

Альтернативные антимикробные агенты, полученные селективной сорбцией из культуры *Lactobacillus helveticus D75*

Г.В. Рябинин, georgij.ryabinin@mail.ru

канд. техн. наук. Д.А. Бараненко, denis.baranenko@itmo.ru

Университет ИТМО

190002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

Исследовались антимикробные свойства экзометаболитов пробиотического штамма *Lactobacillus helveticus D75* (продуцирующего бактериоцин – гелветицин J), выделенных из супернатанта хроматографическим методом. Хроматографическое выделение пептидных фракций осуществляли с использованием полимерного гетеросетчатого сорбента на основе метакриловой кислоты и диметакрилата этиленгликоля, синтезированного в Институте высокомолекулярных соединений РАН. Элюирование проводилось в изократическом режиме. Антимикробную активность полученных пептидных фракций по отношению к индикаторной культуре *E. coli* ATCC 10798 определяли турбидиметрическим методом при $\lambda = 600$ нм. При этом были определены оптимальные параметры хроматографического процесса. Было показано, что все целевые биологически активные вещества связывались сорбентом при кислых значениях pH. Фракция, полученная при элюировании раствором с pH 8, обладала наибольшей способностью ингибировать рост индикаторной культуры. Антимикробное действие фракции оказалось сопоставимо с действием ампициллина в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* (при этом для подтверждения пептидной природы антимикробного действия индикаторную культуру инкубировали на среде с добавлением фракции, обработанной протеолитическим ферментом трипсином). Таким образом, можно было заключить, что пептидная фракция, полученная в процессе хроматографического выделения из супернатанта *L. helveticus D75*, обладает высокой антибактериальной активностью в отношении микроорганизмов, вызывающих порчу пищевых продуктов.

Ключевые слова: бактериоцины; антимикробные пептиды; пробиотические штаммы лактобацилл; хроматография на полимерных сорбентах; пищевые консерванты.

DOI: 10.17586/2310-1164-2020-10-1-81-90

Alternative antimicrobial agents obtained by selective sorption from *Lactobacillus helveticus* culture

Georgii V. Riabinin, georgij.ryabinin@mail.ru

Ph. D. Denis A. Baranenko, denis.baranenko@niuitmo.ru

ITMO University

9, Lomonosov str., St. Petersburg, 191002, Russia

The antimicrobial properties of exometabolites of the *Lactobacillus helveticus D75* probiotic strain (producing bacteriocin-helveticin J) isolated from the supernatant by chromatographic method were investigated. Chromatographic isolation of peptide fractions was performed using a polymer heteroporous sorbent based on methacrylic acid and ethylene glycol dimethacrylate synthesized at the Institute of High-molecular Compounds of the Russian Academy of Sciences. Elution was performed in isocratic mode. The antimicrobial activity of the obtained peptide fractions in relation to the indicator culture of *E. coli* ATCC 10798 was determined by the turbidimetric method at $\lambda = 600$ nm. The optimal parameters of the chromatographic process were determined. It was shown that all target biologically active substances were bound by the sorbent at acidic pH values. The fraction obtained by elution with a pH 8 solution had the greatest ability to inhibit the growth of the indicator culture. The antimicrobial action of the fraction was comparable to that of ampicillin against the *Escherichia coli* gram-negative bacterium (in order to confirm the peptide nature of the antimicrobial action, the indicator culture was incubated on a medium with the addition of a fraction treated with the proteolytic enzyme trypsin). Thus, it could be concluded that the peptide fraction obtained in the process of chromatographic isolation from the *L. helveticus D75* supernatant has a high antibacterial activity against microorganisms that cause food spoilage.

Keywords: bacteriocins; antimicrobial peptides; probiotic strains of lactobacilli; chromatography on polymeric sorbents; food preservation.

Введение

Растущий потребительский спрос на натуральные и безопасные продукты питания способствовал исследованиям бактериоцинов, которые позволили наладить промышленное получение некоторых бактериоцинов и усовершенствовали их коммерческое применение. Бактериоцины, являясь белками, очень привлекательны для все более и более скептически относящейся к химическим консервантам промышленности и потребительской общественности. Для применения ранее не использовавшихся бактериоцинов необходимо полностью изучить их физико-химические свойства, структуру и функции.

Применение бактериоцинов в консервировании пищевых продуктов обычно осуществляется тремя способами. Первый – это прямое применение живых клеток бактериоцина – продуцента к пищевому продукту. При этом, чтобы данный метод был эффективным, вносимый продуцент должен быть способен производить бактериоцин непосредственно в пищевом продукте. Второй способ – применение очищенных или получищенных бактериоцинов в качестве пищевых консервантов. В пищевой продукт вносится выделенный из культуры штамма-продуцента бактериоцин. Третий способ заключается в применении продукта, предварительно ферментированного штаммом, продуцирующим бактериоцин. При этом необходимо, чтобы концентрация бактериоцина, выделенного штаммом-продуцентом в среду пищевого продукта за время ферментации, была достаточной для консервирующего эффекта [1].

