



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **138938** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
A61K 36/00
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 38/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 06161	(72) Винахідник(и): Капустян Антоніна Іванівна (UA), Черно Наталія Кирилівна (UA), Бурдо Олег Григорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.06.2019	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.12.2019	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.12.2019, Бюл.№ 23	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ГЛІКОПЕПТИДНОГО ПРОДУКТУ ІЗ КЛІТИННИХ СТІНОК ПРОБІОТИЧНИХ БАКТЕРІЙ

(57) Реферат:

Спосіб одержання глікопептидного продукту із клітинних стінок пробіотичних бактерій включає руйнування клітинних стінок бактеріальної маси, ферментативний гідроліз композицією, яка містить розчини лізоциму та протеази, відокремлення розчинної фази ферментолізату від нерозчинної фази і наступне сушіння обох фаз, згідно з корисною моделлю, біомасу культури *Lactobacillus acidophilus* або *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, або *Bifidobacterium bifidum*, або *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, або *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, або *Streptococcus thermophilus*, або біомасу, що містить композицію культур *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, з вмістом сухих речовин 1-80 % та у присутності NaCl у кількості 0,1-10 мас. % до маси сухих речовин біомаси, піддають обробці мікрохвильовими променями в надвисокочастотному електричному полі частотою 2,4 ГГц протягом 10-480 с, а отриманий дезінтеграт піддають ферментолізу композицією, яка містить розчини лізоциму і папаїну протягом 30-170 хв при масовому співвідношенні композиція ферментів:бактеріальна маса 1:(50-500), відповідно.

UA 138938 U

Корисна модель належить до біотехнології, оздоровчого та лікувально-профілактичного харчування, харчових технологій, зокрема до способу отримання біологічно активних імунотропних сполук глікопептидного ряду із клітинних стінок пробіотичних 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. (див. Ellouz AF, Ciorubaru R, Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan sub-units. Biochem Biophys Res Commun 1974. – 59; 1317-25). Вчені виявили, що мінімальний структурний фрагмент ГП клітинних стінок бактерій - мураміддипептид (МДП) обумовлює імуностимулювальний ефект повного ад'юванта Фрейнда. При цьому доведено, що використання препаратів з цілих мікробних клітин є малоефективним, оскільки при імунодефіцитних станах організму функціональна активність макрофагів сильно знижена і, отже, знижена здатність розщеплювати ГП 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 включає м'які умови гідролізу (при температурі 35-50 °С та атмосферному тиску), унеможливує руйнування продуктів ферментолізу та їх небажану взаємодію з вихідними реагентами. При цьому утворюється складна суміш продуктів розпаду ГП з різною молекулярною масою, співвідношення яких залежить від ферменту, виду сировини та умов проведення процесу. Ступінь гідролізу субстрату, як 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, засоби руйнування ГП 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 ГП 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.

Відомий спосіб одержання біологічно активного гідролізату шляхом ферментативного гідролізу полівидової закваски БК-Угліч-№ 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 (див. 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. - 2010. - Т. 44, № 8. - С. 46-49).

Недоліком даного способу є той факт, що при руйнуванні клітинної стінки використовують протеолітичний фермент пепсин, який здатен 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 включає комплексної переробки сировини.

Відомий також спосіб одержання продуктів гідролізу клітинної стінки молочнокислих бактерій з використанням лізоциму (див. патент США 5185321, А61К 037/18, 1990 р.), відповідно до якого культуру молочнокислих бактерій *Lactobacillus bulgaricus* інкубували з лізоцимом протягом 1-48 годин при температурі 15-37 °С та 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 здатен 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 включає комплексної переробки сировини.

Існує спосіб отримання глікопептидного препарату (див. патент США № 6281191, 2001), який включає культивування біомаси клітин *L. bulgaricus*, обробку біомаси трипсином, дезінтеграцію біомаси ультразвуком, повторну обробку біомаси трипсином і пепсином, центрифугування, гідроліз лізоцимом, хроматографію.

Але спосіб має суттєві недоліки: необхідність використання високовартісних сучасних мембранних і хроматографічних методів розділення; недостатньо високий вихід глікопептидів (із 200 л ферментативного розчину *L. bulgaricus* одержують 35 г клітинних стінок, з яких виділяють

10,6 г суміші глікопептидів з молекулярною масою 1000-10000 Да), окрім того, дана технологія передбачає комплексної переробки сировини.

