

УДК 57.042.2:57.083.38

А.Е. АГАДЖАНЯН*, Ф.Н. ТХРУНИ, Г.Ж. ОГАНИСЯН, К.И. ЕГИЯН, А.А. ВАРДАНЯН, А.С. САГИЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН Республики Армения, Ереван, 0056

e-mail: aghajanyanarmen@yahoo.com

Выделение и очистка биоингибирующего продукта из культуральной жидкости молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* 1991 ВКПМ 6257 и *Lactobacillus rhamnosus* ИНМИА 9614

Исследован процесс ионообменного выделения и очистки биоингибирующего продукта из культуральной жидкости (КЖ) молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* и *L. rhamnosus* и определены его оптимальные параметры. Для очистки целевого продукта от сопутствующих примесей элюаты с ионообменных колонн подвергали экстракции; опыты показали, что наиболее эффективными экстрагентами являются диметилкетон, диэтилкетон и ацетонитрил. Выход целевого продукта из супернатанта КЖ с учетом возврата растворов в технологический цикл составил ~ 64 %, а максимальная биоингибирующая активность полученного продукта — 28000 Ае/мл. Показано, что сопутствующий бактерицидный эффект молочной кислоты на рост грамположительных и грамотрицательных культур проявляется лишь при $\text{pH} \leq 3,4$ и концентрации больше 0,5 %.

Ключевые слова: биоингибитор, выделение, ионный обмен, молочная кислота, экстракция.

Биоингибирующие вещества представляют собой синтезируемые бактериями (бактериоцины) или дрожжами (микоцины) продукты, которые отличаются друг от друга по молекулярной массе, химическому составу и спектру действия [1].

Получение новых биоингибирующих продуктов на основе пробиотических микроорганизмов и секретируемых ими биологически активных веществ является актуальной задачей. За по-

следние два десятилетия проблема приобрела более серьезный характер, так как возросло число бактерий, устойчивых к действию антибиотиков, что приводит к увеличению распространения болезней [2].

Биоингибирующие вещества имеют различную природу [3]. В литературе опубликовано много работ, посвященных классификации бактериоцинов [1—4], а также их биосинтезу и выделению

Агаджанян Армен Егишевич, Тхруни Флора Нубаровна, Оганисян Гаяне Жоржиковна, Егиян Карине Имрановна, Варданян Андраник Акопович, Сагиян Ашот Серобович.

Список сокращений: Ае (антибактериальная единица) — единица активности биоингибирующего продукта; АМП — антимикробный препарат; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ДМК — диметилкетон; ДЭК — диэтилкетон; КОЕ — колониеобразующая единица; МКБ — молочнокислые бактерии; СВ — сухое вещество; среда MRS (Man — Rogosa — Sharp) — среда Ман — Рогоза — Шарп.

* Автор для переписки.

из КЖ в лабораторных условиях. В ряде работ выделение бактериоцина из КЖ после удаления клеток осуществляют путем ультрафильтрации [4—7]. Далее из пермеата бактериоцин высаливают сульфатом аммония, выделившийся осадок растворяют в цитрате натрия и диализуют. Диализат подвергают гель-фильтрации; собранные фракции объединяют и лиофильно высушивают. Сухую массу растворяют в воде и подвергают ионообменной очистке на колонке карбоксиметилцеллюлозы. Элюцию проводят раствором хлорида натрия, а собранные активные фракции смешивают, подвергают диализу и фракционируют с помощью ВЭЖХ. Активные фракции смешивают, лиофильно высушивают и после растворения в воде проверяют их бактериоцидную активность.

