

УДК 579.678

АНТИМИКРОБНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ: РАЗНООБРАЗИЕ И СВОЙСТВА (ОБЗОР)

© 2012 г. Л. Г. Стоянова, Е. А. Устюгова, А. И. Нетрусов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Биологический факультет, Москва 119992

e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Поступила в редакцию 16.06.2011 г.

В обзоре представлены данные литературы по антимикробным метаболитам, синтезируемым молочнокислыми бактериями (МКБ), которые издавна используются для приготовления молочнокислых продуктов. Обобщены сведения по низкомолекулярным антимикробным веществам, являющимся основными или побочными продуктами молочнокислого брожения. В отдельных главах рассмотрено многообразие фунгицидных веществ МКБ и бактериоцинов в связи с их потенциальным использованием в качестве консервантов пищевых продуктов. Более подробно дана характеристика и классификация бактериоцинов, их синтез и механизм действия рассмотрены на примере низина А, относящегося к I классу лантибиотиков, синтезируемого бактериями *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Механизм действия бактериоцинов II класса рассмотрен на примере лактицина. В заключении приведены основные перспективные направления использования антимикробных метаболитов МКБ в промышленности и медицине.

Молочнокислые бактерии (МКБ) уже более ста лет привлекают внимание исследователей. Интерес многих ученых к МКБ связан с их влиянием на здоровье человека и способностью к консервированию пищевых продуктов. На взаимосвязь между МКБ и здоровьем человека впервые указал И.И. Мечников, предположив, что причиной большого количества заболеваний является отрицательное действие на ткани человеческого организма разнообразных токсинов и метаболитов, образуемых микроорганизмами, попадающими в организм человека. В поисках способов борьбы с преждевременным старением он обнаружил свойство молочнокислых бактерий подавлять развитие вредных микробов, обитающих в желудочно-кишечном тракте [1]. Этому факту долгое время не придавали должного значения, и лишь в 90-е годы прошлого столетия после ряда успешных исследований ученые вновь вернулись к идее И.И. Мечникова о значительной роли МКБ в поддержании здоровья человека. Эти исследования явились стимулом к изучению их антимикробных и пробиотических свойств.

Увеличение сроков хранения пищевых продуктов интересовало человечество еще с древних времен. Наиболее часто в качестве консервантов использовали поваренную соль с добавлением в ряде случаев уксусной кислоты. В последнее время в пищевой промышленности активно используются химические консерванты и антибиотики, обладающие бактерицидными и фунгицидными свойствами. Однако такие консерванты вызывают опасения у потребителей вследствие их токсичности и возможности подавления естественной микробиоты организма.

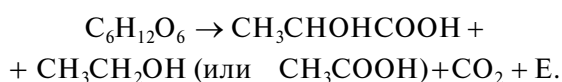
Использование МКБ и их метаболитов, обладающих антимикробными свойствами, является одним из активно разрабатываемых альтернативных подходов к консервированию продуктов питания. Как известно, МКБ тесно ассоциированы с пищевыми продуктами и имеют "GRAS" (Generally Recognized As Safe) статус, что определяет их как абсолютно безопасные для здоровья человека и животных. Основными антимикробными веществами МКБ являются органические кислоты, образуемые в процессе сбраживания сахаров, что приводит к быстрому закислению среды обитания и предотвращению развития других групп микроорганизмов [2]. За последние десятилетия появилось много данных о продукции МКБ антимикробных веществ, относящихся к разным классам органических соединений и обладающих способностью подавлять развитие других микроорганизмов. Некоторые из таких метаболитов, в частности бактериоцин и низин, с успехом используют в промышленности для увеличения сроков хранения продуктов питания. Но потребность пищевой промышленности в новых антимикробных веществах постоянно растет, поэтому выделение и описание веществ с антимикробными свойствами, образуемых МКБ, является перспективным и практически важным направлением развития фундаментальных исследований. Свойства отдельных антимикробных метаболитов МКБ, механизм их действия, а также перспективы использования в качестве консервантов будут рассмотрены в данном обзоре.

Свойства молочнокислых бактерий. МКБ – это грамположительные, не образующие спор (за исключением представителей рода *Sporolactobacillus*), каталазоотрицательные бактерии, лишенные цитохромов, аэро- и кислототолерантные, образующие молочную кислоту в качестве конечного метаболита. В природе молочнокислые бактерии приурочены к местообитаниям, богатым питательными веществами: молоко, мясо, овощи, некоторые виды обитают на растениях, другие составляют нормальную микрофлору пищеварительного тракта человека и животных [3]. Исторически бактерии, относящиеся к родам *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* и *Lactobacillus*, формируют ядро этой группы [4].

Источником энергии для молочнокислых бактерий служит молочнокислое брожение. Известны два основных пути превращения сахаров, используемых МКБ: гликолиз (путь Эмбдена–Мейергофа–Парнаса) и 6-фосфоглюконат-фосфокетотазный путь (путь Варбурга–Хорекера) [5].

В результате гликолиза образуется до 98% молочной кислоты: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH(OH)COOH + E$. Бактерии, входящие в эту группу, называются гомоферментативными. К представителям, вызывающим гомоферментативное молочнокислое брожение, относятся следующие МКБ: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* bv. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*.

Бактерии, использующие 6-фосфоглюконат-фосфокетотазный путь, в процессе молочнокислого брожения кроме молочной кислоты образуются еще и значительные количества уксусной кислоты, этилового спирта, углекислого газа и иных побочных нейтральных продуктов (диацетила, ацетоина), на что идет до 50% сбраживаемых гексоз. Этот тип брожения называется гетероферментативным:



Процесс гетероферментативного молочнокислого брожения более сложный по сравнению с гомоферментативным типом. Представителями гетероферментативных молочнокислых бактерий являются некоторые палочковидные лактобациллы (*L. brevis*, *L. fermentum*), подрод *Streptobacterium*, из кокковых – *Streptococcus acetoinicus*, все виды рода *Leuconostoc* [5].

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МКБ

Подробное исследование МКБ в течение последних десятилетий выявило их способность образовывать антимикробные вещества различной

природы [3]. Многие штаммы МКБ образуют кроме молочной кислоты значительное количество неспецифических низкомолекулярных соединений, таких, как: органические кислоты, пероксид водорода, диацетил, реутерин и др., которые и определяют спектр их антимикробного действия.

Органические кислоты. Как указано выше, основными конечными метаболитами, образуемыми МКБ в процессе брожения, являются молочная и уксусная кислоты. Уксусная кислота обладает более широким спектром антимикробного действия по сравнению с молочной. В то же время для обеих кислот известно синергидное действие: смесь уксусной и молочной кислот задерживает рост патогенных грамотрицательных энтеробактерий *Salmonella typhimurium* [5]. Отмечается, что L-лактат обладает большей ингибиторной способностью по сравнению с D-изомером [6]. Различные микроорганизмы по-разному реагируют на кислотность среды обитания, например при рН ниже 5.0 молочная кислота ингибирует рост спорообразующих бактерий, но не влияет на развитие микроскопических грибов и дрожжей.