Як найближчий аналог вибрано спосіб отримання глікопептидного препарату (див. патент на корисну модель України № 100637, 2015), який включає культивування біомаси клітин *Lactobacillus acidophilus* на спеціальних поживних середовищах, інкубацію культуральної рідини при 100 °С протягом 30-60 хв, охолодження, ферментоліз композицією, яка містить 0,1-0,5 %-ві розчини лізоциму та трипсину. Ферментативний гідроліз проводять при співвідношенні лізоциму та трипсину в композиції рівному 1:1 і масовому співвідношенні композиція ферментів: бактеріальна маса 1:(1-40). Тривалість процесу складає 3-24 год. при значенні рН 4,5-7,5, за яким слідує декантація, конвективне сушіння розчинної та нерозчинної фракції ферментолізату.

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

Але спосіб за аналогом має суттєві недоліки: надано рекомендації для деструкції клітинних стінок з метою отримання імунотропних низькомолекулярних пептидів тільки одного виду про біотичних бактерій - *Lactobacillus acidophilus*, процес ферментолізу довготривалий (до 24 год.), у якості протеолітичного ферменту використовується панкреатин, який має низьку специфічність по відношенню до пептидних зв'язків пептидогліканів, у результаті ферментолізу накопичується достатньо мало цільових імунотропних низькомолекулярних глікопептидів (ІНМГП) у реакційному середовищі.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити удосконалений спосіб отримання глікопептидного продукту шляхом деструкції клітинних стінок серії пробіотичних бактерій, із використанням як додаткового деградуєного фактора - обробки хвилями надвисокої частоти (НВЧ) та ферментативного гідролізу із залученням протеолітичного ферменту із більш широким ареалом субстратної специфічності - папаїну. Даний спосіб забезпечує скорочення тривалості процесу отримання ІНМГП та збільшення їхнього вмісту у складі ферментолізату.

Поставлена задача вирішена в способі одержання глікопептидного продукту із клітинних стінок бактерій, що включає руйнування клітинних стінок бактеріальної маси, ферментативний гідроліз композицією, яка містить розчини лізоциму та протеази, відокремлення розчинної фази ферментолізату від нерозчинної фази і наступне сушіння обох фаз, тим, що біомасу культури *Lactobacillus acidophilus* або, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* або, *Bifidobacterium bifidum* або, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* або, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* або, *Streptococcus thermophilus*, або біомасу, що містить композицію культур *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, з вмістом сухих речовин 1-80 % та у присутності NaCl у кількості 0,1-10 мас. % до маси сухих речовин біомаси, піддають обробці мікрохвильовими променями в надвисокочастотному електричному полі частотою 2,4 ГГц протягом 10-480 с, а отриманий дезінтеграт піддають ферментолізу композицією, яка містить розчини лізоциму і папаїну протягом 30-170 хв при масовому співвідношенні композиція ферментів: бактеріальна маса 1:(50-500) відповідно.

Новим у корисній моделі, що заявляється, є застосування обробки бактеріальної маси хвилями надвисокої частоти, протеолітичного ферменту з широким ареалом субстратної специфічності у складі ферментної композиції лізоцим: папаїн, зниження концентрації ферментних препаратів у реакційній суміші, скорочення тривалості процесу отримання імунотропних низькомолекулярних глікопептидів (ІНМГП). Дані фактори забезпечують інтенсифікацію процесу отримання ІНМГП та приводять до збільшення їхньої концентрації у складі ферментолізату.

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

Приклад 1. До біомаси *Lactobacillus acidophilus* з вмістом сухих речовин (СР) 60 % додавали NaCl у кількості 3 % до маси бактерій, після чого суміш піддавали обробці хвилями НВЧ частотою 2,4 ГГц протягом 300 с з метою первинної деструкції клітинних стінок бактерій. Після цього суміш охолоджували, проводили ресуспендування дистильованою водою до вмісту СР 7 % та піддавали ферментативному гідролізу композицією лізоцим:папаїн (при співвідношенні ферментів у композиції 1:1). Ферментоліз субстрату проводили протягом 120 хв при рН 5,5 і 37 °С при співвідношенні фермент: субстрат 1:100. Після ферментативного гідролізу розчинну фазу ферментолізату відділяли від нерозчинної фази центрифугуванням протягом 10 хв ($n=5 \cdot 10^3$ хв⁻¹). Розчинну та нерозчинну фракції окремо піддавали конвективному сушінню

протягом 180 хв при температурі 60 °С. Висушені продукти подрібнювали до порошкоподібного дрібнодисперсного стану, колір одержаних продуктів від світло-сірого до кремового. Вміст води складав 8 %. Дані наведено в таблиці.

Приклад 2-4. Здійснювали аналогічно тому як наведено в прикладі 1, але змінювали тривалість мікрохвильової обробки. Дані наведено в таблиці.