Известен способ выделения бактериоцина из КЖ, полученной при культивировании штамма *Lactobacillus plantarum* F1 и *Lactobacillus brevis* в питательной среде [8]. Согласно этому способу, освобожденную от клеток КЖ подвергают ультрафильтрации и бактериоцин осаждают из пермеата сульфатом аммония. Осадок растворяют в фосфатном буфере и диализуют, после чего бактериоцин экстрагируют органическими растворителями, экстракт выпаривают, а полученный осадок растворяют в растворе NaCl и определяют бактериоцидную активность полученного вещества. Аналогичный подход к выделению и очистке бактериоцина изложен в работе [3]. Окончательную очистку образца целевого продукта осуществляют с помощью ВЭЖХ.

В работе [9] для выделения бактериоцина КЖ подвергают центрифугированию и ультрафильтрации, после чего из пермеата целевой продукт адсорбируют на силикатных сорбентах. Из полученного элюата бактериоцин осаждают высаливанием сульфатом аммония. Осадок растворяют в воде и очищают от примесей гель-фильтрацией или другими хроматографическими методами.

Таким образом, выделение биоингибирующих продуктов из супернатантов предлагается осуществлять с применением таких методов, как высаливание сульфатом аммония, растворение образовавшегося осадка в буферном растворе, диализ, гель-фильтрация, ионный обмен и ВЭЖХ [3—6]. Указанные подходы к выделению и очистке биоингибирующих продуктов из КЖ приводят к значительным затратам.

Целью предлагаемой работы являлась разработка эффективного низкочувствительного технологического способа выделения и очистки биоингибирующего продукта из КЖ молочнокислых бакте-

рий, который обладал бы сильным бактериоцидным действием. Суть разработанного комбинированного способа выделения и очистки биоингибирующего продукта из КЖ заключается в том, что с помощью ионного обмена из супернатанта выделяется частично очищенный раствор антимикробного продукта, из которого далее экстракционным способом удается получить целевой продукт с высокой биоингибирующей активностью.

УСЛОВИЯ ЭСПЕРИМЕНТА

Ранее была показана антимикробная активность КЖ штаммов *Lactobacillus acidophilus* 1991 ВКПМ 6257 и *L. rhamnosus* 2012 ИНМИА 9614, обусловленная синтезом бактериоцина [10, 11].

Для выделения биоингибирующих веществ КЖ вышеуказанных условно анаэробных штаммов, полученную после выращивания в среде MRS (*Lactobacillus* MRS Broth, США) при температуре 37° в течение 48 ч, центрифугировали в течение 20 мин при 2900 g. Супернатант подвергали ультрафильтрации путем пропускания его через разделительный ультрафильтрационный аппарат с полыми волокнами AP-02м (Россия) периодического действия. Из емкости супернатант насосом подавали в разделительный аппарат через мембранный разделитель, а далее жидкость, обогащенная малопроницающим компонентом через шланговый вентиль возвращается в емкость исходного раствора. Фильтрат из разделительного аппарата по линии фильтрата направляется в емкость для его сбора. Рабочая смесь циркулировала по замкнутому контуру. Разделительным элементом в аппарате AP-02м является пучок параллельно уложенных полых волокон, концевые части которых закреплены в пластмассовом блок-коллекторе. Поверхность фильтрации аппарата составляет 0,05 м²; производительность по фильтрату при P=0,1 МПа и t=20° — от 2,3 до 6,5 л/ч; длина разделительной колонки — 410 мм. Установка работает от сети переменного тока с напряжением (220 ± 22) В и частотой (50 ± 0,5) Гц.

Далее пермеат подвергали упариванию в вакууме при 36—38° и остаточном давлении 0,01 МПа до содержания сухого вещества (СВ) 27—30 %. Для осаждения целевого продукта к 30 мл упаренного пермеата при перемешивании добавляли сульфат аммония квалификации “х.ч.” (“Реахим”, Россия) до достижения степени насыщения раствора, равной 35—80%; pH упаренных растворов составлял 3,5 и 6,5, соответственно. После 20-минутного перемешивания массу выдерживали при 4° в течение 20 ч. Образовавшийся осадок отделяли

от раствора центрифугированием в течение 15 мин при 5400 g. Аналогичный подход был применен при осаждении биоингибирующего вещества изопропанолом квалификации “х.ч.” (“Реахим”). Объемное соотношение упаренного раствора и изопропанола составляло от 1:0,5 до 1:10. Из образовавшегося осадка готовили 5%-ный водный раствор и в нем определяли антимикробную активность.

