

DEVELOPMENT OF THE DETERMINATION METHOD OF THE MUROPEPTIDE ORIGINING FUNCTIONAL FOOD INGREDIENTS IN THE BACTERIAL DISINTEGRATES

A. Kapustian, N. Cherny, A. Pucas

Odessa National Academy of Food Technologies

Key words:

Bacterial disintegrates
Muropeptides
Immunotropic food
ingredients
Methods of determination

Article history:

Received 04.10.2019
Received in revised form
15.10.2019
Accepted 01.11.2019

Corresponding author:

A. Kapustian

E-mail:

fst.journal@ukr.net

ABSTRACT

The expediency of developing a reliable and easy-to-implement method for determining muropeptides in bacterial disintegrates in obtaining immunotropic functional food ingredients has been substantiated. It has been noted that the existing methods of muropeptides identification, namely, the determination of muramic acid residues, peptide bonds in their composition, the use of chromatographic methods, have certain disadvantages. A method according to which the qualitative and quantitative content of muropeptides can be determined by the reaction of their carbohydrate component (glucose residues in the form of muramic acid and N-acetylglucosamine) with an Anthrone reagent has been proposed. In this case, a prerequisite is the removal of bacterial disintegrate from carbohydrates, acids, salts, etc. using ion exchange chromatography with KU-2 cation exchanger.

It has been stated that the quantitative content of muropeptides should be determined according to a calibration graph built on the standard solution of muropeptides. It was found that, as a result of the interaction of muropeptides standard solutions with the Anthrone reagent, the reaction medium acquired characteristic blue-green color. A calibration graph to determine the concentration of muropeptides in bacterial disintegrates is constructed, where the coefficient of approximation reliability is $R^2 \approx 1$, which corresponds to the high degree of compliance of the trend model to the original data.

The proposed method was tested in determining the concentration of muropeptides in *Lactobacillus acidophilus* K 3111 disintegrates. Disintegration was performed by combining ultrasonic and enzymatic treatment. Proteases (pancreatin, papain, protosubtilin) and muramidase (lysozyme) were used as enzymes. It was found that the highest amount of target immunotropic muropeptides accumulates during biomass treatment with lysozyme: papain composition at 1:2 enzyme ratio, enzyme substrate ratio 1:100, and process duration over 180 min.

РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ХАРЧОВИХ ІНГРЕДІЄНТІВ МУРОПЕПТИДНОГО ПОХОДЖЕННЯ У БАКТЕРІАЛЬНИХ ДЕЗІНТЕГРАТАХ

А. І. Капустян, Н. К. Черно, А. С. Пукас

Одеська національна академія харчових технологій

У статті обґрунтовано доцільність розроблення достовірного та простого в реалізації методу визначення мууропептидів у складі бактеріальних дезінтегратів при отриманні імунотропних функціональних харчових інгредієнтів. Зазначено, що існуючі методи ідентифікації мууропептидів, зокрема визначення залишків мурамової кислоти, пептидних зв'язків у їхньому складі, використання хроматографічних методів, мають певні недоліки. Запропоновано метод, згідно з яким якісний і кількісний вміст мууропептидів можна визначити за допомогою реакції їхньої вуглеводної складової (залишки глюкози у складі мурамової кислоти та N-ацетилглюкозаміну) з реактивом Антрона. При цьому необхідною умовою є позбавлення бактеріального дезінтеграту від вуглеводів, кислот, солей тощо за допомогою іонообмінної хроматографії з катіонітом КУ-2.

З'ясовано, що кількісний вміст мууропептидів слід визначати за калібрувальним графіком, побудованим за стандартним розчином мууропептидів. Встановлено, що у результаті взаємодії стандартних розчинів мууропептидів з реактивом Антрона, реакційне середовище набувало характерного синьо-зеленого забарвлення.

