

Т.Д. Сультимова, канд. биол. наук, доц., e-mail: tsultimova@mail.ru

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ

Л.Г. Стоянова, д-р биол. наук, проф.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, г. Москва

А.Т. Бубеев, канд. биол. наук, доц.

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ

УДК 577.12.9:579.842.24.013

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ АНТИБИОТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ШТАММОВ 194 И К-205 *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS*

В статье приведены исследования по выделению, разделению и изучению антибиотического комплекса, выделенного из штаммов 194 и К-205 Lactococcus lactis subsp. lactis. Подобраны растворители в различных сочетаниях и концентрациях. Антибиотический комплекс был разделен на три основных биологически активных фракции. Верхний компонент бактериоцина из штамма 194 активен в отношении большинства грамположительных микроорганизмов, включая термостойкую бактерию Bacillus coagulans 429, грамотрицательных - Escherichia coli 52 и некоторых простейших грибов - Fusarium oxysporum и Candida guilliermondii 217. Полученные данные были использованы при идентификации по компьютерной базе данных Berdy. Было выявлено, что подобного вещества среди ранее выделенных не обнаружено. По предварительным данным бактериоцин 194-Б является новым.

Ключевые слова: бактериоцин, Lactococcus lactis, антибиотический комплекс, экстракция.

T.D. Sultimova, Cand. Sc. Biol., Assoc. Prof.

L.G. Stoyanova, Dr. Sc. Biol., Prof.

A.T. Bubeev, Cand. Sc. Biol., Assoc. Prof.

THE RESEARCH OF THE ANTIBIOTIC COMPLEX PROPERTIES OF STRAINS 194 AND K-205 *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS*

The researches on allocation, division and studying of the antibiotic complex allocated from strains of 194 and K-205 Lactococcus lactis subsp. lactis are conducted in this work. The solvents in various combinations and concentration are picked up. The antibiotic complex is separated into three major bioactive fractions. The top component of bacteriocin from a strain 194 is active against most Gram-positive organisms, including heat-resistant bacterium Bacillus coagulans 429, Gram-negative Escherichia coli 52 and the Fusarium oxysporum and Candida guilliermondii 217. The obtained data are used at identification on the Berdy's computer database. It is revealed that the similar substance isn't found among earlier allocated ones. According to this data bacteriocin 194-B is new.

Key words: bacteriocin, Lactococcus lactis, antibiotic complex, extraction.

Синтез бактериоцинов – наследственная особенность организмов, проявляющаяся в том, что каждый штамм способен образовывать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ. На синтез бактериоцинов оказывают влияние условия культивирования продуцента: синтез бактериоцина в большинстве клеток популяции можно индуцировать различными физико-химическими воздействиями: ультрафиолетовыми лучами, мутагенами химической природы, перекисями, ДНК-тропными веществами и другими агентами.

Выделение и изучение бактериоцинов требует применения сложных биохимических и микробиологических методов (химическое экстрагирование с использованием различных сорбентов, хроматография, ультрафильтрация и др.). Поэтому немногим исследователям удается выделить, изучить и идентифицировать антибиотики, синтезируемые молочнокислыми микроорганизмами. Большая часть проводимых в этом направлении работ посвящена описанию антагонистического действия различных видов молочнокислых бактерий без установления

природы этого явления. При этом используется общепотребительный термин «антибиотическая активность» («антибиотические свойства»), под которым подразумевается не только действие специфических антибиотиков, но и других антибиотических веществ, продуцируемых молочнокислыми бактериями. Так, без раскрытия природы антибактериальной активности мезофильных молочнокислых бактерий, описано действие некоторых штаммов *L. lactis* и *Str. cremoris* на нежелательную микрофлору в процессе производства кисломолочных продуктов.

Для выделения, очистки бактериоцинов использовали различные методы.

Бактериоцины накапливаются в основном в культуральной жидкости, но часть их связана с клеточной стенкой продуцента. Одним из важнейших условий эффективного извлечения бактериоцина из культуральной жидкости является правильный выбор экстрагента – органического растворителя, который бы избирательно и полно извлекал его как из культуральной жидкости, так и из клеточной стенки. Для этого были проведены исследования по выделению и очистке бактериоцинов, продуцируемых штаммами 194 и К-205 *L. lactis* subsp. *lactis*.