Пероксид водорода. В присутствии кислорода МКБ также способны образовывать H_2O_2 при действии НАДН-оксидазы и супероксиддисмутазы. В отсутствие гема в среде МКБ не образуют каталазу, что приводит к накоплению пероксида, эффект которого может усиливаться в присутствии лактопероксидазы и тиоцианата, имеющихся в природных местообитаниях МКБ, например в молоке [7]. Антимикробное действие пероксида связано с сильным окислительным эффектом. Вследствие накопления бактериями *Lactococcus* и *Lactobacillus* перекисей наблюдали также ингибирование развития золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных *Pseudomonas* spp., вызывающих порчу пищевых продуктов [6].

Пирролидон-5-карбоксильная кислота. Эта кислота образуется лишь некоторыми видами МКБ, такими, как *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *L. casei* ssp. *pseudoplantarum*, и обладает бактерицидной активностью в отношении *Bacillus subtilis* и *Enterobacter cloacae* [6].

Диацетил. Диацетил – ароматобразующий компонент сливочного масла образуется в процессе превращения цитрата через пируват. Максимальное образование диацетила наблюдается при слабокислом рН. Он активен, в основном, против грамотрицательных бактерий, принадлежащих к родам *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia* и *Aeromonas*, а также грамположительных, относящихся к роду *Bacillus* [8].

Реутерин (β-ОН-пропионовый альдегид). Это вещество образуется в анаэробных условиях из глицерина бактериями *Lactobacillus reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides* и *L. corniformis* [9]. Реуте-

Таблица 1. Дикетопиперазины, синтезируемые молочнокислыми бактериями [11]

Дикетопиперазины	Продуцент	Структурная формула
Цикло (L-Фен-L-Про)	<i>Lactobacillus plantarum</i> MiLAB 393, <i>L. coryniformis</i> Si3	
Цикло (L-Фен-транс-4-ОН-L-Про)	<i>L. plantarum</i> MiLAB 393, <i>L. coryniformis</i> Si3	
Цикло(L-Фен-цис-4-ОН-D-Про)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> MiLAB 170, <i>L. plantarum</i> MiLAB 14	

рин проявляет антагонистическую активность по отношению ко многим патогенным микроорганизмам, таким, как энтеробактерии (*Salmonella*, *Shigella*), бактерии родов *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, дрожжи рода *Candida* и простейшим рода *Trypanosoma*. Широкий спектр действия обусловлен тем, что реутерин связывается с SH-группами ферментов, в том числе и с рибонуклеотид-редуктазой [7].

ФУНГИЦИДНЫЕ ВЕЩЕСТВА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Проявление фунгицидной активности является нехарактерным физиологическим свойством для МКБ. Многие штаммы микромицетов чувствительны к молочной и уксусным кислотам, выделяемым МКБ. Однако в последнее время появилось ряд сообщений об образовании некоторыми штаммами МКБ специфических фунгицидных веществ. Наибольшее количество таких штаммов было выделено с растений, хранившихся в анаэробных условиях [9]. Известны следующие типы фунгицидных веществ, образуемых МКБ: дикетопиперазины или циклические дипептиды (цикло-Гли-L-Лей), цикло-(L-Фен-L-Про) и цикло-(L-Фен-транс-4-ОН-L-Про), гидроксипроизводные жирных кислот (п-гидроксифениллактат), бензойная кислота, метилгидантоин, мевалонлактон, пентоцин TV35b, реутерин. Первые три типа веществ в литературе охарактеризованы более полно [10].

Дикетопиперазины. Эти вещества долгое время считали продуктами деградации белков. Механизм их образования до сих пор полностью не выяснен, однако установлено, что синтез происходит нерибосомальным путем с участием мультифункционального фермента. Дикетопиперазины могут также образовываться из пептидов в условиях щелочной или кислой среды. Дикетопиперазины, образуемые некоторыми штаммами МКБ [11] приведены в табл. 1. Недавно из *Lactobacillus plantarum* AF1 было выделено новое соединение с фунгицидным действием, идентифицированное как 3,6-бис-(2-метилпропил)-2,5-пиперазиндион. Это единственное сообщение о фунгицидной активности МКБ, обусловленной циклическим соединением (Leu-Leu), которое принадлежит к классу 2,5-дикетопиперазинов [12].

Гидроксипроизводные жирных кислот. Некоторые МКБ образуют 2-гидрокси-гексановую и 3-гидрокси-гептадекановую кислоты, принадлежащие к этому классу веществ. Штамм *L. plantarum* MiLAB14 образует несколько гидроксированных жирных кислот с сильным фунгицидным эффектом: 3-гидроксидекановую кислоту, 3-гидроксидодекановую кислоту, 3-гидрокситетрадекановую и 3-гидрокси-5-цис-додекановую кислоты. МКБ образуют гидроксипроизводные жирных кислот из их ненасыщенных аналогов. Все описанные ненасыщенные жирные кислоты проявляют антибиотическую активность в отношении широкого круга дрожжей и плесневых грибов [9]. Из-за плохой растворимости в водных растворах гидроксированные жирные кислоты имеют об-

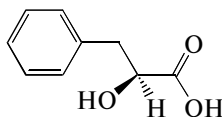


Рис. 1. Структура 3-фениллактата [14].

ший ингибиторный эффект в диапазоне от 10 до 100 мг/мл.

3-фениллактат. Вещество является одним из метаболитов обмена фенилаланина и может образовываться в клетках МКБ из п-гидроксифенилпирувата. Этот конечный метаболит проявляет антибиотическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также действует на широкий круг микроскопических грибов [13]. Согласно литературным данным, *L. plantarum* обладает способностью образовывать несколько сходных веществ: фениллактат, 4-гидрокси-фениллактат, а также 3-гидрокси-фениллактат, в то время как *L. coryniformis*, *L. sakei* и *Pediococcus pentosaceus* образуют только фениллактат [14]. Фениллактат, кроме лактобацилл, образуют и пропионовоковые бактерии. На рис. 1 представлена его структурная формула.

В литературе имеются единичные сведения о мезофильных лактококках, обладающих фунгицидной активностью. В частности, из молочнокислых продуктов был выделен штамм *Lactococcus lactis* L14, ингибирующий рост *Candida albicans* DMST 5239. Активность этого штамма была стабильной в диапазоне pH 2.0–4.0 и сохранялась даже после автоклавирования [15]. Рой с соавт. [16] выделил из культуры *L. lactis* фунгицидный компонент пептидной природы. Помимо этого было описано ингибирование роста и продукция афлатоксина грибами *Aspergillus flavus* при совместном культивировании последних с лактококками. Активным компонентом в данном случае был низкомолекулярный фосфогликолипид с молекулярной массой меньше 500 Да, содержащий ароматическое кольцо [7]. За ингибирование продукции афлатоксина отвечало термостабильное низкомолекулярное вещество, теряющее активность при длительном хранении [17].