*Побудовано калібрувальний графік для визначення концентрації мууропептидів у бактеріальних дезінтегратах, де коефіцієнт достовірності апроксимації $R^2 \approx 1$, що відповідає високому ступеню відповідності трендової моделі до вихідних даних. Запропонований метод апробовано при визначенні концентрації мууропептидів у дезінтегратах *Lactobacillus acidophilus* K 3111. Дезінтеграцію проводили при комбінуванні ультразвукової та ферментативної обробки. Як ферменти використовували протеази (панкреатин, папаїн, протосубтилін) і мурамідазу (лізоцим). Встановлено, що найбільша кількість цільових імунотропних мууропептидів накопичується при обробці біомаси композитією лізоцим: папаїн при співвідношенні ферментів, відповідно, 1:2, при співвідношенні фермент: субстрат 1:100 і тривалості процесу протягом 180 хв.*

Ключові слова: бактеріальні дезінтеграти, мууропептиди, імунотропні харчові інгредієнти, методи визначення.

Постановка проблеми. Загально визнаною проблемою сучасного суспільства є зниження його імунного статусу. Людина зі зниженим імунітетом найбільш вразлива до застудних, інфекційних та інших супутніх хвороб. Доцільною є нутритивна підтримка цієї категорії населення шляхом введення в раціон імунотропних функціональних харчових інгредієнтів. Вельми перспек-

тивним є використання як таких інгредієнтів певних структур мікроорганізмів — муропептидів [1], які володіють усіма необхідними для патоген-асоційованих молекулярних структур властивостями, що виражаються в стимуляції імунітету і здатності формувати захист від мікробних інфекційних агентів [2; 3]. Муропептиди — низькомолекулярні продукти деструкції пептидогліканів бактеріальних клітинних стінок, при отриманні яких виникає проблема їхньої ідентифікації та кількісного визначення, оскільки супутні речовини, що утворюються в результаті дезінтеграції бактеріальних клітин, є суттєвою перешкодою для коректного аналізу.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Муропептиди — компоненти пептидогліканів клітинних стінок бактерій (рис. 1), до складу яких входять залишки мурамової кислоти самостійно або поєднаних β 1→4 глікозидними зв'язками з N-ацетилглюкозаміном, залишки пептидів, задіяних у ковалентних зв'язках з мурамовою кислотою [3]. Мінімальний представник сполук муропептидного ряду — мураміддипептид (МДП) (рис. 1).

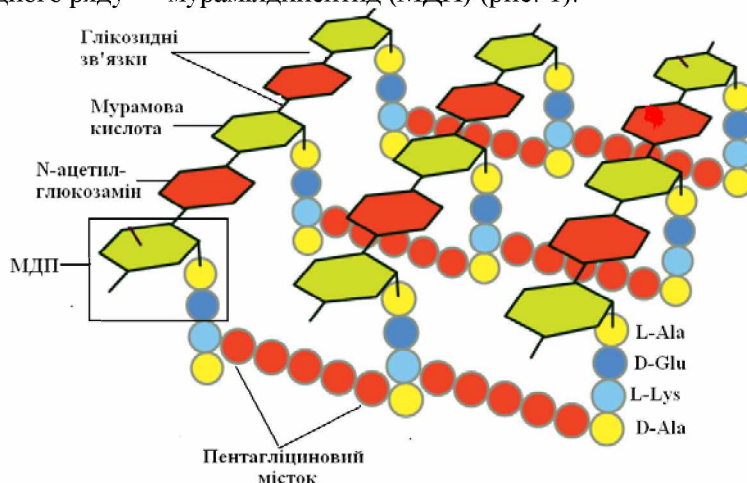


Рис. 1. Фрагмент пептидоглікану клітинної стінки пробіотичних бактерій і МДП у його складі

У літературі найбільш часто зустрічаються такі методи визначення муропептидів у складі бактеріальних дезінтегратів: визначення залишків мурамової кислоти у їхньому складі, визначення пептидних зв'язків, використання хроматографічних методів із застосуванням модельних зразків муропептидів [4—6].