Следующим этапом очистки была сорбция биоингибирующего вещества из супернатанта КЖ. Для этого последний пропускали через две последовательно соединенные ионообменные колонки. Первая состояла из катионита КУ-2х8 (Россия), вторая — из анионита ЭДЭ-10П (Россия) в H^+ и OH^- форме, соответственно. Линейная скорость потока супернатанта по направлению снизу вверх составляла 0,034 см/с. В процессе сорбции первую колонку использовали для регулирования pH раствора в фазе анионита. Объем катионита в колонке составлял 12%, а анионита 35% от общего объема пропущенного супернатанта. Так как биоингибирующее вещество имеет скорее всего анионную природу, то оно сорбируется на анионите. После окончания подачи супернатанта смолы промывали водой до содержания СВ в выходящей со смолы жидкости, равного нулю. Затем сорбированный целевой продукт элюировали со смолы 3%-ным аммиачным раствором при скорости потока элюента по направлению сверху вниз, равной 0,02 см/с. Фракции, обладающие биоингибирующей активностью (см. ниже), объединяли и подвергали вакуум-упариванию до содержания СВ, равного 50—52 %, и после разбавления определяли биоингибирующую активность полученного продукта.

Для экстракции продукта из элюата ионообменной колонки к 20 мл элюата добавляли обычно равный объем органического растворителя соответствующего типа (см. раздел «Результаты и обсуждение») (производства “Криохром” и “Реахим”, Россия) и после 10-минутной экстракции массу оставляли для разделения фаз на 20 мин. Слои разделяли, вакуум-упариванием органический растворитель отделяли от экстракта и водного слоя и измеряли биоингибирующую активность упаренных растворов. Упаренный водный раствор присоединяли к исходному супернатанту для ионообменной очистки.

Содержание биоингибирующего продукта в различных образцах определяли методом образования ингибирующей зоны на тест-культурах. Условной единицей антибактериальной активности (Ае/мл) считалась величина разбавления, при которой образец давал минимальную зону (диаметром 2 мм) подавления роста тест-культур [12].

В качестве исследуемых тест-культур использовали условно-патогенные бактерии родов *Escherichia coli* К-12, *Salmonella typhimurium* Г-38 и *Bacillus subtilis* Г-17-89, находящиеся в коллекции микроорганизмов НПЦ “Армбиотехнология”. Выращивание культур проводили в питательной среде (Lactobacillus MRS Agar) при 30° в течение 18 ч до титра, равного 10^5 — 10^6 КОЕ/мл.

Для устранения негативного эффекта органических кислот на тест-организмы (см. раздел «Результаты и обсуждение») pH анализируемых образцов поддерживали равным 6,0 добавлением стерильного 1 н. раствора NaOH (“Реахим”).

Содержание СВ в растворе измеряли на рефрактометре L-40 (Polskie Zaklady Optyczne Miska-25, Польша).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что с помощью высаливания сульфатом аммония или осаждения изопропанолом при различных значениях pH из упаренного пермеата КЖ двух используемых штаммов не удастся количественно выделить биоингибирующий продукт независимо от степени насыщения раствора сульфатом аммония (от 35 до 80 %) и объемного соотношения раствор : изопропанол (от 1:0,5 до 1:10), соответственно. Очевидно, что причина отсутствия образования осадка биоингибирующего продукта может быть связана с его небольшой молекулярной массой (~700—1400 Да) и высокой растворимостью [13].