Одним из подходов к поиску новых перспективных консервантов является получение антимикробных соединений синтезируемых пробиотическими молочнокислыми бактериями [2]. Но при этом для изучения свойств антимикробных пептидов необходимо разработать метод их выделения, который позволил бы сохранять нативную структуру пептидов [3]. Благодаря своей технологической гибкости жидкостная хроматография в настоящее время является наиболее широко используемым методом выделения и очистки целевых бактериальных метаболитов [4]. Данный способ основан, с одной стороны, на использовании сорбентов, избирательно сорбирующих целевое биологически активное вещество, с другой стороны, на использовании термодинамически и кинетически выгодных динамических режимов сорбции [5].

Пробиотики содержат живые или инактивированные апатогенные микроорганизмы, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, а также продукты их активности или факторы роста для микробов нормофлоры (пребиотики) и их рациональных сочетаний друг с другом (синбиотики). Эта группа препаратов оказывает положительное влияние на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма человека путем стабилизации и оптимизации функций его нормальной микрофлоры [6].

При производстве пробиотиков для медицинского применения используются штаммы продуцентов с подтвержденным клиническим эффектом, депонированные в национальной или международной коллекции. Лактосодержащие пробиотики представляют собой биомассу одного или нескольких видов живых бактерий рода *Lactobacillus*, сублимированных в защитной среде [7]. Промышленный штамм *Lactobacillus helveticus* D75 используется для производства препарата Витафлор и хранится в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ОСХН РАН (ВКСМ) под номером РСАМ03109. Показано, что данный штамм может быть применен в технологии производства пищевых продуктов [8], в том числе с сохранением его активности после всех этапов производства с получением продукции с пробиотическими свойствами [9].

Технологический процесс производства бактериальных препаратов включает получение целевого продукта (биомассы бактерий) и отходов (нативной среды, в которой культивировались микробные клетки). Последние содержат ряд соединений (в том числе экзометаболиты лактобацилл), среди которых имеются ингибиторы и стимуляторы роста микроорганизмов.

Для получения препаратов, содержащих биомассу лактобацилл, используют комплексную питательную жидкую среду de Man, Rogosa, Sharpe (MRS-1) [10], содержащую пептон, а также дрожжевые и мясные экстракты. Производственную культуру выращивают путем глубинного культивирования в реакторах, оборудованных мешалкой и паровой рубашкой. При этом нативную жидкость отделяют от микробной культуры на стационарной фазе роста последней, когда ее концентрация в среде достигает $5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Затем бактериальную массу концентрируют. После чего полученный концентрат разбавляют защитной средой (желатин + сахароза + молоко) и разливают в бутылки, которые направляют на стадию сублимационной сушки. После этого флаконы укупоривают в атмосфере азота,

маркируют, упаковывают и контролируют готовую продукцию в соответствии с ГОСТ 52249-2004 Правила производства и контроля качества лекарственных средств. При этом, в соответствии с директивой Европарламента от 19 ноября 2008 (Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 On waste and repealing certain directives), производители обязаны осуществлять обезвреживание и отдельную переработку отходов, не допуская их прямого попадания в окружающую среду. Кроме того, в соответствии со статьей 11 Федерального Закона № 89 «Об отходах производства и потребления» (редакция от 29.12.2014), вступившего в силу с 1 февраля 2015 года, при эксплуатации предприятий, связанных с обращением с отходами, производители обязаны внедрять малоотходные технологии, основанные на новейших научно-технических достижениях. Тем более, что хотя, по мнению Н.П. Елинова [11] «отходы биотехнологических производств относятся, как правило, к типу разлагающихся в естественных условиях под воздействием различных факторов (биологических, химических, физико-химических)», их попадание в окружающую среду без нейтрализации может нанести непоправимый вред природе.

Однако процесс утилизации такого большого количества жидких отходов путем их многоступенчатой обработки неизбежно приводит к увеличению стоимости целевого продукта. Таким образом, одним из важнейших направлений устойчивого развития является переход на экологически чистые технологии производства. Вследствие чего, на современном этапе развития микробиологической промышленности особое значение приобретает разработка безотходных или малоотходных биотехнологий на основе научных исследований в области микробиологии, молекулярной биологии и генной инженерии.

Метаболиты лактобацилл

Бактерии рода *Lactobacillus* в течение своей жизни продуцируют аминокислоты, летучие жирные кислоты, бактериоцины и бактериоциноподобные вещества, спирты, перекись водорода, лизоцим. При этом бактериоцины – вещества белковой природы, оказывающие активное ингибирующее действие на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы. Ранее данная группа веществ называлась колицинами (поскольку основным, известным в то время микроорганизмом, продуцирующим эти вещества, была кишечная палочка) [12, 13]. Термин «колицины» позднее был заменен на бактериоцины.

Бактерии рода *Lactobacillus* являются неотъемлемой частью микробиоты человека и выполняют ряд важных функций, таких как участие в обменных процессах и защита от внешних инфекций. Защитная функция бактерий рода *Lactobacillus* заключается в прямом и косвенном антагонизме к патогенным и условно-патогенным микробам. К прямым механизмам такого антагонизма относится синтез бактериями рода *Lactobacillus* ингибиторов, нарушающих метаболизм посторонних микроорганизмов. В то время как к непрямым методам подобного антагонизма относится, в частности, активация иммунной системы человека (то есть иммуномодулирующие свойства *Lactobacillus*) [14].