Материалы и методы

Изучен ряд растворителей, таких как ацетон, бутанол, метанол в различных сочетаниях и концентрациях в сравнении с известной смесью для выделения низина, содержащей ацетонуксусную кислоту-воду. Экстракцию проводили при 55°C в течение 1,5 ч для более полного извлечения бактериоцинов из клеток. Воду, ацетон и уксусную кислоту отгоняли в вакууме для получения концентрированного экстракта. Полученный концентрат анализировали методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и электрофореза на бумаге.

UV-VIS-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu UV-160 1PC UV-Visible Spectrophotometer (Japan).

Масс-спектры выделенных антибиотиков регистрировали: на приборе VISION методом MALDI-TOF в режиме положительных ионов. Лазер – азот, 337 nm, матрица – DHB (2,5-дигидроксид-бензойной кислоты).

Электрофорез проводился на бумаге Filtrak F-14 при 550 В в течение 120 мин в электролитах с pH 1,7 (30%-ная уксусная кислота) и с pH 2,4 (2н уксусная кислота) в приборе, работающем по принципу влажной камеры Дурррома.

Биоавтографию проводили по методике, предложенной в литературе с использованием в качестве тест-организмов *Vac. coagulans* 429, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Для разделения антибиотического комплекса на фракции и получения хроматографически чистых компонентов культуральные жидкости штаммов 194 (pH 4,1) и К-205 (pH 4,6) центрифугировали для отделения от клеток. Надосадочную жидкость дважды экстрагировали *n*-бутанолом в соотношении 1:3. Бутанольный концентрат экстрагировали органическими растворителями, не смешивающимися с водой, экстракты объединяли, растворитель отгоняли в вакууме на ротационном испарителе до получения маслянистого остатка и таким образом получали одну из фракций (В) бактериоцина штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 и К-205. Клетки экстрагировали ацетоном в вакууме, затем проводили его отгон и растворяли в этаноле.

При добавлении к водному маточнику от экстракции избытка метанола образуется обильный осадок – 17 г с 1 л культуральной жидкости штамма 194 и 11 г – штамма К-205. Таким образом, была получена фракция (Н) бактериоцина из культуральной жидкости штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Полученное вещество отделяли на стеклянном фильтре и высушивали в вакуум-эксикаторе в течение суток.

Хроматографическое разделение проводили в системе растворителей: метанол-вода (96:4).

Результаты исследования

Антибиотический комплекс был разделен на три основных биологически активных фракции, различающиеся между собой по величине R_f в ряде систем растворителей при ТСХ

на силикагеле, а также по электрофоретической подвижности при электрофорезе на бумаге в различных электролитах.

В системе метанол – вода (96:4) при ТСХ фракция 194-Н имеет $R_f=0,4$. У штамма К-205 биологически активной являлась только средняя фракция, что подтвердилось наличием зон ингибирования тест-культур.

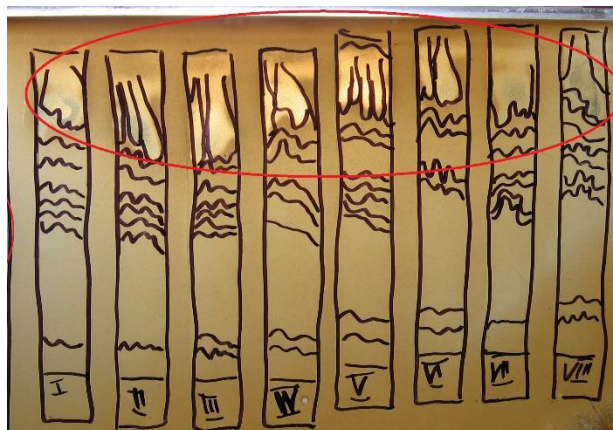


Рисунок 1 – Процесс разделения антибиотического комплекса на компоненты штамм 194: отпечаток хроматограммы на тест-организм *Bacillus subtilis* с очищенными верхним и средним компонентами штамма 194 *L. Lactis* subsp. *lactis*

Электрофоретическое исследование нижнего компонента, выделенного из культуральной жидкости штамма 194, показало, что она мигрирует к катоду и, таким образом, обладает основными свойствами. Методом препаративного электрофореза на бумаге в электролитах эта фракция была разделена на 2 биологически активных компонента. Один из компонентов 194-Н-А совпадает по электрофоретической подвижности со стандартным образцом низина.