На кафедре микробиологии МГУ из молочнокислых продуктов были выделены штаммы лактококков, которые обладали широким спектром антибиотического действия, включая и фунгицидное. Эти штаммы ингибировали развитие плесеней, принадлежащих к родам *Aspergillus*, *Fusarium* и дрожжей родов *Candida*, *Rhodotorula*. Среди них были природные штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, выделенные из свежего коровьего молока и кисломолочных продуктов, а также полученные методом клеточной инженерии [18, 19]. Штаммы лактококков, идентифицирован-

ные как *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, синтезировали вещества, относящиеся к алкилароматическим кетонам, которые и определяли их фунгицидную активность [20], что указывает на перспективу применения этих лактококков для предотвращения порчи овощей и фруктов из-за обсемененности их плесневыми грибами и дрожжами [21–23].

БАКТЕРИОЦИНЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, КЛАССИФИКАЦИЯ, СВОЙСТВА

Бактериоцины – это гетерогенные антибактериальные пептиды, разнообразные по уровню активности, спектру и механизму действия, молекулярной массе и физико-химическим свойствам. Известно, что многие микроорганизмы способны к синтезу бактериоцинов. Но бактериоцины МКБ представляют наибольший интерес с точки зрения применения их в качестве новых консервантов. Исследования в области изучения бактериоцинов у молочнокислых бактерий начались в 1930-х годах прошлого столетия с работы по низину, продуцентом которого были лактококки *L. lactis* subsp. *lactis* [24]. К настоящему времени изучено и полностью охарактеризовано большое количество бактериоцинов, синтезируемых как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями. Производящие бактериоцины МКБ включают представителей разных родов: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* и *Streptococcus*. Синтез бактериоцинов штаммоспецифичен. Наибольшее количество бактериоцинообразующих бактерий было выделено из молочных и мясных ферментированных продуктов, силоса, но ряд штаммов (*Enterococcus durans*, *Lactobacillus animalis*, *Leuconostoc* sp.) были выделены из почвенных образцов [25]. Имеются сведения, что штаммы *L. lactis* subsp. *lactis*, продуцирующие низин, были выделены из женского молока [26]. Бактериоцины отличаются от классических антибиотиков тремя основными свойствами: синтез бактериоцинов происходит на рибосомах, бактериоцины обладают специфическим спектром действия, каждый бактериоцин имеет свой собственный специализированный иммунный белок [27].

Бактериоцины МКБ по химическому строению разделяются на несколько классов.

Класс I – лантибиотики, представляющие собой пептиды с модифицированными аминокислотами (лантионин, β-метиллантионин). К этому классу принадлежат два типа лантибиотиков:

1. тип А – линейные, гибкие пептиды, формирующие поры в бактериальной мембране, например низины [28];

2. тип В – жесткие, глобулярные, не несущие заряд или заряженные отрицательно пептиды. К

Таблица 2. Физико-химические и биологические свойства компонентов бактериоциноподобного комплекса, образуемого гибридным штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116 [20]

Свойства	Компонент				
	ЛГС-В	ЛГС-С	ЛГС-Н ^{1*}	ЛГС-Н*	Низин А
Мол. масса, (M + H) ⁺ , m/z, (MALDI-MS)	506.9	—	3161.6	3353	3353**
УФ-спектр, λ _{max} , нм, (растворитель)	260 (C ₂ H ₅ OH)	215; 274 (C ₂ H ₅ OH)	215 (H ₂ O)	215 (H ₂ O)	215 (H ₂ O)
ТСХ (SiO ₂), R _F в системе: метанол–H ₂ O (96 : 4)	0.75	0.43	0	0	0
Электрофорез на бумаге** в электролите: 1) E ₁ , pH = 2.4, 550 В, 2 ч, см	0	0	11	9.5	9.5
2) E ₂ , pH = 1.1, 250 В, 3 ч, см	0	0	4.3	3.3	3.3
Биологический спектр действия	Бактерии и грибы	Слабое действие на Грам+ бактерии	На Грам+ бактерии, включая термостойкую <i>B. coagulans</i>		

* Фракции ЛГС-Н получены методом препаративного электрофореза на бумаге в электролите E₁ (550 В, 2.5 ч). Проявляли реактивом Паули и биоавтографией с использованием тест-организмов *B. subtilis* и *B. coagulans*.

** Расстояние, пройденное веществом от стартовой линии к катоду, в см: “0 см” (на линии старта) – электронейтральное вещество; “3.3–11 см” (миграция к катоду) – вещество основного характера.

лантибиотикам типа В принадлежат мерсацидин, актагардин и цинамицин [29, 30].

Класс II – пептиды, не содержащие модифицированных аминокислот, которые в свою очередь подразделяются на три основные группы:

1. подкласс IIa – пептиды, имеющие специфическую консервативную N-концевую последовательность Тир-Гли-Асп-Гли-Вал-Хак-Цис, как правило, термостабильные, содержащие от 37 (у лейкоцина А и мезентерицина Y105) до 48 аминокислот, например у карнобактериоцина В2 и энтероцина SE-K4 [31], отличающиеся высокой активностью по отношению к патогенным бактериям рода *Listeria*, часто встречающимся в пищевом сырье;

2. подкласс IIb – дипептидные бактериоцины, имеющие в лидерном пептиде двойной глициновый мотив (лактококцин G, плантарицин E/F, лактацин F, термофилин 13);

3. подкласс IIc – циклические бактериоцины с ковалентно замкнутым C- и N-концами [32].

Класс III – крупные (с молекулярной массой более 30 кДа) нелантибиотиковые, термолабильные белки, такие, как гелветицин J и лактацин B [33].

Класс IV – сложные бактериоцины, содержащие как белковые, так и липидные или углеводные компоненты [34]. Сведения по этому классу бактериоцинов малочислены и разноречивы.

Один вид МКБ и даже штамм может образовывать бактериоцины разных классов. Например, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* является продуцентом таких лантибиотиков, как: низины А, В, С, L, Z, Q, F [35], лактицин 481 и дипептидный лантибиотик лактицин 3147 [36]. Из бактериоцинов второго класса лактококки образуют лактококцин 972 [37], лактицин QU 5 [38]. Недавно был

обнаружен бактериоцин, имеющий циклическую структуру – лактоцилин Q, образуемый *Lactococcus* sp. QU 12 [39].

Как показало сравнительное изучение штаммов, проведенное на кафедре микробиологии МГУ, синтез бактериоцинов штаммоспецифичен [20]. Среди изученных штаммов были природные штаммы 194 и 119х, классический низинообразующий штамм МГУ, полученный в результате адаптивной селекции по низину, рекомбинантный штамм F-116, полученный методом слияния протопластов двух родственных штаммов 729 и 1605. Штамм 729 – природный штамм, выделенный из молока, штамм 1605 – мутант, полученный в результате индуцированного мутагенеза.