Способность бактерий продуцировать бактериоцины определяется наличием в клетке бактериоциногенных факторов, представляющих собой специфические генетические детерминанты. Бактериоцины представляют собой группу биологически активных веществ микробного происхождения пептидной природы, водорастворимых, безвкусных и непахучих, неканцерогенных, неаллергенных и активных даже в низких концентрациях.

В последнее время микробные пептиды представляют повышенный интерес в качестве терапевтических агентов, поскольку в отличие от пептидов, выделенных из животных и растений, они взаимодействуют с мембраной бактерий и не токсичны для эукариотических клеток человека и животных [3, 14]. Еще одним важным отличием бактериоцинов от обычных антибиотиков является то, что они характеризуются избирательным действием на сопутствующую микробиоту, не задерживая ее рост и развитие. Среди механизмов антимикробного действия бактериоцинов выделяют образование пор в мембране, нарушение формирования клеточной стенки, а также подавление синтеза и расщепления нуклеиновых кислот.

Ряд бактериоцинов, продуцируемых молочнокислыми бактериями были изучены уже достаточно подробно. Существует четыре класса: лантибиотики, термостабильные пептиды (устойчивые при различных значениях pH), большие термостабильные белки, а также комплексы последних с различными углеводными и липидными компонентами [15]. При этом Б.А. Шендеров относит к бактериоцинам бактерий рода *Lactobacillus* только низкомолекулярные пептиды с молекулярной массой от 3 до 8 КДА,

активные в нейтральной или чаще кислой среде (наиболее благоприятным считается рН, равный 5–6); как устойчивые, так чувствительные к нагреванию. К таким веществам относятся: лактоцин (продуцент *Lactococcus lactis*); диплацин (продуцент *Lactococcus lactis subs.cremoris*); лактотропин (продуцент *Lactococcus spp*); гелветицин (продуцент – некоторые штаммы *Lactobacillus helveticus*); лактальбумин (продуцент *Lactobacillus brevis*); болгароцин (продуцент *Lactobacillus bulgaricus*); лактоцины В, F, J и М (продуцент *Lactobacillus acidophilus*); плантарицин (продуцент *Lactobacillus plantarum*); педиоцин (продуцент *Pediococcus pentosaceus*) и педиоцин РА-1 (продуцент *Pediococcus acidilactici*).

При этом С.Н. Егоров [16] подразделяет бактериоцины молочнокислых бактерий на две группы. Первая, к которой относятся лактоцины В и F-27, амоловорин, педиоцин N3P, термофилин А, кривацин А, амиловорин L471 и энтерококцин, характеризуется узким спектром антибактериального действия (эти вещества вызывают гибель лишь тех микроорганизмов, которые родственны штамму–продуценту). Вторая группа бактериоцинов ингибирует рост многих грамположительных микроорганизмов (в том числе *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и др.) и включает в себя педиоцин А, ацидоцин В, диацевин В-1, курвацин FS47, лактицин 3147, плантарицин С, энтерококцин, саливарицин, нисин, саркацин 674, мутацин и др.

На биосинтез бактериоцинов грамположительных бактерий влияют такие условия культивирования продуцента, как состав питательной среды, рН, температура и время инкубации. Присутствие в питательной среде метаболитов энтеробактерий стимулирует синтез бактериоцинов [17]. При этом бактериоцины представляют собой внеклеточный продукт, который может быть выделен из жидкой культуральной среды ультрафильтрацией, электрофорезом, хроматографией либо гелхроматографией после частичной очистки.

Помимо бактериоцинов, лактобациллы продуцируют ряд других биологически активных веществ, таких как летучие жирные кислоты (включая молочную кислоту [18]), аминокислоты, перекись водорода, лизоцим, которые могут оказывать стимулирующее действие на нормальную микрофлору, а также проявлять антимикробную активность в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий и иммуномодулирующую активность [19].

Исследования показали, что культуральная среда бактерий рода *Lactobacillus* содержит комплекс антимикробных экзометаболитов. Например, бактерии штамма *L. helveticus* D75 продуцируют гелветицин J. Этот пептид имеет молекулярную массу 37 кДа, обладает определенным спектром бактерицидной активности [20], и в настоящее время даже установлена его аминокислотная последовательность [21].

В связи с этим нам представлялось актуальным проведение эксперимента по определению антибактериального действия нативного раствора (супернатанта), полученного после отделения бактериальной биомассы продуцента штамма *L. helveticus* D75. В результате чего целью настоящей работы стало исследование характеристик антимикробных метаболитов лактобацилл, полученных с помощью одностадийного хроматографического выделения.