Учитывая вышесказанное, для выделения биоингибирующего агента из супернатанта был применен метод ионообменной хроматографии последовательно на колонках катионита и анионита, при этом катионообменная колонка была использована в основном для регулирования pH супернатанта и частичного поглощения веществ катионной природы. Обменная емкость анионита ЭДЭ-10П по биоингибирующему продукту составляла ~ 1280 Ае/мл.

Выбор среднеосновного анионита ЭДЭ-10П для сорбции целевого продукта из супернатанта обусловлен тем, что по сравнению с сильноосновными анионитами обменная емкость данной смолы примерно вдвое больше, а по сравнению со слабоосновными анионитами она механически прочнее. Кроме того, среднеосновные аниониты имеют сравнительно меньшее значение кажущейся константы диссоциации функциональных групп, чем сильноосновные, поэтому целевой продукт легче десорбируется с анионита в основной среде [14].

В собранных элюатах определяли СВ, pH и биоингибирующую активность. Фракции, облада-

ющие антимикробным свойством, объединяли. Полученный продукт именовали антимикробный препарат — АМП [15].

Результаты очистки биоингибирующего агента на анионите из супернатанта суммированы в табл. 1 (данные, приведенные на иллюстрациях, соответствуют средним результатам по обоим продуцентам, которые мало отличались друг от друга).

Объем пропущенного через ионообменные колонки супернатанта составлял 5,2 л (рН — 3,4; СВ — 7,0 %, кислотность — 220 по Тернеру; содержание солей — 0,34 г-экв; антимикробная активность супернатанта была равна 600 Ае/мл).

Из данных табл. 1 в результате несложных расчетов получаем, что из сухих веществ, содержащихся в исходном супернатанте (364 г), 279 г как примеси переходят в сорбционный сток и лишь ~ 85 г сорбируется на анионите.

Таким образом, стадия ионного обмена позволяет удалить ~ 76,6 % от общего количества СВ, которые содержались в супернатанте в виде примесей. 79 % биоингибирующего продукта сорбируется на смоле.

Результаты элюции целевого продукта с анионита 3,0%-ным раствором аммиака представлены в табл. 2.

Фракции элюатов с обеих колонок, обладающие биоингибирующей активностью, объединяли и подвергали вакуум-упариванию до содержания СВ в растворе 52 %. Объем полученного упаренного раствора составлял 360 мл (~7 % от общего объема исходного супернатанта), а активность целевого продукта в нем — 5800 Ае/ мл.

Выход целевого продукта на стадии ионного обмена был равен ~ 67 %.

Для оценки биоингибирующей активности АМП необходимо было определить антимикробные свойства других присутствующих в КЖ метаболитов, в частности молочной кислоты. Исследования показали, что антимикробное действие молочной кислоты по отношению к используемым тест-культурам проявляется лишь при ее концентрации больше 0,5 % и рН ≤ 3,4.

Для установления состояния молочной кислоты в растворе строили расчетную кривую зависимости содержания ионной формы молочной кислоты от рН раствора (рисунок).

Как видно из рисунка, если при рН 2 лактат в растворе полностью находится в виде недиссоциированной кислоты, то при рН = 6,0 он в основном переходит в диссоциированную форму и в полученном продукте, содержащем бактериоцин, находится в форме лактат-иона.

Таблица 1

Сорбция биоингибирующего продукта из супернатанта КЖ на анионообменной смоле ЭДЭ-10П

Объем фракции, мл	Содержание СВ во фракции, %	рН фракции	Биоингибирующая активность фракции, Ае/мл
1000	0	7,3	Не обнаружена
1000	0	7,5	То же
1000	2,3	8,0	“_“
1000	2,8	8,5	“_“
1000	4,5	10,1	“_“
1000	5,0	10,3	165
1000	5,5	9,5	190
2000	3,1	9,1	150
2000	0,7	8,7	Не обнаружена
1000	0,2	7,9	То же
1000	0	7,3	—”_