Принцип визначення мурамової кислоти у складі бактеріальних гідролізатів засновано на виділенні D-лактата з 3-го положення шляхом лужної обробки з подальшим його кількісним визначенням за участі міді сульфату та п-гідроксифенільного реактиву [4]. Але використання цього методу не передбачено для визначення мурамової кислоти у складі муропептидів, які отримують у результаті дезінтеграції пробіотичних бактеріальних клітин. Такі гідролізати можуть містити вільний продукт метаболізму — D-лактат (молочну кислоту), а його наявність у вільному стані унеможливорює використання

цього методу, оскільки він передбачає фотоколориметричне визначення забарвлених сполук, утворених при взаємодії лактату, вивільненого зі складу мурамової кислоти, із міддю сульфатом і п-гідроксифенільним реактивом.

Визначення мурупептидів у бактеріальних гідролізатах проводять також за допомогою якісних реакцій на пептидний зв'язок (з Біуретовим, або реактивом Бенедикта) після осадження високомолекулярних білків 20-відсотковим розчином трихлороцтової кислоти [5]. Але цей метод забезпечує визначення лише пептидних зв'язків білкових сполук у складі бактеріальних гідролізатів, проте до складу молекулярної фракції пептидів до 1500 Да можуть входити не лише мурупептиди, а й інші пептиди, які утворюються в ході дезінтеграції бактеріальних культур. Отже, використання цього методу для визначення мурупептидів не є виправданим.

Для визначення мурупептидів часто використовують методи високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та електрофоретичні методи. Так, у [6] зазначено, що для аналізу мурупептидів у таблетках «Лікопід» використовується ВЕРХ, але для їхнього кількісного визначення в гідролізатах використовували міцелярний варіант електрофорезу, коли до складу провідного електроліту вводиться натрію додецилсульфат в концентрації, що перевищує критичну концентрацію міцелоутворення. Використання ВЕРХ у першому випадку не надає можливості кількісно визначити мурупептиди у гідролізатах. Це пов'язано з тим, що ВЕРХ в обернено-фазовому варіанті має відносно низьку ефективність при аналізі сорбатів з високою полярністю, яка не дає змоги розділити мурупептиди з іншими пептидами й амінокислотами, що утворюються в ході гідролізу. В обох способах необхідним є залучення високовартісного обладнання, яке може бути недоступним для випробувальних лабораторій харчових підприємств.

Мета дослідження: розроблення достовірного, простого у реалізації методу, який забезпечуватиме точне визначення вмісту мурупептидів у складі бактеріальних дезінтегратів при отриманні імунотропних функціональних харчових інгредієнтів.

Матеріали і методи. З метою отримання мурупептидів як імунотропних функціональних харчових інгредієнтів проводили дезінтеграцію біомаси *Lactobacillus acidophilus* К 3111 (з колекції НВП «Аріадна», м. Одеса) концентрацією $7 \cdot 10^9$ КУО/см³ із залученням фізичних та ензиматичних факторів впливу.

Виділення клітин з культуральної рідини здійснювали шляхом центрифугування протягом 15 хв при 8000 хв^{-1} . Осад клітин відмивали дистильованою водою та ресуспендували. Як фізичну дезінтеграцію використовували ультразвукову обробку суспензії клітин *Lactobacillus acidophilus* К 3111 у дистильованій воді з вмістом сухих речовин $4,78 \pm 0,02\%$. Джерело ультразвуку — ультразвукові ванни ПСБ-1335-05 із робочою частотою 35 кГц, тривалість обробки 600 с [7].