Приклад 5-8. Здійснювали аналогічно тому як наведено в прикладі 1, але змінювали вміст СР біомаси при мікрохвильовій обробці. Дані наведено в таблиці.

Приклад 9-11. Здійснювали аналогічно тому як наведено в прикладі 1, але до біомаси додавали NaCl у різних кількостях. Дані наведено в таблиці.

Приклад 12-14. Здійснювали аналогічно тому як наведено в прикладі 1, але змінювали тривалість ферментативної обробки. Дані наведено в таблиці.

Приклад 15-17. Здійснювали аналогічно тому як наведено в прикладі 1, але змінювали співвідношення ферментна композиція: субстрат. Дані наведено в таблиці.

Приклад 18-22. Здійснювали аналогічно тому як наведено в прикладі 1, але у якості субстрату використовували різні види пробіотичних культур (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* або *Bifidobacterium bifidum*, або *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, або *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, або *Streptococcus thermophilus*). Дані наведено в таблиці.

Приклад 23. Здійснювали аналогічно тому як наведено в прикладі 1, але як субстрат використовували композицію пробіотичних культур, що представляє собою суму тест-культур (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, *Streptococcus thermophilus*). Дані наведено в таблиці.

Запропонований спосіб забезпечує скорочення тривалості процесу отримання ІНМГП та збільшення їхнього вмісту у складі дезінтеграту, порівняно з обраним найближчим аналогом (максимальна кількість ІНМГП складає 3,31 мг/см³ через 18 годин ферментолізу). Так, найбільший вміст ІНМГП у дезінтеграті, отриманому за запропонованою корисною моделлю, має місце при тривалості ферментативного гідролізу протягом 120 хв, співвідношенні ферментна композиція: субстрат 1:100 та складає 6,4 мг/см³. Отже, порівняно з аналогом, вміст ІНМГП вищий більш як у 2 рази, а тривалість ферментолізу скорочується у 6 разів.

Таблиця

Вміст ШМГП у дезінтегратах пробіотичних культур, залежно від умов мікрохвильової обробки та ферментолізу

№ п/п прикладу	Характеристика субстрату		Умови мікрохвильової обробки		Умови ферментолізу		Вміст ІНМГП, мг/см ³
	Вид біомаси	Вміст сухих речовин, %	Тривалість, с	Вміст NaCl, %	Співвідношення ферментна композиція субстрат: субстрат	Тривалість, хв	
1	2	3	4	5	6	7	8
1		60	300	3	1:100	120	6,4
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	60	3	1:100	120	3,2
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	120	3	1:100	120	3,8
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	180	3	1:100	120	4,2
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	7	300	3	1:100	120	3,5
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	15	300	3	1:100	120	4,4
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	30	300	3	1:100	120	4,7
8	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	45	300	3	1:100	120	5,2
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	300	0,1	1:100	120	5,0
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	300	1	1:100	120	5,3
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	300	8	1:100	120	5,8
12	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	300	3	1:100	30	3,6
13	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	300	3	1:100	60	4,2
14	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	300	3	1:100	170	5,8
15	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	300	3	1:50	170	4,2

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8
16	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	300	3	1:200	170	4,7
17	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	300	3	1:300	170	3,5
18	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	60	300	3	1:100	170	6,2
19	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	60	300	3	1:100	170	6,0
20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	60	300	3	1:100	170	6,1
21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	60	300	3	1:100	170	5,8
22	<i>Streptococcus thermophilus</i>	60	300	3	1:100	170	5,4
23	Композиція <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	60	300	3	1:100	170	6,8

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб одержання глікопептидного продукту із клітинних стінок пробіотичних бактерій, що включає руйнування клітинних стінок бактеріальної маси, ферментативний гідроліз композицією, яка містить розчини лізоциму та протеази, відокремлення розчинної фази ферментолізату від нерозчинної фази і наступне сушіння обох фаз, який **відрізняється** тим, що біомасу культури *Lactobacillus acidophilus* або *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, або *Bifidobacterium bifidum*, або *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, або *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, або *Streptococcus thermophilus*, або біомасу, що містить композицію культур *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, з вмістом сухих речовин 1-80 % та у присутності NaCl у кількості 0,1-10 мас. % до маси сухих речовин біомаси, піддають обробці мікрохвильовими променями в надвисокочастотному електричному полі частотою 2,4 ГГц протягом 10-480 с, а отриманий дезінтеграт піддають ферментолізу композицією, яка містить розчини лізоциму і папаїну протягом 30-170 хв при масовому співвідношенні композиція ферментів:бактеріальна маса 1:(50-500), відповідно.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601