Элюция антимикробного продукта с анионита 3%-ным раствором аммиака

Объем фракции, мл	Биоингибирующая активность фракции, Ае/мл	Содержание СВ, %	pH фракции
500	Не обнаружена	0	5,0
500	То же	0,5	5,0
500	1350	8,0	5,0
500	1640	9,5	5,0
500	1240	9,5	5,7
500	415	8,0	6,0
590	Не обнаружена	3,2	10,4
650	То же	0,3	11,2

Использованный способ ионообменной хроматографии позволяет очистить целевой продукт от положительно заряженных неорганических и органических соединений, а также от основного количества незаряженных сопутствующих целевому продукту компонентов (см. табл. 1).

Исследования показали, что разработанную процедуру можно использовать и для выделения и очистки биоингибирующих продуктов из супернатантов КЖ дрожжей [16].

Установлено, что при ионообменном методе выделения биоингибирующего продукта из супернатанта целевой продукт удается очистить от сопутствующих примесей только частично. Для дополнительной очистки полученного элюата от примесей нами применялся экстракционный способ. Исходя из того, что биоингибирующие продукты устойчивы в среде органических растворителей [17], для их экстракции из элюатов тестиرو-

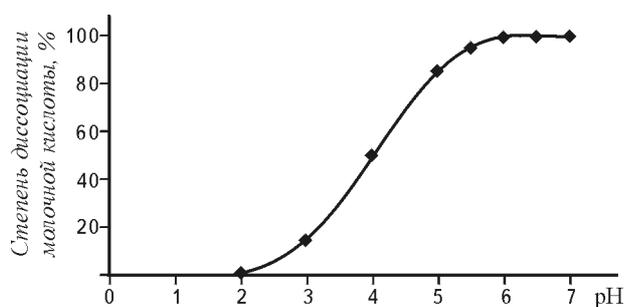
вали различные органические экстрагенты. Необходимо отметить, что в литературе описаны подобные подходы доочистки растворов биоингибиторов [8]. В качестве растворителей в данной работе использовали изоамиловый спирт, хлороформ, *n*-пропанол, гексан, диэтиловый эфир и петролейный эфир. Органический слой упаривали, к образовавшемуся осадку добавляли NaCl в концентрации 8 г/л и определяли биоингибирующую активность полученного образца.

В работе [18] раствор осадка супернатанта биоингибитора экстрагировали 15 объемами (по отношению к объему раствора) смеси хлороформ — метанол (2:1 об/об). Дальнейшую очистку полученного образца осуществляли с помощью ВЭЖХ.

Необходимо отметить, что такие процедуры, как ВЭЖХ, слишком дороги для использования в производственной практике.

Результаты выделения биоингибитора из элюата ионообменной колонки с использованием метода экстракции представлены в табл. 3.

Как видно из данных табл. 3, из применяемых органических растворителей сравнительно эффективным оказались ДМК, ДЭК и ацетонитрил. Высокая экстрагирующая способность этих соединений, по-видимому, связана с величиной их дипольных моментов. Так например, если для использованных предельных углеводородов дипольный момент близок к нулю, для эфиров составляет от 0,4 до 1,3, для хлороформа — 1,15, то для указанных кетонов и ацетонитрила этот показатель превышает 2,8.



Зависимость ионного статуса молочной кислоты от pH раствора

Экстракция биоингибирующего продукта из элюатов различными органическими растворителями

