кислоты трихлоруксусной.

Количество аминокислот, входящих в состав пептидогликанов бактерий и также обуславливающих иммуностимулирующее действие гидролизатов, устанавливали спектрофотометрически по реакции Эльсона-Моргана, в пересчете на глюкозамин.

В ходе эксперимента были получены 5 различных гидролизатов при одинаковых соотношениях бактериальной массы и воды, процедурах очистки гидролизатов и изменяющихся условиях (pH, температура и время гидролиза). Малую продолжительность обработки (максимум — 5 ч) компенсировали тем, что гидролиз проводили под давлением в автоклаве.

При получении каждого из 5 гидролизатов к бактериальной массе с влажностью около 50 % прибавляли воду очищенную (1:1) и кислоту хлороводородную концентрированную до получения значения pH, согласно выbranному плану эксперимента и гидролизовали в автоклаве (табл. 1).

Условия для получения гидролизатов молочнокислых бактерий термокислотным способом

Номер гидролизата	pH	Температура, °С	Давление, ати	Время гидролиза, ч
1	3,0	100	0,1	5
2	4,0	100	0,1	1
3	3,0	120	1,1	1
4	4,0	120	1,1	5
5	3,5	110	0,5	3

Полученные гидролизаты охлаждали до комнатной температуры, фильтровали, разливали во флаконы и стерилизовали в автоклаве при 120 °С в течение 10 мин.

Определение общего азота. Навеску гидролизата предварительно гидролизали по микрометоду Кьельдаля. Для этого 1 мл гидролизата помещали в коническую колбу, затем осторожно прибавляли 0,25 г растертой смеси калия сульфата, меди сульфата, взятых в соотношении 20:5, и 2 мл кислоты серной концентрированной. Минерализацию проводили, нагревая колбу на горелке, до получения прозрачного раствора. После этого продолжали нагревание еще в течение 30 мин. В конце минерализации прибавляли 1–2 капли пергидроля и продолжали нагревание ещё в течение 10 мин до обесцвечивания раствора. После минерализации пробу количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем мерной колбы водой до метки.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл полученного раствора, прибавляли 10 мл воды, 2 мл реактива Несслера и доводили объем раствора водой до метки. Через 15 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали смесь этих же реактивов без препарата.

Калибровочный график строили в пределах концентраций от 30 до 60 мкг/мл азота с использованием в качестве стандартного образца аммония сульфата, высушенный до постоянной массы в эксикаторе над серной кислотой.

Определение аминного азота. Выполняли согласно методике, описанной выше, предварительно обработав гидролизат двукратным объемом раствора кислоты кремневольфрамовой (50 мг/мл).

Количественное определение пептидов (молек. масса < 1500 D). Смешивали 1 мл гидролизата и 1 мл раствора кислоты трихлоруксусной (200 мг/мл). Через 10 мин осадок отфильтровывали, 0,5 мл фильтрата помещали в пробирку, прибавляли воду дистиллированную до объема 5 мл, 0,5 мл раствора натрия гидроксида (200 мг/мл) и 0,5 мл раствора меди сульфата (II) с концентрацией 20 мг/мл. Содержимое пробирки перемешивали и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 5000 мин⁻¹. Оптическую плотность супернатанта измеряли при 553 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали смесь этих же реактивов без гидролизата. Содержание пептидов находили по калибровочному графику.

Калибровочный график строили в пределах концентраций от 1 до 10 мкг/мл белка с использованием в качестве стандартного образца бычий сывороточный альбумин (содержание > 99,4 %), фирмы Serva, измеряя оптическую плотность растворов при 553 нм.

Количественное определение белка и пептидов (молек. масса > 1500D). Анализ проводили согласно методике, описанной выше, только без реакции осаждения раствором кислоты трихлоруксусной; для анализа использовали 0,25 мл гидролизата. Так как в данном определении в реакцию также вступают пептиды с молек. массой < 1500D, то содержание белка и крупных пептидов находили по разнице этих двух определений.

Определение аминсахаров. По 1 мл гидролизата и раствора глюкозамина гидрохлорида (0,5 мг/мл) переносят в пробирки со шлифом П-2-25-14/23 или пробирки биологические П-21-200, доводят водой до 2 мл, прибавляют по 2 мл раствора ацетилацетона в растворе натрия карбоната в каждую пробирку. Пробирки закрывают пробками и помещают на водяную баню (96–98 °С) на 20 мин. Уровень воды в бане должен незначительно превышать уровень раствора в пробирках. Быстро охлаждали растворы до комнатной температуры и прибавляли по 20 мл спирта этилового 95 %, тщательно перемешивали и прибавляли по 2 мл реактива Эрлиха. Содержимое пробирок вторично перемешивали для удаления углерода диоксида. Через 45 мин измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре при длине волны 530 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали смесь этих же реактивов без гидролизата.

Содержание аминсахаров (X) в гидролизате (табл. 2) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A_x C_{ст}}{A_{ст}}$$

где A_x — оптическая плотность испытуемого раствора гидролизата; $A_{ст}$ — оптическая плотность стандартного раствора глюкозамина гидрохлорида; $C_{ст}$ — концентрация глюкозамина гидрохлорида в стандартном растворе, %.

Определение меланоидинов. Содержание меланоидинов рассчитывали по молярному показателю поглощения, который при 420 нм составляет 477 л · моль⁻¹ · см⁻¹ в пересчете на глюкозоказеин [5].

Для характеристики полноты гидролиза бактериальной массы молочнокислых бактерий были рассчитаны коэффициенты гидролиза (отношение содержания аминного азота к содержанию общего азота) и протеолиза (отношение содержания пептидов к содержанию белка) (табл. 3).