Основной фракцией антибиотического комплекса является фракция 194-Н, полученная из водного раствора после отделения фракции 194- В. Фракция Н получена в виде аморфного порошка кремового цвета, активного в отношении некоторых грамположительных микроорганизмов, включая *Bac. coagulans*.

Методами экстракции и колоночной хроматографии был препаративно получен основной компонент выделенных бактериоцинов из фракции В.

Изучены спектры их антимикробного действия. Компонент В является низкомолекулярным гидрофильным соединением и обладает широким спектром антимикробного действия (табл.).

Так, верхний компонент бактериоцина из штамма 194 активен в отношении большинства грамположительных микроорганизмов, включая термостойкую *Bacillus coagulans* 429, грамотрицательных – *Escherichia coli* 52 и некоторых простейших грибов – *Fuzarium oxysporum* и *Candida guilliermondii* 217.

Таблица

Антимикробный спектр действия двух активных фракций антибиотического комплекса, продуцируемых штаммами 194 и К-205 *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*

Тест-организмы	Диаметр зон ингибирования фракций (мм)			
	нижний компонент		верхний компонент	
	194	К-205	194	К-205
<i>Micrococcus luteus</i> 128	23,0	14,0	25,0	15,0
<i>Bacillus mycoides</i> 32	15,0	13,0	14,0	14,0
<i>Bacillus coagulans</i> 429	12,0	13,0	16,0	13,0
<i>Bacillus subtilis</i>	12,0	12,0	15,0	13,0
<i>Staphylococcus aureus</i> 144	14,0	13,0	14,0	14,0
<i>Escherichia coli</i> 52	14,0	12,0	13,0	12,0
<i>Aspergillus niger</i> 369	12,0	9,0	12,0	9,0
<i>Fuzarium oxysporum</i>	13,0	сл.	12,0	8,0
<i>Candida guallermondii</i> 217	12,0	10,0	13,0	9,0

На рисунках 2, 3 показаны УФ-спектрометрические и масс-спектрометрические данные выделенных бактериоцинов.

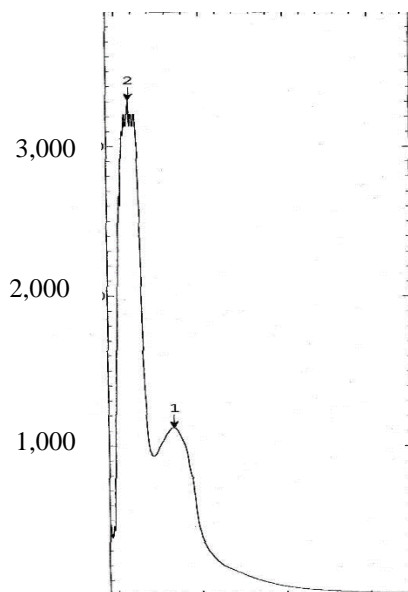


Рисунок 2 – УФ-спектр верхнего компонента штамма К-205
(Peak Pick: Wavelength (nm.) 268,00 – Abs. 1,1229; Wavelength (nm.) 216,50 – Abs. 3,3113)

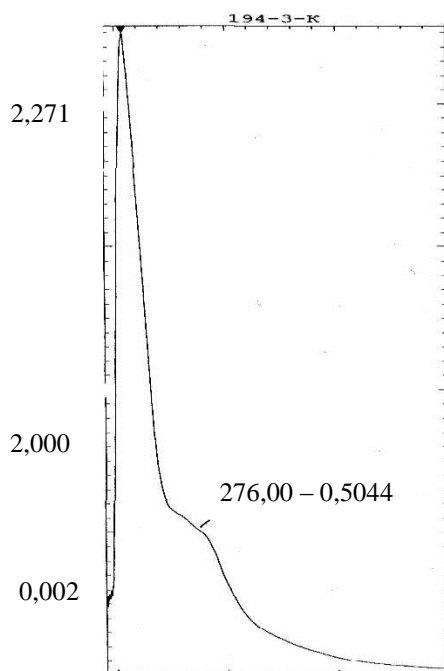


Рисунок 3 – УФ-спектр верхнего компонента штамма 194
(Peak Pick: Wavelength (nm.) 206,80 – Abs. 2,2488)