Бактериоцины, синтезируемые штаммами 119х и МГУ, по физико-химическим свойствам не отличались от низина (рис. 1), в то время как из гибридного штамма F-116 был выделен антибиотический комплекс, представляющий собой сложную смесь биологически активных компонентов, состоящих из трех отдельных фракций с разными физико-химическими и биологическими свойствами (табл. 2). Основной фракцией антибиотического комплекса являлась пептидная фракция, активная в отношении только грамположительных бактерий, включая спорую кислотоустойчивую бактерию *B. coagulans*, доминирующую в консервах и пресервах. Эта фракция была полипептидом, распадающимся в кислой среде на две субъединицы с молекулярными массами 3353 и 3376 Да. По химической структуре и антибиотическому действию фракция близка к низину. Из другой фракции получен хроматографически чистый фунгицидный компонент с молекулярной массой 506.9 Да, который на основании ИК-спектра был отнесен к группе алкилароматических ке-

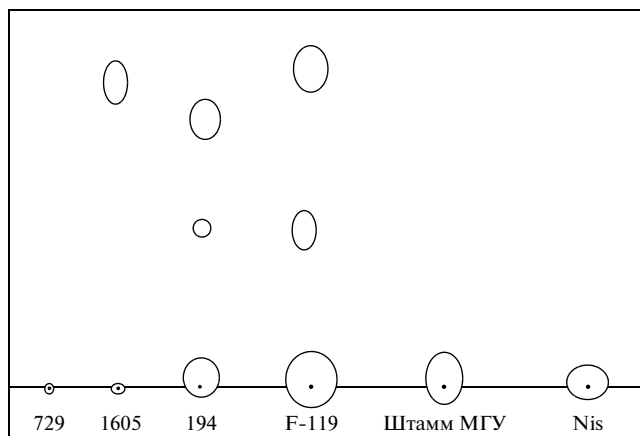


Рис. 2. Тонкослойная хроматография бактериоцин-подобных комплексов, продуцируемых гибридным штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-119 и его родителями в сравнении с низином, низинообразующим штаммом МГУ и природным штаммом 194 [20] в системе метанол–вода (96 : 4); биоавтография на пластинках “Silufol”, тест-организм – *B. coagulans*.

тонов, содержащих также гидроксильные группы (рис. 2, табл. 2). Третья фракция – минорная, биологическая активность ее была незначительной. Физико-химические и биологические свойства выделенных компонентов антибиотического комплекса, образуемого штаммом F-116, представлены в табл. 2. Анализ этих данных с помощью компьютерной базы данных биологически активных веществ программы BNPD [40] позволил заключить, что компоненты основной пептидной фракции (ЛГС-Н и ЛГС-Н¹) являются низинами, причем ЛГС-Н с молекулярной массой 3353 Да абсолютно идентична низину А, два других компонента, включая фунгицидный, в литературе не описаны и являются новыми природными биологически активными веществами [41].

Лантибиотики. Лантибиотики (лантионинсодержащие пептиды) – полициклические молекулы, образующиеся в результате посттрансляционных модификаций белков-предшественников

Таблица 3. Характеристика некоторых лантибиотиков, продуцируемых МКБ [43]

Лантибиотик	Молекулярная масса, Да	Число тиоэфиров	Продуцент
Низин А	3353	5	<i>Lactococcus lactis</i>
Низин Z	3330	5	<i>L. lactis</i>
Лактицин 481	2901	3	<i>L. lactis</i>
Лактоцин S	2764	3	<i>Lactobacillus sake</i>
Карноцин И149	4635	2–3	<i>L. piscicola</i>

и содержащие модифицированные аминокислоты [42]. В их молекулах имеются сульфгидрильные кольца, образованные серосодержащими аминокислотами. Лантибиотики, продуцируемые МКБ, различаются по числу тиоэфирных связей (от 2 до 5) и молекулярным массам (табл. 3) [43].

Низин – наиболее изученный лантибиотик. Он эффективен против многих штаммов грамположительных бактерий, включая стафилококки, стрептококки, бациллы, клостридии и в меньшей степени против микобактерий [44]. Низин при концентрации 0.3 мг/мл способен тормозить прорастание спор бактерий, относящихся к родам *Bacillus* и *Clostridium*, в той же степени, что и термическая обработка [8]. Установлено, что низин взаимодействует с сульфгидрильными группами в мембране споры, тем самым препятствуя ее прорастанию [45, 46].

Дипептидные лантибиотики не выделены в отдельный класс бактериоцинов. Из них наиболее изучены плантарицин W, синтезируемый *Lactobacillus plantarum*, и лактицин 3147, продуцируемый *Lactococcus lactis*. Двухкомпонентный лантибиотик лактицин 3147 обладает относительно широким спектром действия. Он активен против метициллиноустойчивых штаммов *Staphylococcus aureus*, устойчивых к ванкомицину штаммов *Enterococcus faecalis*, устойчивых к пенициллину *Pneumococcus*, а также *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans* и пищевых патогенов: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus* [36]. Лактицин 3147 при концентрации 20000 МЕ/мл полностью подавлял популяцию патогенов численностью более 10⁴ кл. за 2 ч [47]. Оба пептида лактицина 3147, как и плантарицина W обладают бактерицидной активностью, но наибольшая активность наблюдалась при совместном действии этих пептидов в отношении 1 : 1. Плантарицин W содержит немодифицированные остатки аминокислот цистеина и серина, что является единственным примером среди лантибиотиков. Некоторые авторы предлагают выделить эти два бактериоцина в отдельное семейство [48]. Способность синтезировать двухкомпонентные бактериоцины, например саливарицин Р, имеется у многих генетически различных штаммов *Lactobacillus salivarius*, выделенных из кишечника человека. Бактерии *L. salivarius* включаются в состав пробиотических средств, так как саливарицин Р способствует снижению количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, не оказывая эффекта на общую численность лактобацилл в кишечнике [49].

Биосинтез и формирование зрелых молекул лантибиотиков. Лантибиотики синтезируются на рибосомах в виде пептидов–предшественников и подвергаются интенсивной посттрансляционной модификации [50]. Синтез лантибиотиков можно разделить на несколько основных этапов [51]:

1) рибосомальный синтез; 2) дегидратация серина и треонина с образованием 2,3-дегидроаланина и (Z)-2,3-дегидробутирина соответственно; 3) стереоселективное присоединение цистеина к дегидроаланину и дегидробутирину с образованием тиоэфирных колец лантионина (Лан) и β-метиллантионина (МетЛан) соответственно; 4) экспорт полностью модифицированного предшественника с помощью ABC-транспортера; 5) протеолитическое отщепление лидерного пептида [52].