Ензиматичну деструкцію ультразвукового дезінтеграту біомаси здійснювали за допомогою ферментів, характеристику яких наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Характеристика ферментів

Назва ферменту	Походження	pH оптимум	Температурний оптимум, °C	Переважаюча специфічність
Панкреатин, ПА* 370 Од/г	Підшлункова залоза свиней	7—9	35—39	Lys, Arg, Tyr, Phe, Leu, Val, Asp, Met
Протосубтилін, ПА 70 Од/г	<i>Bacillus Subtilis</i>	6—9	35—45	Ser, Gli, Tyr, Phe
Папаїн, ПА 10 Од/мг	<i>Papaya latex</i>	5—8	35—50	Lys, Arg, Gli
Лізозим, МА** 12 Од/г	Білок курячого яйця	5—8	35—50	β -1→4

Примітка: *ПА — протеолітична активність; **МА — мурамідазна активність.

Варіювали співвідношення фермент: субстрат (вміст сухих речовин БМ) у діапазоні від 1:50 до 1:300 та тривалість інкубації реакційної суміші — 10—300 хв. Ферментоліз зупиняли екстремим нагріванням до температури 100°C, суміш охолоджували, відокремлювали рідку фазу від твердої шляхом центрифугування протягом 10 хв при 8000 хв⁻¹.

Ефективність деградації пептидогліканів *Lactobacillus acidophilus* К 3111 оцінювали за накопиченням у реакційному середовищі амінокислот і низькомолекулярних пептидів (НМП) [8].

У рідкій фазі контролювали також вміст муропептидів за розробленим методом. До гідролізату бактеріальних клітин, об'ємом 50 см³ з вмістом сухих речовин додавали 20 см³ розчину трихлороцтової кислоти концентрацією 20% для осадження високомолекулярних білків, залишали на 30 хв, центрифугували протягом 10 хв при 5 хв⁻¹. Проводили декантацію, до надосадової рідини додавали натрій гідроксид 1н до нейтральної реакції. Далі розчинну фракцію гідролізату піддавали іонообмінній хроматографії з використанням катіоніту КУ-2. Підготування колонки проводили за методикою [8]. 50 см³ нейтралізованої надосадової рідини автолізата пропускали через колонку зі швидкістю 1 см³/хв. Далі колонку промивали 100 см³ дистильованої води та проводили елювання адсорбованих катіонів (амінокислот, пептидів та муропептидів), пропускаючи через колонку 50 см³ 6н NH₄OH зі швидкістю близько 1 см³/хв. Потім колонку промивали 200 см³ води. Елюент відбирали об'ємом 50 см³, наявність білкових сполук у фракціях визначали додаванням 1 см³ одновідсоткового розчину нінгідрину, суміш витримували на киплячій водяній бані протягом 15 хв. Поява синьо-фіолетового забарвлення свідчила про наявність білкових речовин. Фракції елюенту з вмістом білкових речовин об'єднували та концентрували на водяній бані до вмісту сухих речовин 6%, потім додавали 50 см³ води і знову випарювали для видалення слідів аміаку. Отриманий елюент являв собою суміш амінокислот, низькомолекулярних пептидів і муропептидів з молекулярною масою до 1500 Да. Далі відбирали 0,5 см³ препарату та додавали реактив Антрона, який готували за відомою методикою [9]. Суміш витримували на киплячій водяній бані протягом 10—30 хв та вимірювали оптичну густину на фотоколориметрі при 670 нм у кюветі 3 мм відносно розчину порівняння. Розчин для порівняння готували, як описано вище, але замість розчину досліджуваного препарату додавали

воду дистильовану. Вміст мурупептидів знаходили за калібрувальним графіком. Калібрувальний графік будували, використовуючи стандартний розчин мурупептидів — МДП (Sigma, Німеччина).

Результати і обговорення. В основу дослідження покладено гіпотезу, за якою якісний і кількісний вміст мурупептидів можна визначити за допомогою реакції їхньої вуглеводної складової (залишки глюкози у складі мурамової кислоти та N-ацетилглюкозаміну) з реактивом Антрона. Метод засновано на розщепленні вуглеводів до моносахаридів у сильнокислому середовищі з подальшою їхньою дегідратацією й утворенням гідроксиметилфурфурола, при взаємодії якого з реактивом Антрона виникають комплексні сполуки синьо-зеленого кольору.