Вывод

В результате проведенных исследований был подобран ряд растворителей для экстракции антибиотического комплекса, которые были разделены на три основные биологически активные фракции. Проведены масс-спектрометрические и электрофоретические исследования данных компонентов. Изучены спектры их антимикробного действия. Компонент В штамма 194 является низкомолекулярным гидрофильным соединением и обладает широким

спектром антимикробного действия. Полученные данные были использованы при идентификации по компьютерной базе данных Berdu. Было выявлено, что подобного вещества среди ранее выделенных не обнаружено. По предварительным данным, бактериоцин 194-В является новым.

Библиография

1. Стоянова Л.Г., Егоров Н.С. Получение низинпродуцирующих бактерий методом слияния протопластов двух родственных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, низкоактивных по синтезу низина // Микробиология. – 1998. – Т. 67, № 1. – С. 47–54.
2. Сультимова Т.Д., Стоянова Л.Г., Цыренов В.Ж. Биологический консервант на основе штамма *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* F-116 // Вестник ВСГУТУ. – 2013. – № 5 (44). – С. 91–96.
3. Стоянова Л.Г., Сультимова Т.Д., Ботина С.Г. и др. Выделение и идентификация бактериоцинпродуцирующих штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* из свежего молока // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 5. – С. 560–568.
4. Lu W., Cong W., Cai Z. Nisin Production by *Lactococcus Lactis* Subsp. *lactis* under Nutritional Limitation in Fed-Batch Culture // *Biotechnology Letters*. – 2004. – N 3. – P. 235–238.
5. Zendo T., Fukao M., Ueda K. et al. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan // *Bioscience, biotechnology and biochemistry*. – 2003. – N 7. – P. 1616–1619.
6. Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F. A review: Lactic acid bacteria- Potential for control of mould growth and mycotoxins // *Food Control*. – 2009. – N 21 (4). – P. 370–380.
7. Cleveland, J., Montville T.J., Nes I.F. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation // *Int. J. Food Microbiol.* – 2001. – Vol. 71. – P. 1–20.
8. McAuliffe O., Ross R.P., Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action // *FEMS microbiology reviews*. – 2001. – N 3. – P. 285–308.

Bibliography

1. Stoyanova L.G., Egorov N.S. Receiving Nisin-producing bacteria by the method of merge of protoplasts of two related strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, low-level synthesis of nisin // *Mikrobiologiya*. – 1998. – Vol. 67, N 1. – P. 47–54.
2. Sultimova T.D., Stoyanova L.G., Tsyrenov V.Zh. Biological preservative based on the Strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* F-116 // *Bulletin of ESSUTM*. – 2013. – N 5 (44). – P. 91–96.
3. Stoyanova L.G., Sultimova T.D., Botin S.G. et al. Isolation and Identification of bacteriocin from strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from milk // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. – 2006. – Vol. 42, N 5. – P. 560–568.
4. Lu W., Cong W., Cai Z. Nisin Production by *Lactococcus Lactis* Subsp. *lactis* under Nutritional Limitation in Fed-Batch Culture // *Biotechnology Letters*. – 2004. – N 3. – P. 235–238.
5. Zendo T., Fukao M., Ueda K. et al. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan // *Bioscience, biotechnology and biochemistry*. – 2003. – N 7. – P. 1616–1619.
6. Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F. A review: Lactic acid bacteria- Potential for control of mould growth and mycotoxins // *Food Control*. – 2009. – 21 (4). – P. 370–380.
7. Cleveland, J., Montville T.J., Nes I.F. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation // *Int. J. Food Microbiol.* – 2001. – Vol. 71. – P. 1–20.
8. McAuliffe O., Ross R.P., Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action // *FEMS microbiology reviews*. – 2001. – N 3. – P. 285–308.