



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **100637** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61K 36/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 10618	(72) Винахідник(и): Черно Наталія Кирилівна (UA), Капустян Антоніна Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 29.09.2014	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2015, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ГЛІКОПЕПТИДНОГО ПРОДУКТУ ІЗ КЛІТИННИХ СТІНОК БАКТЕРІЙ

(57) Реферат:

Спосіб одержання глікопептидного продукту із клітинних стінок бактерій включає руйнування клітинних стінок бактеріальної маси *Lactobacillus acidophilus* лізоцимом та трипсином і виділення цільового продукту. Суспензію бактерій *Lactobacillus acidophilus* кип'ятять протягом 30-60 хв, після чого охолоджують і проводять ферментативний гідроліз композицією, яка містить 0,1-0,5 %-ві розчини лізоциму і трипсину протягом 3-24 год. при рН 4,5-7,5, по завершенні ферментативного гідролізу розчинну фазу ферментолізату відділяють від нерозчинної фази і обидві фази ферментолізату піддають конвективному сушінню.

UA 100637 U

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема до способу одержання біологічно активних імунотропних сполук глікопептидного ряду із клітинних стінок бактерій, які можуть бути використані в харчовій промисловості як функціональні інгредієнти харчових систем та дієтичних добавок.

Початок досліджень, присвячених глікопептидам (ГП) та продуктам їхньої деградації покладено ще в 1974 р. (Ellouz AF, Ciorubaru R, Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 59: 1317-25). Вчені виявили, що мінімальний структурний фрагмент ГП клітинних стінок бактерій - мурамід-пептид (МДП) обумовлює імуностимулюючий ефект повного адьюванта Фрейнда. При цьому доведено, що використання препаратів з цілих мікробних клітин є малоефективним, оскільки при імунodefіцитних станах організму функціональна активність макрофагів сильно знижена і, отже, знижена здатність розщеплювати ПГ з утворенням низькомолекулярних продуктів їхньої деградації.

У зв'язку з цим існує необхідність деструкції бактеріальних клітин з метою отримання імунотропних глікопептидних продуктів, здатних легше засвоюватися і вступати в біохімічні процеси, прискорюючи очікуваний імунотропний ефект.

При виборі способу руйнування клітинних стінок бактерій перевагу, як правило, надають ферментативним методам. Такий спосіб передбачає м'які умови гідролізу (при температурі 35-50 °С та атмосферному тиску), унеможливорює руйнування продуктів ферментолізу та їх небажану взаємодію з вихідними реагентами. При цьому утворюється складна суміш продуктів розпаду ПГ з різною молекулярною масою, співвідношення яких залежить від ферменту, виду сировини та умов проведення процесу. Ступінь гідролізу субстрату, як правило, оцінюється за кількісним вмістом загального білка, імунокомпетентних пептидів, амінокислот, аміноцукрів і т.д.

Як ферменти, як засоби руйнування клітинної стінки, найчастіше використовують протеази (трипсин, хімотрипсин, пепсин) та лізоцим. Вибір саме цих ферментів аргументується тим, що вони гідролізують специфічні зв'язки, які є у складі ПГ клітинної стінки бактерій. Так, лізоцим каталізує розрив β -(1 \rightarrow 4) глікозидних зв'язків між N-ацетилглюкозаміном і N-ацетилмурамовою кислотою, а протеази - пептидних зв'язків між мурамовою кислотою в паралельних ланцюгах, (фіг. 1, 2).

Відомий спосіб одержання біологічно активного гідролізату шляхом ферментативного гідролізу полівидової закваски БК-Углич-№ 4, який полягає в тому, що субстрат попередньо кип'ятять у розчині хлороводневої кислоти (рН 2-3) протягом 30 хвилин після чого охолоджують та додають фермент (пепсин), інкубують 6 годин, центрифугують та отримують цільовий продукт (Гаранян Г.С. Хімічне обґрунтування і біологічне дослідження гідролізату на основі культур молочнокислих бактерій / Г.С. Гаранян, Р.А. Ханферян, Е.Т. Оганесян // Хім. - фармац. журн. - т. 44, № 8. - 2010. - С. 46-49).

Недоліком даного способу є той факт, що при руйнуванні клітинної стінки використовують протеолітичний фермент пепсин, який здатний руйнувати тільки пептидні зв'язки між амінокислотними залишками, а зв'язки між мурамовою кислотою та глюкозаміном залишаються неушкодженими, що значно зменшує ймовірність утворення мінімальної структурної одиниці ГП - МДП, який відповідає за імунотропні властивості продуктів деградації клітинних стінок бактерій. Спосіб не передбачає комплексної переробки сировини.