В качестве пептидных и пептидно-аминокислотных препаратов для перорального применения могут использоваться гидролизаты, у которых содержание аминного азота по отношению к общему не ниже 15 %, а пептидов по отношению к количеству белков — более 50 %; из них основная доля должна приходиться на фракцию с молек. массой около 1000 D [2].

Результаты и их обсуждение

По полученным данным (табл. 2) были рассчитаны уравнения регрессии, которые адекватно описывали по-

Результаты анализа гидролизатов молочнокислых бактерий, полученных термокислотным способом ($n = 6$)

Показатель	Гидролизат				
	1	2	3	4	5
Общий азот, %	0,1520 ± 0,006	0,559 ± 0,016	1,100 ± 0,044	0,515 ± 0,015	0,485 ± 0,012
Аминный азот, %	0,049 ± 0,002	0,058 ± 0,002	0,140 ± 0,005	0,110 ± 0,005	0,095 ± 0,003
Белки, %	1,80 ± 0,46	2,08 ± 0,55	3,84 ± 0,61	4,26 ± 0,76	3,35 ± 0,58
Пептиды, %	1,09 ± 0,22	1,54 ± 0,25	2,63 ± 0,26	2,66 ± 0,26	2,19 ± 0,23
Аминосакхара, %	0,014 ± 0,002	0,022 ± 0,001	0,032 ± 0,0009	0,032 ± 0,0009	0,023 ± 0,001
Меланоидины, моль/л	0,0012 ± 0,0004	0,0012 ± 0,0004	0,0012 ± 0,0004	0,0012 ± 0,0004	0,0012 ± 0,0004

верхность отклика в области исследования. Анализ уравнений показал, что все изменяемые факторы влияли на изучаемые показатели качества гидролизатов.

Сильнее всего на них влияла температура, при которой проводился гидролиз бактериальной массы. Как следует из полученных результатов, увеличение температуры, при которой проводился гидролиз, приводит к увеличению содержания белка и пептидов в гидролизатах. При этом значения коэффициентов протеолиза существенно не изменялись. Это свидетельствует о том, что в данном интервале температура одинаково влияет на скорость разрушения клеточной стенки бактерий и на скорость гидролиза белков до пептидов.

Между продолжительностью гидролиза и величинами всех исследуемых показателей наблюдалась обратно пропорциональная зависимость. Снижение концентрации аминного азота, связанного с содержанием аминокислот, в данном случае выглядит парадоксальным, так как теоретически она должна возрастать вследствие гидролиза пептидов. Этот факт можно объяснить процессом образования меланоидинов, в который вовлекаются аминокислоты, в свою очередь разрушающиеся с увеличением времени гидролиза. Снижение при этом концентрации аминного азота можно объяснить происходящим параллельно с гидролизом белковых соединений образованием меланоидинов, которые, в свою очередь, также подвергаются разрушению, возможно обуславливая увеличение содержания аминного азота.

Наименьшее влияние оказывало значение pH среды, причём его повышение приводило только к росту концентрации аминокислот и незначительному снижению всех остальных показателей.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что в наибольшей степени требованиям к пептидным препаратам для перорального применения (табл. 3), с учётом абсолютных значений каждого из показателей содержания азотсодержащих веществ (табл. 2), отвечают гидролизаты 3 – 5. В этих продуктах содержа-

Таблица 3

Характеристики степени гидролиза бактериальной массы молочнокислых бактерий термокислотным способом

Коэффициент	Гидролизат				
	1	2	3	4	5
Гидролиза	0,332	0,104	0,127	0,214	0,196
Протеолиза	0,605	0,740	0,685	0,624	0,654

ние пептидов, основных носителей иммуностимулирующего действия, является максимальным. Следует отметить, что в гидролизате 3 содержание аминного азота меньше чем в 4 и 5, так как присутствует большее количество меланоидинов, однако, на наш взгляд, эти различия не следует считать принципиальными. Несмотря на высокие коэффициенты гидролиза и протеолиза, способ получения гидролизата 1 не может быть признан удовлетворительным из-за низких количеств продуктов гидролиза. Таким образом, термокислотный гидролиз бактериальной массы молочнокислых бактерий, проводимый в течение 1 – 3 ч в автоклаве при 120 °C и при pH 3,0 – 4,0 позволяет получать продукты с высоким содержанием пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. К. Дёрффель, *Статистика в аналитической химии (Пер. с нем.)*, Мир, Москва (1994).
2. Л. Я. Телишевская, *Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение*, Аграрная наука, Москва (2000).
3. N. Inovara, Y. Ogura, A. Fontalba, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**(8), 5509 – 5512 (2003).
4. K. M. Kengathran, S. Kimpe, C. Robson, et al., *J. Exp. Med.*, **188**(2), 305 – 315 (1998).
5. C. M. Brands, B. L. Wedzicha, M. A. Boekel, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(5), 1178 – 1183 (2002).

Поступила 28.02.05

SELECTING OPTIMUM THERMAL-ACID HYDROLYSIS CONDITIONS FOR OBTAINING LACTOBACILLUS HYDROLYSATES

M. V. Gavrilin¹, G. V. Sen'chukova¹, S. P. Senchenko¹, V. A. Samoilov², and N. M. Gostishcheva²

¹ Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy, Pyatigorsk, Russia

² State Research Institute of Complex Processing of Dairy Raw Materials, Stavropol, Russia;

The conditions of thermal-acid hydrolysis of lactobacillus were studied within the framework of the development of a new preparation possessing immunomodulating properties. The parameters for optimization were the process temperature and duration and pH of the medium. The optimization criteria were the contents of total and amine proteins, peptides, and amino sugars. The coefficients of hydrolysis and proteolysis were determined. Based on an analysis of data, hydrolysates containing 2% peptides and 0.02 – 0.03% amino sugars were selected for subsequent investigations.