На рис. 3 представлена схема биосинтеза низина [53]. Фермент NisA связывает N-конец, который называют лидерным пептидом. NisB и NisC катализируют формирование лактама: NisB является дегидратазой, действующей на серин и треонин, NisC – циклаза, формирующая все тиоэфирные кольца [54, 55]. Лантиониновые мостики, формирующие кольцевые структуры, служат в качестве стабилизаторов конформации, важной для биологической активности и устойчивости антибиотиков к протеазам. Удаление лидерного пептида из препептида катализируется ферментом NisP и является последней стадией процессинга [56]. Лидерный пептид имеет консервативную последовательность из 24–30 аминокислотных остатков и необходим для специфической доставки молекулы-предшественника, а также предотвращения активации внутри клетки [42].

В процессе созревания лактицина 481 фермент LctM катализирует обе реакции модификации препептида: дегидратацию серина и треонина и образование трех тиоэфирных циклов. Лидерный пептид отщепляется N-концевым доменом LctT (ABC-транспортера), который и экскретирует зрелый продукт. Конверсия препептидов антибиотиков в зрелые молекулы требует энергии АТФ и Mg^{2+} [57].

Гены биосинтеза антибиотиков организованы в кластеры. Помимо структурных генов пептидов имеются дополнительные гены, важные для проявления активности бактериоцинов. Эти гены кодируют [51]:

- 1) ферменты, которые включены в ряд модификаций: LanC катализирует дегидратацию серина и треонина, а LanB ответственен за формирование тиоэфирных связей между дегидрированными аминокислотами и цистеином;
- 2) белки для выделения препептида из клетки – LanT;
- 3) иммунные белки, включенные в самозащиту – LanI;
- 4) сериновую протеазу LanP, которая удаляет лидирующую последовательность при выделении антибиотика;
- 5) другие регулирующие белки.

Синтез молекул антибиотиков обеспечивается структурным геном *lan*. Во многих случаях *lanA* является первым геном в опероне и кодирует молекулу-предшественник [42]. Гены, ответственные за модификацию (*lanB*, *lanC*, *lanM*, *lanD* и *lanJ*), процессинг (*lanP* и *lanT*), транспорт (*lanT*), иммунитет (*lanI*, *lanEFG* и *lanH*) и регуляцию (*lanR*, *lanK*, *lanQ* и *lanX*), локализованы рядом со структурным геном. Участвующие в синтезе и регуляции бактериоцинов кластеры могут располагаться как на хромосоме, так и на плаزمиде. Как правило, гены сенсорных и регуляторных белков транскрибируются совместно. В локусах, связанных с синтезом антибиотиков, как правило, ген сенсорного белка следует за регуляторными генами. На рис. 4 приведены генные кластеры низина и лактицина 481 [51].

Транскрипция структурного гена *nisA* непосредственно регулируется секретлируемой и полностью модифицированной молекулой низина посредством передачи сигнала двухкомпонентной регуляторной системой [58]. В данном случае низин является феромоном с антимикробными свойствами [59]. Инициация с промотера гена *nisA* связана с продуктами генов *nisR*, кодирующей ответный регулятор и ген *nisK* – гистидинкиназу [60]. Концентрация низина, требуемая для индукции, менее 14 нг/мл. На первом этапе гистидин-киназа NisK реагирует на присутствие молекул низина в среде и автофосфорилируется в цитозоле. Затем фосфатная группа переносится на NisR, который является белком-активатором транскрипции в синтезе низина. На третьем этапе предшественник модифицируется с помощью ферментов NisB и NisC, после чего транслируется через мембрану ABC-транспортером NisT. Лидерный пептид отщепляется протеазой NisP [53].

Продукция лактицина 481 некоторыми штаммами *L. lactis* регулируется внеклеточным рН. Подкисление среды молочной кислотой стимулирует экспрессию с обоих промотеров [42].

Механизм действия антибиотиков. Бактериоцины молочнокислых бактерий, являясь катионами, действуют на мембраны клеток-мишеней, приводя к образованию пор и рассеиванию трансмембранного градиента ионов [61]. Антибиотики не нуждаются в специфическом белковом рецепторе, так как они связываются в местах синтеза клеточной стенки с липидом II [ундекапринил-пирофосфорил-MurNAc-(пентапептид)-GlcNAc] – веществом, участвующем в синтезе пептидогликана. Липид II – высоко динамичная молекула, присутствующая у всех бактерий и осуществляющая транспорт субъединиц клеточной стенки через цитоплазматическую мембрану [62]. Он представляет собой бактопrenoлсвязанный предшественник клеточной стенки и состоит из пептидогликановой головки -N-ацетилмурамово-