Відомий також спосіб держання продуктів гідролізу клітинної стінки молочнокислих бактерій з використанням лізоциму (патент США 5185321, А61К 037/18, 1990 р.). Його отримували інкубуванням культури молочнокислих бактерій *Lactobacillus bulgaricus* з лізоцимом протягом 1-48 годин при температурі 15-37 °С і при значенні рН 4-8 з наступним відділенням від суспензії завислих часток.

Недоліком даного способу є той факт, що при руйнуванні клітинної стінки використовують фермент лізоцим, який здатний руйнувати тільки глікозидні зв'язки між мурамовою кислотою та глюкозаміном, а пептидні зв'язки між амінокислотними залишками у складі ГП залишаються неушкодженими, що значно зменшує ймовірність утворення мінімальної структурної одиниці ГП - МДП, який відповідає за імунотропні властивості продуктів деградації клітинних стінок бактерій. Спосіб не передбачає комплексної переробки сировини.

Окрім того, відомий спосіб одержання продуктів руйнування глікопептидів клітинних стінок грамнегативних бактерій *Salmonella typhi* сімейства Enterobacteriaceae з застосуванням лізоциму (заявка № 2008 144644). Спосіб полягає в тому, що готують біомасу грамнегативних бактерій *Salmonella typhi* сімейства Enterobacteriaceae. Виділяють пептидоглікан клітинної стінки (ПКС) бактерій за допомогою екстракції біомаси 45 % водним фенолом при температурі 70-90 °С або водними розчинами іонних або неіонних детергентів при температурі 37-100 °С. Проводять препаративний ферментативний гідроліз для розщеплення нерозчинного ПКС із застосуванням

лізоциму при рН 4,5-8,9 і температурі 10-37 °С. Одночасно видаляють фармакологічно прийнятну суміш речовин з реакційної суміші діалізом із застосуванням напівпроникних мембран для ультрафільтрації з розміром відсічення до 5 кДа. Проводять виділення суміші речовин також за допомогою колонкової гелі-проникаючої хроматографії, зокрема препаративної гелі-хроматографії на колонках з сефадексом або TSK-гелем.

Недоліком даного способу є використання токсичного фенолу при екстракції, використання при ферментолізі тільки одного типу ферменту, застосування високовартісних сучасних мембранних і хроматографічних методів розділення. Спосіб не передбачає комплексної переробки сировини.

Найближчим до корисної моделі, що заявляється, є спосіб отримання глікопептидного препарату (Патент США № 6281191, 2001), який передбачає культивування біомаси клітин *L. bulgaricus* ферментацією на спеціальних поживних середовищах, обробку біомаси трипсином, дезінтеграцію біомаси ультразвуком, повторну обробку біомаси трипсином і пепсином, центрифугування, гідроліз лізоцимом, хроматографія.

Даний спосіб обрано найближчим аналогом.

Найближчий аналог і спосіб, що заявляється, співпадають у наявності операцій обробки бактеріальної маси протеолітичними ферментами та лізоцимом.

Але спосіб за найближчим аналогом має суттєві недоліки: необхідність використання дорогих реагентів в поживних середовищах (пептон) для вирощування молочнокислих мікроорганізмів, при отриманні цільових глікопептидів, що мають цінними фармакологічними властивостями передбачається застосування високовартісних сучасних мембранних і хроматографічних методів розділення; недостатньо високий вихід глікопептидів (з 200 л ферментативного розчину *L. bulgaricus* одержують 35 г клітинних стінок, з яких виділяють 10,6 г суміші ГП з молекулярної масою 1000-10000 Да, тобто в перерахунку на 1 л ферментативного розчину отримують 0,053 г ГП); окрім того, дана технологія не передбачає одержання інших, побічних продуктів, крім глікопептидів, які також мають корисні властивості.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити удосконалений спосіб отримання глікопептидного продукту шляхом ферментативного руйнування клітинної стінки грамнегативних бактерій, які можуть бути використані в харчовій промисловості як біологічно активні імуноотропні функціональні інгредієнти харчових систем та дієтичних добавок.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі одержання глікопептидного продукту із клітинних стінок бактерій, руйнування клітинних стінок бактеріальної маси *Lactobacillus acidophilus* лізоцимом та трипсином і виділення цільового продукту тим, що суспензію бактерій *Lactobacillus acidophilus* кип'ятять протягом 30-60 хв, після чого охолоджують і проводять ферментативний гідроліз композицією, яка містить 0,1-0,5 %-ві розчини лізоциму і трипсину протягом 3-24 год. при рН 4,5-7,5, по завершенні ферментативного гідролізу розчинну фазу ферментолізату відділяють від нерозчинної фази і обидві фази ферментолізату піддають конвективному сушінню.

Ферментативний гідроліз проводять при співвідношенні лізоциму і трипсину в композиції рівному 1:1 і масовому співвідношенні композиція ферментів: бактеріальна маса 1:(1-40).