Название экстрагента	Объемное соотношение элюат/экстрагент	Объем экстракта после упаривания, мл	Объем водной фазы после упаривания, мл	Биоингибирующая активность экстракта, Ае/мл	Биоингибирующая активность водной фазы, Ае/мл	Величина дипольного момента экстрагентов
Гексан	1:1	2,3	17,6	6500	5740	0,08
Гептан	1:1	2,5	17,9	7000	5300	Неизвестна
Диметилэфир	1:1	2,2	16,0	6000	6200	1,3
Диоксан	1:1	2,5	17,0	6700	5350	0,45
Хлороформ / метанол	1:1	2,0	18,1	8000	5600	1,15/1,7
ДМК	1:1	2,7	16,8	28000	2420	2,84
ДМК	1:1	2,8	17,0	26800	2750	2,84
ДМК	1: 0,7	2,8	17,7	25100	2600	2,84
ДМК	1: 0,5	2,3	17,5	22400	3700	2,84
ДЭК	1:1	2,6	17,0	27200	2600	Неизвестна
Ацетонитрил	1:1	2,6	17,5	27800	2500	3,2
Этилацетат	1:1	2,3	17,3	7300	5700	1,78
Толуол	1:1	2,1	16,8	6900	6000	0,36
Диметилформамид	1:1	Расслоение не происходит	—	—	—	3,82

Несмотря на то, что из использованных органических растворителей наибольшую величину дипольного момента имеет диметилформамид, его применение для экстракции нецелесообразно, так как он не отделяется от водного раствора биоингибирующего продукта.

Из использованных экстрагентов наиболее приемлемыми оказались ДМК и ДЭК по причине их низкой стоимости в сравнении со стоимостью, например, ацетонитрила. Что касается выбора из двух примененных кетонов, то для экстракции целевого продукта исходя из доступности предпочтительнее использование ДМК.

С помощью микробного анализа было установлено, что полученный упаренный экстракт подавляет рост условно-патогенных (*E. coli*, *S. typhimurium* и *B. subtilis*) и патогенных (*S. aureus*-21G, *Pseudomonas aeruginosa*-12, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis* 597) культур при 200-кратном разбавлении полученных образцов АМП (табл. 4).

Исследования показали, что при экстракции около 62—65% биоингибирующего продукта из элюата переходит в органическую фазу. Если учесть, что оставшиеся в водном растворе примерно 38—35% биоингибирующего продукта после отгонки экстрагента возвращается на стадию ионообменной очистки, то выход целевого продукта на стадии экстракции можно довести до 97%.

Выход целевого продукта из супернатанта с учетом возврата растворов в технологический цикл составляет ~ 64 %.

В описанных экспериментах использовали традиционную питательную среду MRS. Ранее нами была показана возможность выращивания МКБ в лабораторных условиях с применением питательной среды, приготовленной на основе подтвороженной сыворотки [19—21], которая значительно дешевле MRS. Поэтому считаем целесообразным для перехода к масштабному процессу использовать разработанный нами указанный выше

Влияние очищенного биоингибирующего продукта (активность 28000 Ае/мл) на рост патогенных и условно-патогенных бактерий

Разбавление, раз	Диаметр зоны ингибирования, мм					
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
50	11	12	11	11	12	10
100	6	7	7	6	5	7
150	4	3	2	3	4	3
200	2	Подавляет рост				
250	Не подавляет рост					

состав питательной среды. Результаты проведенных исследований показали отсутствие существенного различия в уровне синтеза антимикробных веществ и эффективности стадий очистки КЖ при использовании среды, содержащей подворожную сыворотку, и MRS.

Точный материальный баланс процесса может быть составлен после проведения опытно-промышленных работ.

Авторы работы [22], исследующие продукты метаболизма, полученные в процессе культивирования аналогичных штаммов молочнокислых бактерий, показали, что антимикробные свойства конечного продукта связаны с наличием в нем низкомолекулярного пептида. С помощью масс-спектрометра (MALDI-TOF/TOF) определена молекулярная масса пептида (1,1 кДа), а с помощью секвенирования установлено, что он состоит из 11 аминокислотных остатков следующего состава Asp-Val-Gly-Val-Leu-X-Pro-Pro-X-Leu-Val [22].