Для підтвердження цієї гіпотези визначено залежність інтенсивності забарвлення продуктів взаємодії реактиву Антрона з мурупептидами відомої концентрації (МДП, Sigma, Німеччина) (рис. 2) та побудовано калібрувальний графік на основі даних досліджень (рис. 3).

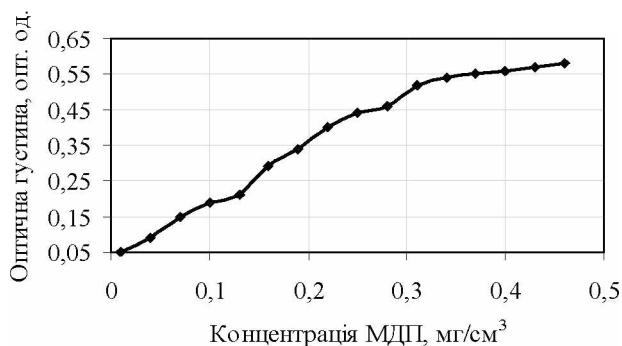


Рис. 2. Залежність інтенсивності забарвлення продуктів взаємодії реактиву Антрона з МДП

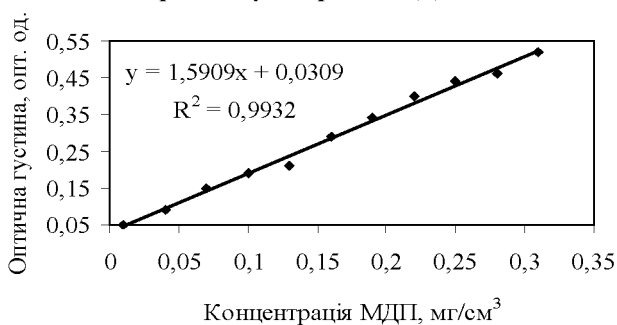


Рис. 3. Калібрувальний графік для визначення мурупептидів

У результаті взаємодії складових МДП з реактивом Антрона, реакційне середовище набувало характерного синьо-зеленого забарвлення. Встановлено, що в межах концентрацій МДП 0,01—0,3 мг/см³, залежність інтенсивності забарвлення реакційного середовища від концентрації МДП має лінійний характер,

що дало змогу побудувати калібрувальний графік для визначення мурупептидів. Коефіцієнт достовірності апроксимації $R^2 \approx 1$, що відповідає високому ступеню відповідності трендової моделі до вихідних даних.

Для проведення реакції з мурупептидами у складі бактеріального дезінтеграту необхідною умовою є позбавлення від сполук, що можуть впливати на чистоту експерименту, зокрема вуглеводів, кислот, солей тощо, тому його очищення доцільно проводити за допомогою іонообмінної хроматографії з катіоном КУ-2, а визначення вмісту мурупептидів — за калібрувальним графіком після реакції з реактивом Антрона.

У табл. 2 наведено дані стосовно визначення вмісту мурупептидів у бактеріальних ферментолізатах залежно від природи ферменту, за режимів, які обумовлюють максимальне накопичення продуктів деградації пептидогліканів у реакційних середовищах.

Таблиця 2. Вміст мурупептидів у дезінтегратах *Lactobacillus acidophilus* К 3111, отриманих шляхом послідовної обробки ультразвуком та ферментами, мг/см³, ($n=3$, $p \geq 0,95$)

Умови ферментативного гідролізу	Амінокислоти, мг/см ³	НМП, мг/см ³	Мурупептиди, мг/см ³
Панкреатин E:S* 1:100 $\tau = 240$ хв	11,23	4,11	0,36
Папаїн E:S 1:100 $\tau = 180$ хв	13,15	4,86	1,42
Протосубтилін E:S 1:200 $\tau = 300$ хв	9,36	2,18	0,28
Лізоцим:Папаїн 1:2 E:S 1:100 $\tau = 180$ хв	15,15	7,44	2,35

Примітка: *E:S — співвідношення фермент:субстрат.