Объекты и методы исследования

Пробиотический штамм *Lactobacillus helveticus* D75, входящий в состав препарата Витафлор, был выбран для изучения его антимикробного действия. В геноме *L. helveticus* D75 присутствует ген, содержащий кодирующую последовательность бактериоцина – гелветицина J [22]. Ожидаемая последовательность аминокислот этого бактериоцина известна

10	20	30	40	50
MVKSITPHLV	YRLNGMHHVV	AQGVVNGDH	VFALQLLHSA	HDVLVYRKHE
60	70	80	90	100
GLTKNIDYTD	PHLVMIGFGH	TQTWVPANDK	DEYFVGAKPN	SGNWTQIAR
110	120	130	140	150
VKYPRLPER	YTSNTQLPRL	SHLNHVTDVP	SHLNHVTDVP	EASVSPNGKY
160	170	180	190	200
FMIASIWDDG	SGHFGLFDLN	EVNQKLNENG	TKNTPITDLH	CLSAFHIDNF
210	220	230	240	250
DNPSVAPDEE	MPQMIDSVQG	YAIDDDKNIY	ISNQLSPKIN	HETGEVTTWS
260	270	280	290	300
RKIVKFPWGE	TNSDNWQVAM	VDGIDLDPDRY	SEMESIHVNA	ANDIYLTVAIY
310	320			
HQKYIKGGEY	KLRTLENQIF HITDI			

В эксперименте использовали штаммы *L. helveticus* D75 и *Escherichia coli* ATCC 10798 из коллекции отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины. Лактобациллы выращивали на среде MPC-1 (Hi-media, India). Энтеробактерии культивировали на среде LB (AMRESCO LLC, США). Все бактериальные штаммы инкубировали в аэробных условиях при 37°C в течение 24 ч.

Супернатант отделяли от биомассы центрифугированием и фильтровали. Препаративную хроматографию пептидных фракций супернатанта проводили с использованием полимерного сорбента на основе метакриловой кислоты и диметакрилата этиленгликоля, синтезированного в Институте макромолекулярных соединений РАН [5]. Для проведения хроматографического процесса была собрана экспериментальная установка.

В результате эксперимента было показано, что все целевые биологически активные вещества были связаны сорбентом при кислых значениях pH. Промывку и десорбцию проводили растворами 0,2 N ацетата аммония, pH 4,5; 6; 7; 8 и 10. Для определения антимикробной активности полученных пептидных фракций в качестве индикаторной культуры был выбран штамм *Escherichia coli* ATCC 10798. При этом в тестовых емкостях в культуральную среду, инкубируемую с *E. coli*, каждую из фракций добавляли в объеме 20%, в положительном контроле присутствовал исходный супернатант, а отрицательный контроль содержал «проскок» (супернатант, пропущенный через колонку).

После окончания процесса инкубации мутность микробной суспензии определяли путем измерения оптической плотности при $\lambda = 600$ нм. При этом было показано, что все полученные фракции супернатанта при добавлении в культуральную среду снижали оптическую плотность клеточной суспензии индикаторной культуры по сравнению с отрицательным контролем. Причем наименьшая оптическая плотность наблюдалась при добавлении фракции, полученной при элюировании раствором с pH 8. В результате чего мы предположили, что эта фракция обладает максимальной способностью ингибировать рост индикаторной культуры *E. coli* ATCC 10798 и именно она была выбрана для дальнейшего анализа.

Для изучения влияния на рост индикаторной культуры в системе *in vitro* в жидкую культуральную среду LB добавляли 100-кратную концентрированную активную фракцию пептидов (P^*) в количестве 0,1 и 0,2% от объема среды и наблюдали скорость роста энтеробактерий. Для сравнительного анализа степени ингибирующего действия экзометаболитов лактобацилл в питательную среду добавляли антибактериальный препарат ампициллин в концентрации 10 мг/л. Для доказательства пептидной природы антимикробной активности исследуемой фракции ее обрабатывали протеолитическим ферментом трипсином. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с использованием программы *Mathcad 14*. При этом результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На основании сравнительного анализа полученных данных установлено, что максимальной способностью ингибировать рост грамотрицательных энтеробактерий обладала пептидная фракция супернатанта пробиотического штамма *L. helveticus* D75, полученная элюированием раствором ацетата аммония с pH 8. Антибактериальное действие этой активной фракции, 100-кратно концентрированной и добавленной в количестве 0,2 об.% от питательной среды LB, было сопоставимо с действием ампициллина в концентрации 10 мг/л. В то же время, фракция, обработанная трипсином, не оказывала на *E. coli* ингибирующего действия (рисунок). Этот факт подтверждает, что антимикробные вещества разлагаются за счет гидролиза пептидных связей.