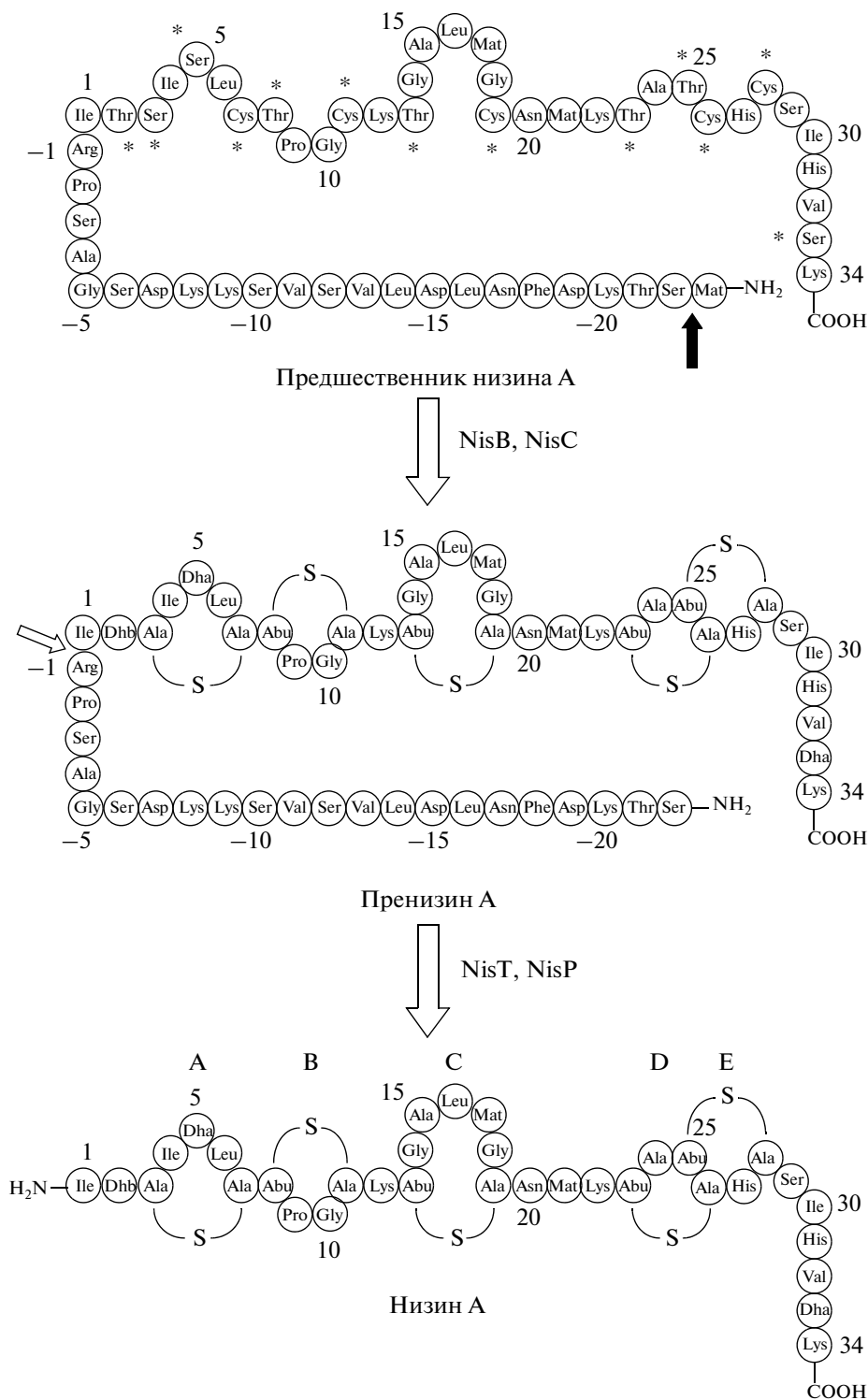


Рис. 3. Схематическое представление биосинтеза низина [53]. NisB – дегидратаза, действующая на серин и треонин; NisC – циклаза, формирующая тиозфирные кольца; LanT – фермент, осуществляющий экспорт полностью модифицированного предшественника; LanP – фермент, ответственный за удаление лидерного пептида от препептида.

го пентапептида (MurNAc), глютамин N-ацетил-глюкозамина (GlcNAc), основного строительного блока клеточной стенки, и пирофосфат(PP)-ун-

декапептильного хвоста, функционирующего как переносчик пептидогликана из цитоплазмы. Липид II составлен из 11 полиизопреновых остат-

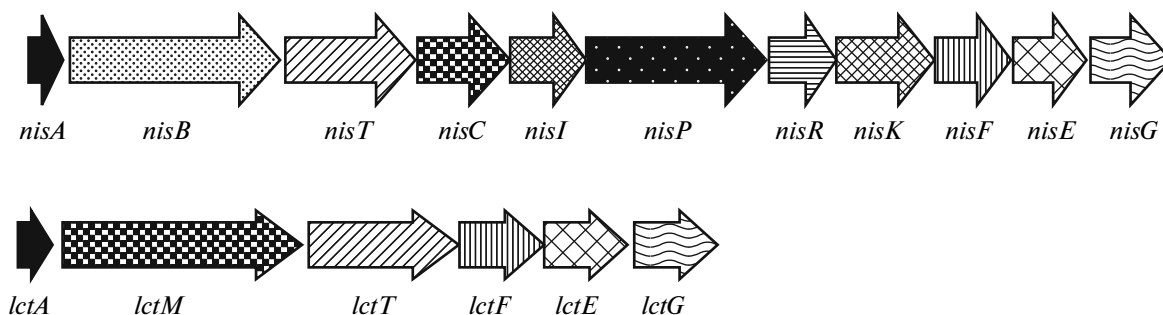


Рис. 4. Генные кластеры низина и лактицина [51] *nisA*, *lctA* – структурные гены низина и лактицина, соответственно; *nisB*, *nisC* – гены, ответственные за модификацию молекул низина; *nisP*, *nisT* – гены, ответственные за процессинг и транспорт низина; *nisI*, *nisEFG* – гены, ответственные за иммунитет к низину клеток-продуцентов; *nisR*, *nisK* – гены, участвующие в регуляции образования. Гены лактицина с идентичными функциями обозначены одинаково.

ков, в котором пирофосфат MurNAc-пентапептид связан с GlcN (глутамин N-ацетилглюкозамин), синтезируется внутри клетки на цитоплазматической мембране через липид I, который представляет собой комплекс УДФ-MurNAc-пентапептид-GlcNAc с ундекапринолфосфатом. Впоследствии липид II проходит к внешней стороне мембраны, а два аминокислота прикрепляются к клеточной стенке. Процесс может повторяться, ундекапринолпирофосфат может транспортироваться назад к внешней стороне мембраны через этап дифосфорилирования ундекапринолпирофосфата и цикл может начаться снова.

Наиболее полно механизм действия лантибиотиков изучен для низина. Имеется два фактора, играющих важную роль при взаимодействии низина с мембраной чувствительных клеток: это наличие отрицательно заряженных липидов в мембране и мембранный потенциал [63, 64], а также толщина клеточной стенки и доступность липида II [65].

На клетку-мишень низин оказывает двойное действие. При связывании с липидом II он блокирует синтез клеточной стенки, а в некоторых случаях может использовать липид II для закрепления в мембране и инициирования образования пор. При высокой концентрации низина поры могут формироваться в отсутствие липида II. В этом случае максимальная активность низина наблюдалась при 50–60%-ном содержании отрицательно заряженных липидов в мембране [66].

На рис. 5 представлена предполагаемая модель действия низина. На начальном этапе низин связывается с пирофосфатом липида II [66–68]. Затем С-конец молекулы переносится через мембрану и оказывается на ее внутренней стороне. На этом этапе наиболее важным является подвижность между кластерами А, В, С и D, Е в молекуле низина. Взаимодействие с липидом II стабилизирует трансмембранную ориентацию пептида, в результате чего формируются стабильные поры диа-

метром 2 нм [69]. В образовании одной поры участвуют 8 молекул низина и 4 молекулы липида II [69, 70].

Разная чувствительность бактерий к низину является следствием различной концентрации липида II в мембране. Известно, что у *E. coli* содержание этой молекулы существенно ниже (2×10^3 молекул на клетку), в то время как у *Micrococcus flavus* – 1×10^5 . В целом, бактерицины I класса используют липид II в качестве связующего звена для специфического мембранного прикрепления [71].

Лантибиотики со схожей структурой А и В колец имеют липид II-зависимый механизм действия [62]. В частности, мерсацидин и актагардин (лантибиотики типа В) также формируют комплекс с липидом II, но связывание блокирует только включение липида II в пептидогликан, что приводит к медленному лизису клетки [72]. Предполагают, что мерсацидин блокирует синтез пептидогликана на уровне трансгликозилирования, но в этом случае поры в мембране не образуются [42].