Разработанный комбинированный способ выделения и очистки антимикробного продукта был применен для получения биоингибирующих продуктов из КЖ различных МКБ и дрожжей. Различия заключались в количественном выходе биоингибирующих продуктов, обусловленном их содержанием в КЖ.

Получено 17.06.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Oscariz, J.C. Classification and mode action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria / J.C. Oscariz, A.G. Pisabarro // Int. Microbiol. — 2001. — N 4. — P. 13—19.
2. Yoneyama, H. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development / H. Yoneyama, R. Katsumata // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2006. — V. 70 (5). — P. 1060—1075.
3. Kozak, W. Lactocin-a bacteriocin produced by Streptococcus / W. Kozak, J. Bardowski, W.T. Dobranski // Lactis. Bull. Acad. Pol. Sci. — 1977. — V. 25. — P. 217—221.
4. Chung-Hoi, Kim. Purification and Molecular Characterization of a Bacteriocin from *Pediococcus* sp. KCA 1303-10 Isolated from Fermented Flatfish / Kim Chung-Hoi, Ji Geun-Eog, Ahn Cheol // Food Sci. Biotechnol. — 2000. — V. 9. — N 4. — P. 270—276.
5. Todorow, S. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough / S. Todorow, B. Onno, O. Sorokine // Int. J. Food Microbiol. — 1999. — V. 48. — P. 167—177.
6. Lu, R. Isolation, identification, and characterization of small bioactive peptides from *Lactobacillus* GG conditional media that exert both anti-Gram-negative and Gram-positive bactericidal activity / R. Lu, S. Fasano, N. Madayiputhiya, N. Morin, J. Nataro, A. Fasano // J. Pediatric Gastroenterol. Nutr. — 2009. — V. 49. — P. 23—30.
7. Kyoung-Sik, H. Characterization and purification of Acidocin 1B, Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* GP 1B / H. Kyoung-Sik, K. Younhoon, K. Sae-Hun, O. Sejong // J. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 17. — N 5. — P. 774—783.
8. Ogunbanwo, S.T. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1 / S.T. Ogunbanwo, A.I. Sanni, A.A. Onilude // African J. Biotechnol. — 2003. — V. 2. — N 8. — P. 219—227.
9. Coventry, M.J. A Food-Grade Process for Isolation and Partial Purification of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria That Uses Diatomite calcium Silicate / M.J. Coventry, J.B. Cordon, M. Alexander, M.N. Hickey, J. Wan // Appl. Environ. Microbiol. — 1996. — V. 62. — N 5. — P. 1764—1769.
10. Караханян М.Г. Исследование продуктов метаболизма *Lactobacillus acidophilus* 1991 в технологии производства