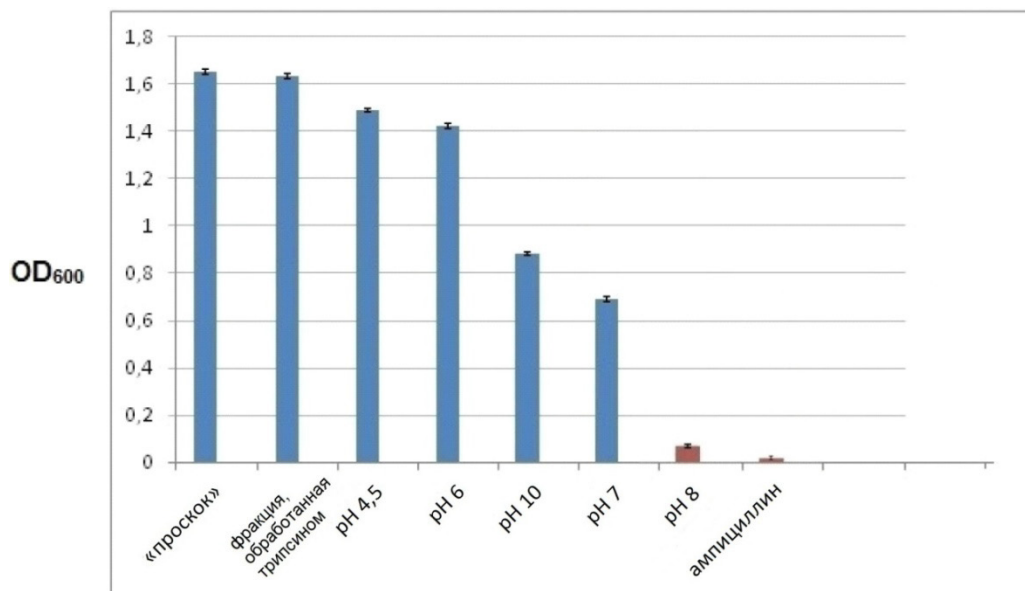


Рисунок – Оптическая плотность индикаторной культуры *E. coli* ATCC 10798 после 24 ч культивирования на питательной среде с различным составом

Figure. Optical density of indicator culture of *E. coli* ATCC 10798 after 24 h incubation on medium with different composition

Полученные результаты свидетельствуют о том, что антибактериальная активность пептидной фракции, полученной из супернатанта элюированием раствором ацетата аммония с pH 8, обусловлена содержанием в этой фракции бактериоцинов, продуцируемых пробиотическим штаммом *L. helveticus* D75 [22].

Электрофорез пептидной фракции проводили в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, после чего анализ полученных электрофореграмм показал наличие в этой фракции белка с массой 37 кДа, что соответствует молекулярной массе гелветицина J.

Разработанные физико-химические условия для одностадийного хроматографического процесса позволяют выделить из многокомпонентной смеси целевые вещества белковой природы с сохранением их нативной структуры и, следовательно, антибактериальных свойств. Таким образом, разработанный хроматографический процесс позволяет, с одной стороны, получить препарат с антибактериальным эффектом, а с другой – утилизировать большой объем жидких отходов фармацевтической промышленности. При этом описанный хроматографический метод выделения с использованием полимерных сорбентов может быть использован для получения антимикробных пептидов и из других пробиотических штаммов молочнокислых бактерий.

В эксперименте, проведенном С.Д. Тодоровым, бактериоцины, продуцируемые штаммом *Lactobacillus plantarum* ST31, были получены и очищены методом жидкостной хроматографии [23]. Пробиотический штамм *L. plantarum* ST31 продуцирует антибактериальный пептид под названием *plantaricin* ST31, который имеет длину 20 аминокислотных остатков и молекулярную массу 2,755 кДа. При этом рассматриваемый бактериоцин выделяли трехстадийным методом, включающим в себя осаждение раствором сульфата аммония с последующей высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) и катионообменной хроматографией. Различия в результатах очистки плантарицина ST31 и выходах бактериоцина из супернатанта в первом и втором экспериментальных протоколах (0,8 % при ВЭЖХ и 5,94 % при катионообменной хроматографии) могут быть объяснены более длительной экспериментальной процедурой ВЭЖХ и различными способами обработки супернатанта. А влияние таких жестких физико-химических условий, как высокое давление и действие растворителя, приводило к частичной потере биологической активности бактериоцина в результате разрушения вторичной структуры составляющего его пептида.

Ряд штаммов *L. plantarum* также продуцируют бактериоцины, многие из которых были выделены и частично охарактеризованы [24–27]. При этом сообщалось о нескольких возможных способах очистки плантарицинов.

Так, например, *T. Kato et al.* выделяли плантарицин-149 из супернатанта культуры *L. plantarum* NRIC 149 с помощью анионообменной хроматографии на диэтилоаминоэтил-сефадексе А-25 с последующей обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [28].

R. Jimenez-Diaz et al. применяли для выделения и очистки плантарицинов S и T, продуцируемых *L. plantarum* LPCO10 многостадийный метод, включающий преципитацию супернатанта 80% раствором сульфата аммония с последующими катионообменной хроматографией на катионообменной колонке быстрого потока с сульфопропил-сефарозой, хроматографией за счет гидрофобных взаимодействий на колонке с фенил-сефарозой и обращено-фазовой хроматографией на колонке с сорбентом C2/C18 [29].

B. Gonzalez et al. выделяли плантарицин С используя трехстадийный протокол, включающий преципитацию супернатанта 55% раствором сульфата аммония с последующей хроматографией за счет гидрофобных взаимодействий и катионообменной хроматографией на катионообменной колонке *Mono S (Pharmacia, Biotech)* [30].

