

6.2 Вміст органічних та мінеральних речовин в фільтратах ультразвукових дезінтегратів і метаболітних комплексах лактобактерій і сахароміцетів

Протимікробні властивості екзометаболітів і компонентів мікробних клітин пробіотичних штамів бактерій забезпечують біологічно активні речовини: бактеріоцини, лізоцим, каталази, ферменти, амінокислоти, поліпептиди, коротколанцюгові жирні кислоти, поліаміни, поліфосфати, тощо [682, 683]. Наявність та відмінність складових у мікробних клітинах залежить від заданих умов культивування, а саме температури і концентрації азоту в останньому, кількості посівного матеріалу, тощо. Відомо збільшення вмісту білка і РНК при зниженні температури інкубації. Також має місце накопичення вільних амінокислот (перший внутрішньоклітинний фонд або пул) і при внесенні клітин в свіже живильне середовище, особливо з високою концентрацією поживних речовин, внаслідок осмотичного шоку, виходу із клітини. Більш постійними є вільні амінокислоти «внутрішнього» резервного пулу. Вони беруть участь у біосинтезі білків і при інтенсивному розмноженні клітин складають більше 10 % від загального азоту. Таким чином, відмінність умов культивування сприяє одержанню неоднакових за складом біологічно активних речовин.

Метою даної роботи стало вивчення складу метаболітних комплексів і клітинних структур *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii*, одержаних за авторською методикою, щодо обґрунтування перспективності їхнього застосування для створення нових поліфункціональних препаратів.

Метаболітні комплекси і фільтрати ультразвукових дезінтегратів отримували із мікробних клітин *Lactobacillus rhamnosus* GG (симбіотик PREEMA®, «Schonen», Швейцарія) та *Saccharomyces boulardii* (пробіотичний препарат BULARDI®, «Schonen», Швейцарія). Суспензії пробіотичних мікроорганізмів готували відповідно до стандарту мутності за шкалою McFarland за допомогою приладу Densi-La-Meter («PLIVA-Lachema Diagnostika», Чехія) і доводили до оптичної щільності 10,0 од. McFarland.

Отримання структурних компонентів (ультразвукових дезінтегратів, клітинних структур) *L. rhamnosus* GG (L) і *S. boulardii* (S) здійснювали ультразвуковим випромінюванням генератору ГЗ–109 [684, 685], які в подальшому застосовували для вирощування пробіотичних культур *L. rhamnosus* та *S. boulardii* і вивчення їхнього складу. Перед дослідженням структурні компоненти центрифугували при 1000 g протягом 30 хв, а супернатант фільтрували за допомогою мембранних фільтрів «Владіпор» МФАС-Б № 4 з діаметром пор 0,2 мкм [684, 685].

Екзометаболіти (продукти життєдіяльності, метаболітні комплекси) *L. rhamnosus* (ML) або *S. boulardii* (MS) отримували культивуванням продуцентів у власних структурних компонентах, метаболіти *S. boulardii* – у структурних компонентах *L. rhamnosus* (LS), комбінації метаболітів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* – у структурних компонентах лактобактерій (MLS) [684, 685].

Вивчено склад шести експериментальних зразків: фільтрати ультразвукових дезінтегратів лактобактерій (L) і сахароміцетів (S) (містять структурні компоненти бактеріальних клітин); фільтрати культур лактобактерій (ML), сахароміцетів (MS), вирощених у власних ультразвукових дезінтегратах (містять структурно-метаболітні комплекси бактеріальних клітин або грибів); фільтрати спільних культур лактобактерій із сахароміцетами (MLS), вирощених в ультразвукових дезінтегратах лактобактерій (містять структурно-метаболітні комплекси бактеріальних клітин і грибів); фільтрати культур сахароміцетів (LS), вирощених в ультразвукових дезінтегратах лактобактерій (містять структурно-метаболітні комплекси бактеріальних клітин і грибів).