Розчинну фазу ферментолізату відділяють від нерозчинної фази центрифугуванням протягом 10-15 хв при $n=5-15 \cdot 10^3 \text{ хв}^{-1}$.

Конвективне сушіння розчинної та нерозчинної фаз ферментолізату здійснюють при 45-80 °С протягом 60-240 хв.

Використання молочнокислих бактерій аргументується тим, що накопичено значний досвід їхнього культивування у великих масштабах та у стінках грам негативних бактерій знаходиться до 70 % ГП

Новим у корисній моделі, що заявляється є застосування ферментної композиції лізоцим: трипсин для руйнування бактеріальних стінок з попереднім кип'ятінням бактеріальної суспензії, що призводить до збільшення кількості імунокомпетентних пептидів, значно скорочує та спрощує процес гідролізу. У корисній моделі, що заявляється, також передбачається вирішення проблеми комплексного використання сировини шляхом підготування розчинних та нерозчинних компонентів ферментолізату для застосування як функціональних інгредієнтів при створенні харчових систем та дієтичних добавок, що мають імуноотропну активність.

Визначено, що найбільш ефективним є гідроліз клітинної стінки бактерій, при якому лізис клітини здійснюють при одночасному використанні протеази (трипсину) і лізоциму, аргументується це тим, що обидва ферменти проявляють максимальну активність у однаковому діапазоні значень температури і рН середовища, крім того, спільне застосування лізоциму і трипсину не тільки не знижує їх специфічні активності, а й призводить до синергізму дії.

Головним критерієм ефективності руйнування клітинної стінки бактерій було вибрано максимальну кількість біологічно активних низькомолекулярних продуктів гідролізу - амінокислот, низькомолекулярних імунокомпетентних пептидів (з молекулярною масою 700...1500 Да) та аміноцукрів. Більш детальну інформацію про склад розчинного гідролізату наведено в табл. 1.

Спосіб, що заявляється, пояснюється кресленнями, де: фіг. 1 - структура повторюваної одиниці пептидоглікану клітинної стінки бактерій; фіг. 2 - схематичне зображення структури пептидоглікану клітинної стінки.

На фіг. 1 показано: 1, 3 - місця полімеризації гліканового остову молекули; 4, 6 - місця, по яких відбувається зв'язування між глікановими ланцюгами за допомогою пептидних зв'язків; 5 - місце ковалентного зв'язування (пептидний зв'язок) з ліпопротеїдом зовнішньої мембрани у грамнегативних еубактерій; 2 - глікозидний зв'язок.

На фіг. 2 показано: 1-N-ацетилмурамова кислота; 2-N-ацетилглюкозамін; 3 - пептидний ланцюг; 4 - пентагліциновий місток.

Приклад 1. Суспензію бактерій *Lactobacillus acidophilus* (масове співвідношення бактерії: вода 1:60) піддавали кип'ятіння протягом 30 хв. Після цього суміш охолоджували та піддавали ферментативному гідролізу композицією лізоцим: трипсин, для якої використовували 0,1 % розчини ферментів при співвідношенні 1:1, масове співвідношення ферментна композиція: бактеріальна маса 1:10. Гідроліз субстрату проводили протягом 18 год. при pH 7,5 і 37 °C. Після ферментативного гідролізу розчинну фазу ферментолізату відділяли від нерозчинної центрифугуванням протягом 10 ($n=5 \cdot 10^3$ хв⁻¹). Розчинну та нерозчинну фракції окремо піддавали конвективному сушінню протягом 120 хв при температурі 70 °C. Висушені продукти подрібнювали до порошкоподібного дрібнодисперсного стану, колір одержаних продуктів від світло-сірого до кремового. Вміст вологи складає 8-10 %.

Приклад 2-3. Здійснювали аналогічно тому як наведено в прикладі 1, але компоненти брали в різних співвідношеннях (табл. 1).

Приклад 4-6. Здійснювали аналогічно тому як наведено в прикладі 1-3, але збільшували тривалість попереднього кип'ятіння (табл. 2).