E.L. Andersen et al. выделяли двухпептидные бактериоцины EF и JK из культуры *L. plantarum* C11 путем преципитации супернатанта 40% раствором сульфата аммония с последующей катионообменной хроматографией на сульфопропил-сефарозе [31].

N. Reklif et al. выделяли бактериоцин из культуры *L. plantarum* SA6 преципитацией супернатанта 60% раствором сульфата аммония с последующими катионообменной хроматографией и хроматографией за счет гидрофобных взаимодействий [32].

S. Ennahar [33], *A. Nissen-Meyer* [25] и ряд других авторов для выделения плантарицинов использовали метод, состоящий из преципитации супернатанта раствором сульфата аммония с последующей катионообменной хроматографией на S-сефарозе, обращено-стационарно-фазовой хроматографией на октилсефарозе CL-4B и стационарно-фазовой хроматографией на сорбенте C2/C18.

G. Epan et al. выделяли плантарицины, подвергая супернатант культуры *L. plantarum* преципитации 60% раствором сульфата аммония с последующими диализом, фильтрацией на мембране *Amicon* с размером пор 0,45 μm (*Millipore*) и ультрафильтрацией [34].

Кроме того, сообщалось о быстрой двухэтапной процедуре, пригодной как для лабораторной, так и для крупномасштабной очистки педиоциноподобных бактериоцинов и других катионных пептидов [35], в ходе которой бактериальные клетки и анионные соединения сначала проходили через хроматографическую колонку с катионитом, а связавшиеся с сорбентом катионные бактериоцины затем элюировали 1 М *NaCl*.

Наиболее распространенным методом является осаждение белка из супернатанта раствором сульфата аммония в различных концентрациях с последующей ВЭЖХ.

T. Ghrairi et al. очищали бактериоцины из супернатанта культуры *Enterococcus faecium* MMT21 до гомогенности с помощью трехступенчатой процедуры, состоящей из катионообменной хроматографии, хроматографии на картриджах C18 Sep-pack и обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке с сорбентом C18 [36].

Beaulieu L. et al. выделяли педиоцин PA-1, подвергая супернатант *Pediococcus agalactici* катионообменной хроматографии с последующей хроматографией за счет гидрофобных взаимодействий [37]. При этом полученный выход конечного продукта составил 73% от количества, содержащегося в супернатанте.

При этом активность бактериоцинов класса II по классификации, основанной на их биохимических и генетических характеристиках [38], и особенно бактериоцинов класса IIb, может быть сохранена путем выделения в мягких условиях, поскольку она, согласно *J.L. Parada*, определяется вторичной структурой бактериоцина, которая может быть разрушена жесткими условиями и растворителями. Кроме того, идеальный протокол для производства бактериоцина должен быть таким, который применим для крупномасштабной очистки, приводящей к выходу бактериоцина выше 50% (от исходного количества, содержащегося в супернатанте) и чистоте от 90% и более [38, 39].

Исходя из сказанного, как правило, многостадийные методы выделения бактериоцинов включают фракционированное осаждение этих белков из супернатанта продуцирующей их культуры путем добавления туда раствора сульфата аммония. После этого осажденные белки растворяют в деионизированной воде или в слабом буфере, а затем молекулы бактериоцинов выделяют из них с помощью различных процедур, включающих гидрофобную, ионообменную и/или эксклюзионную

размерную хроматографию. Хотя эти методы облегчили производство высокоочищенных препаратов бактериоцина, конечный выход обычно был ниже 20% от исходной массы бактериоцина в супернатанте и занимал несколько дней [40].

Кроме того D. Guyonnet et al. в 2000 году разработали трехступенчатый метод очистки мезентерицина Y105, продуцируемого *Leuconostoc mesenteroides* Y105 [41]. В этом методе температуру и время стерилизации культуральной среды уменьшили, чтобы свести к минимуму количество гидрофобных и окрашенных загрязнений, присутствующих в среде. После чего супернатант культуры наносили на заполненную карбоксиметилцеллюлозой колонку (2,5 на 18 см), за которой следовали картридж C18 Sep-Pak и аналитическая ВЭЖХ колонка C8 *Kromasil*. При этом количество очищенного мезентерицина Y105, полученного из 100 мл культурального супернатанта, составило 120 мкг, что соответствует выходу 60% от количества, содержащегося в супернатанте, и указывает на начальное количество 2 мг бактериоцина на 1 литр культуральной среды.

Таким образом, в основном, можно выделить три основных стратегии очистки бактериоцинов до однородности: обычный многоступенчатый метод (осаждение сульфатом аммония с последующими катионообменной хроматографией на колонке с сульфопропил-сефарозой, хроматографией на гидрофобных взаимодействиях на колонке с фенил-сефарозой и обращенно-фазовой хроматографией на сорбенте C2/C18), простой трехступенчатый метод (осаждение сульфатом аммония с последующей высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) и катионообменной хроматографией) и одноступенчатая адсорбция расширенного слоя (expanded bed adsorption, ЕВА). При этом очистка бактериоцинов традиционными методами основана на трудоемкой серии последовательных стадий осаждения сульфата аммония, ионообменного, гидрофобного взаимодействия, гель-фильтрации и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии высокого давления [43]. И обычно (хотя и не всегда) при применении этих методов выходы целевого белка низки. Это, вероятно, связано с дополнительным количеством шагов в протоколах очистки, которые хорошо работают в лабораторных объемах, но не подходят к промышленным масштабам.