Микроорганизмы–продуценты бактерицинов имеют систему защиты от своих собственных продуктов с помощью экспрессии генов иммунных белков. Чувствительность продуцента варьирует и зависит от уровня продукции бактерицина [73]. Иммунные белки проявляют значительную вариабельность: у практически одинаковых бактерицинов могут быть абсолютно разные иммунные белки. Для низина известен NisI – белок с липопротеиновой сигнальной последовательностью, кодируемый геном *nisI* в опероне биосинтеза низина. Белок NisI прикрепляется к внешней поверхности мембраны клетки-продуцента, где связывает низин, уменьшая его локальную концентрацию [42].

Свойства и биосинтез бактерицинов II класса. Ко второму классу бактерицинов относятся немодифицированные пептиды, которые подразделяются на три подкласса. К подклассу IIa отно-

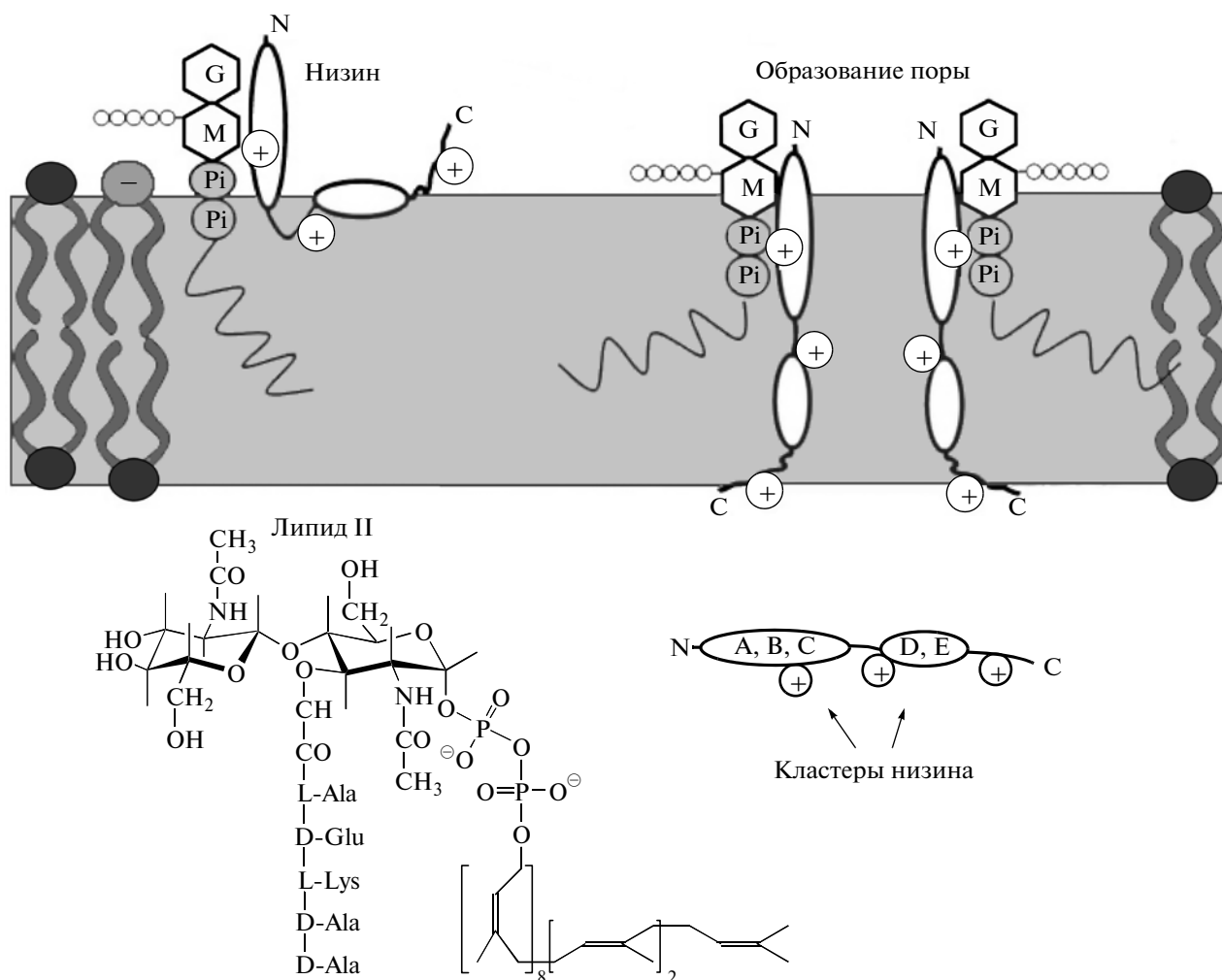


Рис. 5. Модель липид II-зависимого образования пор низином [66].

G – глутамин N-ацетилглюкозаамин; M – N-ацетилмурамовый пентапептид.

сятся педиоцинподобные бактериоцины, в Пб подкласс входят дипептидные бактериоцины, а подкласс Пс включает в себя бактериоцины, имеющие циклическое строение. В табл. 4 приведены основные бактериоцины Па и Пб подклассов и их продуценты. Эти бактериоцины различаются по молекулярным массам [74–99].

Многие из этих пептидов стабильны при низких значениях pH и ингибируют рост грамположительных бактерий, вызывающих порчу пищевых продуктов, таких, как: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*. Так, например, лактицин Q, образуемый штаммом *L. lactis* subsp. *lactis* QU 5, по спектру антимикробного действия подобен низину А, но отличается стабильностью в щелочных условиях [38] и большей эффективностью в отношении многих грамположительных бактерий, в то время как лактококцины А, Q и лактококцин 972 ингибиру-

ют рост только некоторых штаммов лактококков [100].

Все бактериоцины Па подкласса являются катионными пептидами, состоящими из двух структурных единиц: высоко консервативного N-конца с характерной последовательностью Тир-Гли-Асп-Гли-Вал и менее консервативного С-концевого домена [101]. N-конец образует три антипараллельных β -слоя, поддерживаемых дисульфидными мостиками, С-конец формирует одну или две амфифильных α -спирали. Положительно заряженные аминокислоты, необходимые для взаимодействия с мембраной, у бактериоцинов второго класса локализованы, главным образом, на гидрофильном N-конце. С-конец бактериоцина участвует в определении его специфичности и внедрении в мембрану, а гидрофильные β -складки N-конца прикрепляются к поверхности мембраны [31].