- плавленных сыром / М.Г. Караханян, Р.А. Бегларян, Э.В. Амбарцумян, Ф.Н. Тхруни // Изв. Арм. сельскохозяйственной акад. — 2004. — № 3—4. — С. 144—147.
11. *Karapetyan K.Dz.* Сравнительная оценка ряда свойств новых штаммов молочнокислых бактерий / Биол. ж. Арм. — 2009. — Т. 41. — № 4. — С. 36—42.
 12. *Parente, E.* A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity / E. Parente, C. Brienza, M. Moles, M. Ricciardi // J. Microbiol. Methods. — 1995. — V.22. — P. 95—108.
 13. *Tkhruni, F.N.* A073 Nature of biologically active substances of *Lactobacillus rhamnosus* / F.N. Tkhruni, K.J. Karapetyan, S.C. Chailyan // Russ. J. Inf. Immun. — 2014. — September. — Spec. Iss. — P. 57—58.
 14. *Самсонов Г.В., Тростянская Е.Б., Елькин Г.Э.* Ионный обмен. Сорбция органических веществ. —Л.: Наука, 1969. — 332 с.
 15. *Агаджанян А.Е., Тхруни Ф.Н., Амбарцумян Г.В., Оганисян Г.Ж., Балабекян Ц.Р., Варданян А.А.* Способ получения продукта обмена веществ штамма *Lactobacillus acidophilus* 1991, обладающего бактериоцидным свойством // Патент Армении N 1723, С 12 P 1/04. 2006.
 16. *Агаджанян А.Е., Тхруни Ф.Н., Оганисян Г.Ж., Егиян К.И., Варданян А.А., Сагиян А.С.* Выделение и очистка биоингибирующего продукта из культуральной жидкости // Патент Армении N 2925 А, С 12P 1/00. 2015.
 17. *Saleem, F.* Comparative study of two bacteriocins produced by representative indigenous soil bacteria / F. Saleem, S. Ahmad, Z. Yaqood, A. Rasool // Park. J. Pharm. Sci. — 2009. — V. 22. — N 3. — P. 252—258.
 18. *Zamfir, M.* Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 / M. Zamfir, R. Gallewaert, P.C. Cornea, L. Savu, I. Vatafu, L. De. Vuyst // J. Appl. Microbiol. — 1999. — V. 87. — P. 923—931.
 19. *Карапетыан К.Дж.* Влияние состава питательной среды на проявление антимикробных свойств некоторых молочнокислых бактерий / К.Дж. Карапетыан, А.С. Акопян, Ф.Н. Тхруни // Ученые записки Ереванского гос. ун-та. — 2008. — № 3 (217). — С. 125—130.
 20. *Melik-Andreasyan, G.G., Tkhruni, F.N.* Evaluation of antibiotic resistance of human gut microbiota pathogens: Intern. scientific-practical conf. "Modern problems of infectious pathology of human" October 31-November 1. V. 6. — Minsk: Book of Sci. Papers, 2013. — P. 208—2013.
 21. *Tkhruni, F.N., Aghayan, A.S., Karapetyan, K.J., Aghajanyan, A.E.* Study of antimicrobial properties of nev strains of lactic acid bacteris against sporogenous microflora: The 1-st Intern. Symp. "Traditional foods from Adriatic to Caucasus". On Line. Tekirdag, Turkey, 15-17 April, 2010. — Terirdag: Univ. Terirdag, 2010. — P. 996—998.
 22. *Mkrtchyan, H.* Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain Narine / H. Mkrtchyan, S. Gibbons, S. Heidelberger, M. Zloh, H. Khalatbari Limaki // Intern. J. Antimicrob. Agents. — 2010. — V. 35. — P. 255—260.
- A.E. AGHAJANYAN*, F.N. TKHRUNI, G.Zh. HOVHANNISYAN, K.I. YEGHIYAN, A.A. VARDANYAN, and A.S. SAGHIYAN
- Armbiotechnology, Natl. Acad. Sci. Republic of Armenia, 0056, Yerevan Armenia
- e-mail: aghajanyanarmen@yahoo.com

Isolation and Purification of Bioinhibitory Product from Culture Liquid of Lacticacid Bacteria *Lactobacillus acidophilus* 1991 VKPM 6257 and *Lactobacillus rhamnosus* INMIA 9614

The process of the ion-exchange method for the isolation and purification of bioinhibitory product from culture liquids (CL) of lacticacid bacteria, *Lactobacillus acidophilus* and *L. rhamnosus*, has been studied and the optimum parameters of the process have been determined. To purify the target product from related admixtures the eluates after the ion-exchange isolation were subjected to extraction. The experiments showed that dimethylketone and diethylketone proved to be the most efficient extractants. The yield of the target product from the supernatant was ~ 64 % taking into account the solution return to the technological cycle. The bioinhibiting activity of the obtained product was equal to 28,000 AU/ml. The accompanying bactericidal effect of lactic acid on the growth of Gram-positive and Gram-negative cultures was only visible at pH ≤ 3.4 and concentration more than 0.5%.

Key words: bioinhibitor, extraction, ion exchange, isolation, lactic acid.

* Author for correspondence.