Таким образом, промышленное применение бактериоцинов в качестве консервантов в пищевой промышленности требует разработки эффективных методов выделения. При этом антимикробные пептиды, продуцируемые различными видами бактерий, имеют разную степень активности и спектр действия, в результате чего выбор антимикробных пептидов существенно зависит от типа пищевого продукта и преобладающих в нем видов микроорганизмов-загрязнителей. В то же время применение антимикробных пептидов в различных комбинациях позволяет добиться практически полного ингибирования роста микроорганизмов в среде пищевого продукта и отказаться от использования химических консервантов [44–47].

Выводы

Полученная в процессе хроматографического выделения из супернатанта лактобацилл высокоочищенная пептидная фракция, обладающая антибактериальной активностью в отношении микроорганизмов, вызывающих порчу пищевых продуктов, сравнима с активностью ампициллина. Из этого можно заключить, что содержащийся в данной фракции бактериоцин с высокой степенью вероятности может позволить ингибировать рост патогенных бактерий и таким образом обеспечить безопасность пищевого продукта в течение гарантированного для него срока годности. При этом электрофоретический анализ показал наличие в рассматриваемой фракции только одного белкового компонента с массой 37 кДа, соответствующей молекулярной массе гелветицина J. Отсутствие во фракции фрагментов с другой молекулярной массой говорит о высокой степени ее чистоты, необходимой для использования содержащегося в ней пептида в качестве консервирующего компонента пищевых продуктов.

Работа выполнена на средства гранта РФФИ № 19-316-90062

References

1. Chen H., Hoover D.G. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003, V. 2, no. 3, pp. 82–100.
2. Ermolenko E.I., Isakov V.A., Zhdan-Pushkina S.Kh., Tets V.V. Quantitative characterization of antagonistic activity of lactobacilli. *Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*. 2004, no. 5, pp. 94–98 (In Russian).
3. Parada J.L. et al. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2007, V. 50, no. 3, pp. 521–542.
4. Pisarev O.A., Ezhova N.M. Modern approaches on construction of polymeric sorbents structure for preparative chromatography (review). *Sorption and Chromatogr. Processes*. 2008, V. 8, no. 4, pp. 535–552. (In Russian).
5. Pisarev O.A., Ployakova I.V. Regulation of sorption selectivity in preparative chromatography of biologically active substances on polymeric sorbents. *Trends in Chromatography*. 2013, V. 7, pp. 85–109.
6. General Pharmacopoeia Article 1.7.1.0008.15 Probiotics. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 2016, 13th edition, V. 2 (In Russian).
7. General Pharmacopoeia Article 1.7.1.0006.15 Lactic acid bacteria containing probiotics. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 2016, 13th edition, V. 2 (in Russian).
8. Kolodyaznaya V.S., Broiko Yu.V., Baranenko D.A. Probiotic cultures in the technology of meat semi-finished products from veal. *Meat Industry*. 2011, no. 10, pp. 33–36 (In Russian).
9. Baranenko D.A., Borisova I.I., Borisov A.E. Investigation of the survival rate of lactic acid microorganisms in emulsified meat products. *Processes and Food Production Equipment*. 2016, no. 3, pp. 12–16 (In Russian).
10. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 1960, no. 131, pp. 82–91.
11. Yelinov N.P. *Basics of biotechnology*. St. Petersburg, Nauka Publ., 1995. 600 p. (In Russian).
12. Gratia A., Fredericq P. Diversité des souches antibiotiques de *E. coli* et étendue variable de leur champs d'action. *C. R. Soc. Biol.* 1946, no. 140, pp. 1032–1033.
13. Fredericq P. Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose de *E. coli*. *C. R. Soc. Biol.* 1946, no. 140, pp. 1189–1190.
14. Schved F., Lindner P., Juven B.J. Interaction of the bacteriocin pediocin SJ-1 with the cytoplasmic membrane of sensitive bacterial cells as detected by ANS fluorescence. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, no. 76, pp. 30–35.
15. Shenderov B.A. Medical and microbial ecology and functional nutrition. V. 3. Probiotics and functional nutrition. Moscow, Grant Publ., 2001. 288 p. (In Russian).
16. Yegorov N.S., Baranova I.P. Bacteriocins. Formation, properties, application. *Antibiotics and Chemotherapy*. 1999, V. 44, no. 6, pp. 33–41 (In Russian).
17. Vakhitov T.Ya., Yashina O.Yu., Petrov T.N., Koroliuk A.M. The action of the *Escherichia coli* growth autostimulation drug on the growth of pure and mixed cultures. *Journal Microbiol.* 2000, no. 3, pp. 20–24 (In Russian).
18. Beloborodova N.V., Beloborodov S.M. The metabolites of anaerobic bacteria (volatile fatty acids) and the reactivity of the macroorganism. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2000, no. 2, pp. 28–36 (In Russian).
19. Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D., Kuipers O.P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, V. 100, Is. 7, pp. 2939–2951.
20. Joerger M.C., Klaenhammer T.R. Characterisation and Purification of Helveticin J and Evidence for a Chromosomally Determined Bacteriocin Produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology*. 1986, V. 167, no. 2, pp. 439–446.
21. Joerger M.C., Klaenhammer T.R. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J Bacteriol.* 1990, V. 172, Is. 11, pp. 6339–6347.
22. Fremaux C., Klaenhammer T.R. Helveticin J. A Large Heat-Labile Bacteriocin from *Lactobacillus helveticus*. In: De Vuyst L., Vandamme E.J. (eds.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Springer, Boston, 1994, pp. 397–418.
23. Todorov S.D., Vaz-Velho M., Gibbs P.A. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004, V. 35, no. 1-2, pp. 157–160.
24. Daeschel M.A., McKenny M.C., McDonald L.C. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C11. *Food Microbiol.* 1990, no. 7, pp. 91–98.
25. Nissen-Meyer A., Laesen G., Sletten K., Daeschel M.A., Nes I.F. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J. Gen. Microbiol.* 1993, no. 139, pp. 1973–1978.
26. Todorov S., Onno B., Sorokine O., Chobert J.M., Ivanova I., Dousset X. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, no. 48, pp. 167–177.
27. Van Reenen C.A., Dicks L.M.T., Chikindas M.L. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 1998, no. 84, pp. 1131–1137.