Біохімічний аналіз одержаних фільтратів ультразвукових дезінтегратів і метаболітних комплексів пробіотичних штамів мікроорганізмів проводили за класичними методами: білок методом Lowry О. Н., після осадження та гідролізу білка визначали вміст вуглеводних сполук та ліпідів [686 – 688]. Тейхоєві кислоти визначали за методом Baddiley J., Davison A. L. Кількість молочної кислоти («Лактат-01-Вітал», ТОВ «Вітал діагностика», РФ), неорганічного

фосфору, калію, кальцію, натрію, хлору, заліза (Human, Німеччина), цинку («Zink-DAC.Lq»), міді («Copper-DAC.Lq» (DAC-SpectroMed s.r.l., Молдова), магнію («Для визначення магнію в біологічних рідинах з ксилідиловим синім», ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», Україна) встановлювали згідно з інструкціями, використовуючи біохімічний аналізатор Sapphire-400 (Японія).

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали з використанням програмних пакетів «Excel 2007, 2010» («Microsoft», США) та «Statistica 8.0, 10.0» (StatSoft Inc., США). Всі дослідження проводили в трьох повторях. Обчислювали середнє арифметичне ($\bar{x}$), стандартне відхилення середнього арифметичного (SD), стандартну похибку (SE). Відмінності вважали статистично значущими при значеннях $p < 0,05$. Для уніфікації значень, наочності та зручності щодо порівняння, всі показники приведено до єдиної форми та надано в однакових одиницях – мкг.

Результати експериментальних досліджень складових метаболітичних комплексів щодо біохімічних показників, представлені в попередніх публікаціях, показали наявність сирого протеїну в усіх дослідних пробах [689, 690]. До його складу входить азот білкового та небілкового походження. При визначенні кількісного співвідношення зазначених азотистих сполук встановлено, що в менших концентраціях міститься небілковий азот. Білковий азот переважає у складі всіх дослідних проб (виключення L).

За даними експериментальних досліджень щодо вмісту органічних речовин, представлених в Табл. 1, спостерігалася домінуюча кількість білків із домішками вуглеводів, ліпідів, тощо в дослідних фільтратах *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* ніж у метаболітичних комплексах.

Таблиця 1

Вміст органічних речовин в фільтратах ультразвукових дезінтегратів і метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*

Біологічно активна речовина	Найменування показників / Середні концентрації, мкг/мл, ($\bar{x} \pm SE$)			
	білок	вуглеводи	ліпіди	тейхоєві кислоти (гліцерол-ТК та рибітол-ТК)
L	6731,3 $\pm$ 60	17,6 $\pm$ 0,4	92,1 $\pm$ 1,5	371,9 $\pm$ 4,5
ML	13320,3 $\pm$ 614,7	21,1 $\pm$ 0,1	89,1 $\pm$ 0,6	263,4 $\pm$ 6,1
MLS	8225 $\pm$ 608,89	11,35 $\pm$ 0,4	29,1 $\pm$ 1,6	231,4 $\pm$ 35,8
S	1850 $\pm$ 49,0	86,5 $\pm$ 0,3	17,1 $\pm$ 0,3	179,6 $\pm$ 2,5
MS	2070 $\pm$ 15,9	88,1 $\pm$ 0,1	20,2 $\pm$ 0,3	154,8 $\pm$ 12,8
LS	2330 $\pm$ 105,4	6,9 $\pm$ 0,2	21,4 $\pm$ 0,4	135,1 $\pm$ 10,3

Найбільша кількість вуглеводів встановлена в зразках *S. boulardii*, ніж у пробах *L. rhamnosus* GG, згідно з Табл. 1. В фільтратах ультразвукових дезінтегратів сахароміцетів їх вміст перебільшував аналогічні показники проб лактобактерій в 4,9 раза ($p < 0,001$). В метаболітних комплексах пробіотичних грибів вуглеводів було в 4,1 раза більше порівняно з вмістом у продуктах життєдіяльності лактобактерій ($p < 0,001$). Серед всіх дослідних речовин *S. boulardii* домінуючий їх вміст спостерігався в MS. Визнано, що екзополісахариди пробіотичних штамів мікроорганізмів стимулюють ріст мікробних клітин пробіотиків і синтез ними інших корисних метаболітів (амінокислот, летючих жирних кислот, вітамінів) [691, 692]. Відома здатність екзополісахаридів *Lactobacillus* пригнічувати ріст ентеропатогенної кишкової палички і стафілококів в товстому кишечнику при холодовому, іммобілізаційному і етаноловому стресах [692].