Таблиця 1

Склад компонентів гідролізату бактерій

Компонент гідролізату	Кількість компонентів гідролізату			
	Співвідношення ферментна складова: субстрат			
	Контроль (без ферментолізу)	1:10	1:20	1:40
Білок, мг/мл	9,54	0,52	1,15	5,56
Пептиди, мг/мл	0,03	3,04	3,31	2,04
Амінокислоти, мг/мл	0,01	8,64	7,57	4,83
Аміноцукри, мг/мл	-	0,08	0,09	0,04
Нерозчинний залишок, %	3,43	11,52	18,08	20,15

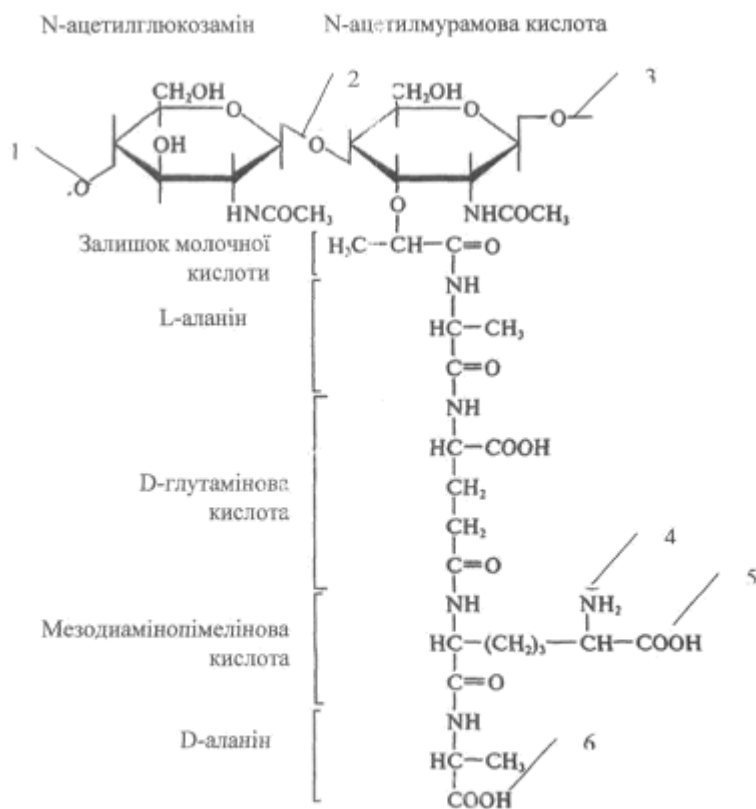
Таблиця 2

Вплив тривалості попереднього кип'ятіння і масового співвідношення ферментна композиція: субстрат на вихід амінокислот

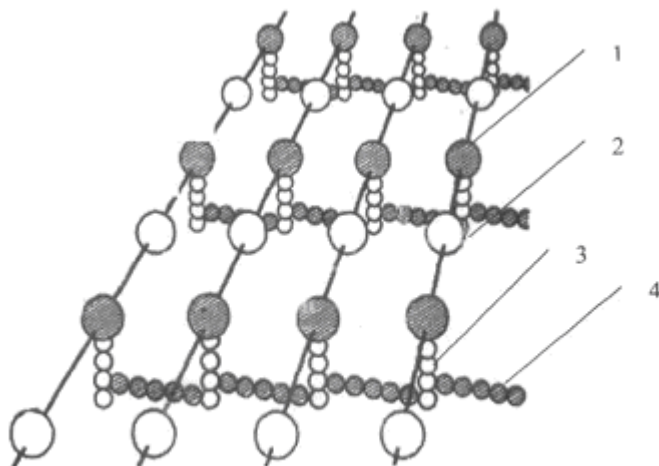
Масове співвідношення ферментна композиція: субстрат	Тривалість попереднього кип'ятіння				
	Без кип'ятіння	15 хв.	30 хв.	45 хв.	60 хв.
	Вихід амінокислот, мг/мл				
1:10	0,01	2,12	4,33	5,26	5,84
1:20	0,01	2,06	3,68	4,94	5,41
1:40	0,01	0,52	1,53	2,18	3,23

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб одержання глікопептидного продукту із клітинних стінок бактерій, що включає руйнування клітинних стінок бактеріальної маси *Lactobacillus acidophilus* лізоцимом та трипсином і виділення цільового продукту, який **відрізняється** тим, що суспензію бактерій *Lactobacillus acidophilus* кип'ятять протягом 30-60 хв, після чого охолоджують і проводять ферментативний гідроліз композицією, яка містить 0,1-0,5 %-ві розчини лізоциму і трипсину протягом 3-24 год. при рН 4,5-7,5, по завершенні ферментативного гідролізу розчинну фазу ферментолізату відділяють від нерозчинної фази і обидві фази ферментолізату піддають конвективному сушінню.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ферментативний гідроліз проводять при співвідношенні лізоциму і трипсину в композиції рівному 1:1 і масовому співвідношенні композиція ферментів:бактеріальна маса 1:(1-40).
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що розчинну фазу ферментолізату відділяють від нерозчинної фази центрифугуванням протягом 10-15 хв при $n=5-15 \cdot 10^3 \text{ хв}^{-1}$.
4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що конвективне сушіння розчинної та нерозчинної фаз ферментолізату здійснюють при 45-80 °С протягом 60-240 хв.



Фіг. 1



Фіг. 2