28. Kato T., Matsuda T., Ogawa E., Ogawa H., Kato H., Doi U., Nakamura R. Plantaricin 149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. *J. Ferment Bioeng.* 1994, no. 77, pp. 277–282.
29. Jimenez-Diaz R., Rios-Sanchez R.M., Desmazeaud M., Ruiz-Barrba J.L., Piard J.-C. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, no. 59, pp. 1416–1424.
30. Gonzalez B., Arca P., Mayo B., Suarez J. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, no. 6, pp. 2158–2163.
31. Anderssen E.L., Diep D.B., Nes I.F., Eijssink V.G.H., Nissen-Meyer J. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, no. 64, pp. 2269–2272.
32. Rekhif N., Atrih A., Michel M., Lefebvre G. Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. *J. Appl. Bacteriol.* 1995, no. 78, pp. 349–358.
33. Ennahar S., Aoude-Werner D., Sorokine O., Van Dorsselaer A., Bringel F., Hubert J.C., Hasselmann C. Production of plantaricin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, no. 62, pp. 4381–4387.
34. Enan G., Essaway A.A., Uyttendaele M., Debevere, J. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal activity of plantaricin UG1. *Int. J. Food Microbiol.* 1996, no. 30, pp. 189–215.
35. Uteng M., Hauge H.H., Bronz I., Nissen-Meyer J., Fimland G. Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, no. 68, pp. 952–956.
36. Ghrairi T., Braïek O., Hani K. Detection and characterization of a bacteriocin, putadecin T01, produced by *Pseudomonas putida* isolated from hot spring water. *APMIS.* 2015, V. 10, pp. 260–268.
37. Beaulieu L., Aomari H., Groleau D., Subirade M. An improved and simplified method for the large-scale purification of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici*. *Biotechnol Appl Biochem.* 2006, no. 43, pp. 77–84.
38. Parada J.L., Caron C.R., Medeiros A.B.P., Soccol C.R. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2007, V. 50, no. 3, pp. 521–542.
39. Schöbitz R., Zaror T., León O., Costa M. A bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* for the control of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged meat. *Food Microbiol.* 1999, no. 16, pp. 249–255.
40. Jack R.W., Tagg J.R., Bibek-Ray. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 1995, V. 59, Is. 2, pp. 171–200.
41. Guyonnet D., Fremaux C., Cenatiempo Y., Berjeaud J. M. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, no. 66, pp. 1744–1748.
42. Garsa A.K., Kumariya R., Sood S.K., Kumar A., Kapila S. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2014, V. 6, Is. 1, pp. 47–58.
43. de Souza Barbosa M., Todorov S.D., Ivanova I., Chobert J.M., Haertlé T., de Melo Franco B.D.G. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiol.* 2015, V. 46, pp. 254–262.
44. Ribeiro S.C., Ross R.P., Stanton C., Silva C.C.G. Characterization and application of antilisterial enterocins on model fresh cheese. *J. Food Prot.* 2017, V.80, Is. 8, pp. 1303–1316.
45. Snyder A.B., Worobo R.W. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J. Sci Food Agric.* 2014, V. 94, Is. 1, pp. 28–44.
46. Daeschel M.A., McKenny M.C., McDonald L.C. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C11. *Food Microbiol.* 1990, V. 7, pp. 91–99.
47. Mackay V.C., Arenose G., Hastings J.W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *J. Food Microbiol.* 1997, V. 34, pp. 1–16.

Статья поступила в редакцию 31.12.2019