Усі зразки перед ферментолізом піддавали ультразвуковій дезінтеграції з метою порушення цілісності бактеріальних клітин, що дає змогу підвищити ефективність роботи ферментів. Як видно з табл. 2, найбільш ефективною є деградація пептидоглікану *Lactobacillus acidophilus* К 3111 за обробки папаїном та композицією ферментів лізоцим:папаїн, при цьому накопичується максимальна кількість продуктів деградації: амінокислот, НМП, мурупептидів. Суттєву різницю ефективності гідролізу протеазами різного походження можна пояснити їхньою субстратною специфічністю. Ареал субстратної специфічності папаїну є найбільш прийнятним стосовно деградуючої дії до пептидних зв'язків пептидоглікану. Поєднання папаїну з лізоцимом значно підвищує ефективність ферментолізу, адже наявність мурамідазної активності композиції ферментів, яка належить лізоциму, обумовлює гідроліз β 1→4 глікозидних зв'язків між мурамовою кислотою та N-ацетилглюкозаміном та сприяє таким

чином збільшенню ймовірності контакту протеази з пептидними містками в паралельних ланцюгах пептидоглікану (рис. 1).

Висновки

Розроблений метод забезпечує можливість кількісного визначення цільового продукту у складі бактеріальних гідролізатів — мурупептидів. Використання МДП як модельного зразка мурупептидів для побудування калібрувального графіка за участю реактива Антрона забезпечує високу точність аналізу. Наявність біологічно активних мурупептидів у бактеріальних дезінтегратах свідчить про те, що отримані субстанції є перспективними компонентами імунотропних функціональних харчових інгредієнтів. Пропонований метод не передбачає використання високоартісних реактивів та обладнання, що обумовлює можливість його реалізації у випробувальних лабораторіях харчових підприємств, які орієнтуються на виробництво функціональної їжі.

Література

1. Капустян А. И., Черно Н. К. Перспективы использования биологически активных бактериальных гидролизатов для нутритивной поддержки населения с расстройствами иммунной системы. *Пищевая наука и технология*. 2015. № 2(31). С. 18—25. DOI: 10.15673/2073-8684.31/2015.44263
2. Irazoki O., Hernandez S. B., Cava F. Peptidoglycan Muropeptides: Release, Perception, and Functions as Signaling Molecules. *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10. Article 500. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00500.
3. Traub S., Aulock V. S., Hartung T., Hermann C. MDP and other muropeptides — direct and synergistic effects on the immune system. *J Endotoxin Res.* 2006. № 12. P. 69—85. DOI: 10.1179/096805106X89044.
4. Методы общей бактериологии: Том 2. Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1984. 472 с.
5. Гаврилин М. В., Сеньчукова Г. В., Сенченко С. П. Выбор оптимальных условий получения гидролизатов молочнокислых бактерий термокислотным способом. *Хим.-фарм. журн.* 2007. Т. 41, № 2. С. 54—56.
6. Сенченко С. П., Самойлов В. А., Гостищева Н. М., Сеньчукова Г. В., Гаврилин М. В. Изучение состава препарата, полученного на основе гидролизата молочнокислых бактерий. *Хим.-фармац. журн.* 2005. Т. 39, № 3. С. 51—53.
7. Капустян А. І. Характеристика імунотропних функціональних інгредієнтів, отриманих шляхом фізичного впливу. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології ім. С. З. Гжицького*. 2017. Т. 19, № 75. С. 13—18. DOI: 10.15421/nvlvet7503.
8. Kapustian A., Chernov N. Obtaining and characteristic of the autolysate of lactic acid bacteria. *EUREKA: Life Sciences*. 2018. #1, 24—31 DOI: 10.21303/2504-5695.2018.005583.
9. Morris D. L. Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent. *Science*. 1948. 107 (2775). P. 254—255. DOI: 10.1126/science.107.2775.254.