Тейхоєві кислоти (ТК) в фільтратах ультразвукових дезінтегратів та метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* спостерігалися в різних концентраціях щодо даних Табл. 1. В дослідних речовинах *L. rhamnosus* GG

вміст гліцерол-ТК та рибітол-ТК складає (231,4 – 371,9) мкг/мл, а в пробах *S. boulardii* – (135,1 – 179,6) мкг/мл. Отже, найбільша їх концентрація спостерігається в пробах лактобактерій. Вони не вчиняють прямий протимікробний ефект щодо збудників хвороб, але імуностимулюючи впливають на макроорганізм, чим опосередковано підвищують боротьбу з етіологічно значущими збудниками хвороб [693, 694].

Таким самим чином діють ліпіди мікробних клітин. В фільтратах *L. rhamnosus* GG їх вміст складає: (29,1 – 92,1) мкг/мл, а *S. boulardii* (17,1 – 20,2) мкг / мл за даними Табл. 1.

Відомо, що основний протимікробний ефект похідних пробіотичних штамів мікроорганізмів обумовлено їхніми білковими сполуками [695, 696]. Результати протеїново-пептидного складу, із визначенням молекулярних мас окремих фракцій дослідних речовин *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* із застосуванням високоефективної рідинної гель-проникаючої хроматографії, надані в попередній публікації [690]. Також в цій роботі представлені дані експериментальних досліджень щодо залежності складу фракцій та протимікробної активності ультразвукових дезінтегратів і метаболітичних комплексів пробіотичних мікроорганізмів стосовно грампозитивних і грамнегативних збудників.

Фільтрати *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* містять, в незначних кількостях, мінеральні речовини, зокрема магній, цинк, мідь, дані яких представлені в Табл. 2. Мікроелементи відіграють важливу роль в регулюванні обміну речовин та є стимуляторами росту та активаторами ферментів.

За результатами вмісту органічних кислот у дослідних речовинах, наданими в Табл. 2, у значних концентраціях виявлена молочна кислота. Для зручності порівняння її значення теж представлено в мкг. Найбільша кількість молочної кислоти спостерігалася в зразках ML ($11910,4 \pm 51,8$ мкг / мл). На другому місці розташувалися проби L та MLS ($5066,09 \pm 132,7$ мкг / мл і $5139,7 \pm 297,4$ мкг / мл відповідно): в них концентрація молочної кислоти була майже на одному рівні. Проте дані значення вдвічі нижчі ніж в пробі ML.

Таблиця 2

Вміст органічних кислот і мінеральних речовин у фільтратах
ультразвукових дезінтегратів та метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*

До слідна	Середні показники концентрації, мкг / мл, ($x \pm SE$)					
	молочна кислота	мурашина кислота	бензолова кислота	магній	цинк	мідь
L	5066,1 $\pm$ 132,7	-	-	5,4 $\pm$ 0,2	30,6 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,1
ML	11910,4 $\pm$ 51,8	9 $\pm$ 0,6	5,3 $\pm$ 0,3	14,4 $\pm$ 0,2	16,2 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1
MLS	5139,7 $\pm$ 297,4	-	-	-	84,7 $\pm$ 5,7	1,6 $\pm$ 0,07
S	535,1 $\pm$ 20,7	-	-	-	75,7 $\pm$ 2,4	1,3 $\pm$ 0,1
MS	745,6 $\pm$ 9,9	-	-	-	55,9 $\pm$ 1,7	1,9 $\pm$ 0,2
LS	2381,7 $\pm$ 133,1	-	-	-	45,9 $\pm$ 1,7	1,9 $\pm$ 0,2

Найменші показники молочної кислоти спостерігалися в фільтратах S та MS, що представлено у Табл.2. Мікроорганізми *Saccharomyces* sp., які здатні продукувати молочну кислоту, є перспективними біооб'єктами для біотехнологічної промисловості [697]. Поряд з вираженою протимікробною, протибіоплівковою дією молочної кислоти, її впливом на морфологічні властивості, функціональний стан мікробних клітин умовно-патогенних мікроорганізмів, відоме стимулювання нею зростання лактобактерій і здатність останніх щодо утворення біоплівок [698].

Концентрація молочної кислоти в речовинах *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, отриманих за авторськими способами, не корелює з вираженістю їх антибактеріальних властивостей. Це ґрунтується на наступних даних. Вміст молочної кислоти в зразках L близький до кількості даного компонента в пробах MLS. Проте їх протимікробна активність відмінна: MLS чинить вірогідно більший ефект щодо патогенних і умовно-патогенних бактерій, ніж L. Таким чином, молочна кислота не є основним протимікробним компонентом дослідних речовин відносно збудників хвороб. Це співпадає з даними інших авторів, які вважають обумовленість антибактеріальної дії речовин лактобактерій не лише

молочною кислотою і не виключають можливість синергетичної протимікробної дії останньої з пептидними речовинами [698, 699].

Найбільша концентрація білка, органічних кислот, тощо спостерігалася в пробах лактобактерій ніж сахароміцетів, що представлено в Табл. 1 і Табл. 2. Так, кількість білка L в 3,6 раза більше порівняно з S ($p < 0,001$), а в ML даний показник перебільшує в 6,4 раза аналогічні значення в MS ($p < 0,01$). Вміст *тейхоєвих кислот* (гліцерол та рибітол) більший в L ніж S (в 2,1 раза, $p < 0,01$) та в ML ніж MS (в 1,5 раза, $p < 0,01$). Концентрація ліпідів у зразках *L. rhamnosus* GG вища порівняно з фільтратами *S. boulardii*: L відносно S (в 5,4 раза, $p < 0,01$), а ML щодо MS (в 4,4 раза, $p < 0,01$). Це свідчить, що, в заданих умовах культивування, більша кількість речовин продукується в процесі життєдіяльності *L. rhamnosus* GG порівнюючи з *S. boulardii*.

Досліджувані фільтрати сахароміцетів, отримані за авторським способом, містять переважну кількість білкових сполук. Відомо, що концентрація одержаного білка залежить від попередньої обробки, кількості мікробних клітин, температури, потужності, типу ультразвукового пристрою [700 – 703]. Збільшення потужності ультразвукового чинника та терміну впливу на клітини *S. cerevisiae* сприяє більшому їхньому руйнуванню й виділенню білка. Мікробні клітини *S. cerevisiae* містять білки, ферменти, полісахариди, чим значимі для виробництва біопрепаратів [700]. При низькій акустичній інтенсивності (10 Вт / см^2) більше виділяються полісахариди, а при більш високій (24 і 39 Вт / см^2) – білки. Ультразвукова обробка клітин сахароміцетів сприяє отриманню білка у високих концентраціях (від $4,2 \text{ мг/мл}$ до $16,0 \text{ мг/мл}$), в залежності від режиму впливу, на відміну від менш ефективного хімічного лізису [701]. Дані цих авторів перевищують власні показники. Звідси виходить, що для максимальної продуктивності білкових компонентів важливо створити необхідні умови впливу на мікробні клітини *Saccharomyces* та вибрати оптимальний механізм щодо їх отримання [702, 703]. При чому, якісний та кількісний склад біологічно активних речовин можна корегувати завдяки зміні параметрів ультразвукового чинника. Наступними авторами також, при застосуванні фізичних чинників, досягалася

екстракція білка у високих концентраціях із мікробних клітин сахароміцетів [704]. Отже, значну концентрацію білкових сполук із клітин *Saccharomyces* можна отримати при відповідному впливі ультразвуку, що має цінність при одержанні білкових речовин сахароміцетів. Зазначене обґрунтовує переважну кількість білків у пробі фільтратів ультразвукових дезінтегратів *S. boulardii* і вдалість запропонованого способу щодо їх отримання. Роблячи висновок можна зазначити: метаболітні комплекси і клітинні структури *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii*, одержані за авторською методикою, являються перспективними об'єктами для створення нових поліфункціональних препаратів.