Таблица 4. Бактериоцины II класса и их продуценты

Бактериоцины IIa подкласса			
Бактериоцин	Продуцент	Молекулярная масса, Da	Ссылка
Сакацин А	<i>Lactobacillus sakei</i> Lb 706	4300	[74]
Сакацин 674	<i>L. sakei</i> Lb764	4437	[75]
Лактицин Q	<i>Lactococcus lactis</i> QU 5	5926	[38]
Лактококцин А	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG 2130	5778	[76]
Лактококцин 972	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IPLA 972	7500	[77]
Лактококцин DR	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ADRIA 85L030	3400	[78]
Карнобактериоцин А	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A	5052	[79]
Карнобактериоцин В2	<i>C. piscicola</i> LV17	4969	[80]
Курвацин А	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174	4309	[81]
Диверцин V41	<i>Carnobacterium divergens</i>	4509	[82]
Дивергицин M35	<i>C. divergens</i> M35	4518	[83]
Лактококцин MMFII	<i>L. lactis</i> MMFII	4144	[84]
Лейкоцин А	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL 187	3930	[85]
Мезентериоцин Y105	<i>L. mesenteroides</i> Y105	3446	[86]
Плантариоцин 423	<i>Lactobacillus plantarum</i> 423	3500	[87]
Педиоцин PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0	4629	[88]
Педиоцин AcH	<i>P. acidilactici</i> AcH	4628	[89]
Сакацин G	<i>Lactobacillus sakei</i> 2512	3834	[90]
Бактериоцины IIb подкласса			
Лактококцин G	<i>L. lactis</i> LMGT2081	4346; 4110	[91]
Лактококцин MN	<i>L. lactis</i> 9B4	4325; 4377	[51]
Лактококцин Q	<i>L. lactis</i> QU 4	4260; 4018	[92]
Плантариоцин E/F	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11	2687; 2758	[93]
Плантариоцин J/K	<i>L. plantarum</i> C11	2921; 3508	[94]
Плантариоцин NC8	<i>L. plantarum</i> NC8	3587; 4000	[95]
Лактацин F	<i>Lactobacillus johnsonii</i> VPI11088	2500; –	[96]
Лактооцин 705	<i>Lactobacillus casei</i> CRL 705	3357; –	[97]
Термофилин 13	<i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi13	5776; 3910	[98]
Лейкоцин H	<i>Leuconostoc</i> MF215B	–*	[99]

* Молекулярная масса не определена из-за непостоянства аминокислотного состава пептида.

Структурные гены многих бактериоцинов, не содержащих лантионина, расположены на плазмидах, за исключением диверцина V41 [102], сакацина P и карнобактериоцина B2 [103]. В некоторых случаях одна плазмида может нести гены синтеза нескольких бактериоцинов как, например, плазмида p9B4-6, кодирующая лактококцины А, В и М и соответствующие иммунные белки. В противоположность этому, разные отдельные плазмиды, находящиеся в разных штаммах, могут кодировать один бактериоцин. Например, для лактококцина А имеются три различные плазмиды у двух подвидов *L. lactis* subsp. *lactis*. Гены обычно организованы в один или несколько опе-

ронов. В педиоцине PA-1, плантариоцине 423 все 4 гена, необходимые для биосинтеза, локализованы в одном опероне. В других случаях гены распределены по нескольким оперонам, где один оперон несет структурные гены и гены иммунности, второй – гены секреции, третий – регуляции биосинтеза [31].

Бактериоцины IIa подкласса синтезируются в виде предшественников с сигнальной последовательностью. Молекулы препептидов идентичны у сакацина А и курвацина А, лантибиотика лактицина 481 и лактококцина DR, сакацина 674 и сакацина P. Предполагают, что препептид направляет полипептид в sec-зависимый путь экскреции, ко-

торый включает также стабилизацию препептида в процессе трансляции, сохранение молекулы в неактивном состоянии и участие в транслокации [51]. Бактериоцины I и II класса секретируются с помощью ABC-транспортера [34].

Сравнительно недавно были идентифицированы дипептидные бактериоцины IIb подкласса. Свойства генетически и биохимически охарактеризованных бактериоцинов этого подкласса представлены в табл. 4.

Бактериоцины IIb подкласса имеют много общих черт с бактериоцинами IIa подкласса. В частности, они тоже являются катионами и имеют гидрофобную или амфифильную область в молекуле. Как правило, оба пептида действуют синергидно. Однако отдельные пептиды лактацина F и плантарицина E/F и J/K могут проявлять антимикробную активность, но в гораздо меньшей степени [104]. Известно, что в лактоцине 705 за антибактериальную активность отвечает один пептид, в то время как второй пептид, молекулярная масса которого не определена из-за непостоянства его аминокислотного состава, участвует в распознавании рецептора на мембране клетки-мишени [105]. Гены, ответственные за синтез отдельных пептидов двухпептидных бактериоцинов, располагаются друг за другом в одном опероне, и к каждому бактериоцину имеется только один ген иммунного белка, что говорит о том, что оба пептида функционируют как единый комплекс [103]. Кроме того, установлено, что между кластерными пептидами лактококцина G, плантарицинов E/F и J/K при атаке на клетку происходят прямые физические взаимодействия [106].

Для регуляции продукции бактериоцинов второго класса используется система кворумсенсинга. Она состоит из трех компонентов и соответственно выражается в трехкомпонентной регуляторной системе: феромона пептидной природы, трансмембранного белка – гистидинкиназы (рецептора феромона) и ответного белка цитозоля. Показано, что синтез термофилина 13 бактериями *Streptococcus thermophilus* LMD-9 и плантарицинов, образуемых штаммами *L. plantarum* C11, E/F и J/K, зависит от фазы роста и концентрации индуцирующего фактора, феромона [107].

Механизм действия бактериоцинов II класса. Предполагаемой молекулой-рецептором для бактериоцинов IIa подкласса является переносчик маннозы $E\text{II}_1^{\text{Man}}$ [108]. Белок $E\text{II}_1^{\text{Man}}$ принадлежит к фосфотрансферазной системе (ФТС) и кодируется *mpt* опероном. ФТС отвечает за транспорт и фосфорилирование сахара внутри клетки как у грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. ФТС-пермеаза маннозного семейства состоит из четырех доменов IIА, IIВ, IIС, и IID. Цитоплазматические домены IIА и IIВ участвуют в фосфорилировании, а мембранные IIС и IID –

в транспорте. Субъединицы IIС и IID, находящиеся в мембране, являются мишенями для бактериоцинов второго класса [31]. N-конец бактериоцина отвечает за связывание с мембраной клеток-мишени посредством электростатических взаимодействий, тогда как триптофансодержащий участок С-конца – за проникновение бактериоцина в мембрану [109]. Для лактококцина А, продуцируемого *L. lactis* subsp. *lactis*, доказано, что присутствие мембранных компонентов IIС и IID достаточно для проявления чувствительности [107]. Предполагаемая модель действия лактококцина А и механизм защиты от него показан на рис. 6.

Согласно этой схеме бактериоцин взаимодействует с IIС и IID компонентами ман-ФТС как с рецептором клеточной поверхности (рис. 6, А; положение 1 и 2). После связывания бактериоцин усиливает проницаемость мембраны (состояние 3), что и приводит к гибели клетки. Вероятно, пора в мембране образуется за счет олигомеризации молекул бактериоцина либо за счет разрушения маннозо-ФТС комплекса.

В иммунных клетках, не продуцирующих бактериоцин, иммунный белок не связан с маннозо-ФТС (рис. 6, Б; положение 1'). В клетках, продуцирующих бактериоцин, иммунные белки прочно связаны с рецепторными белками (IIС и IID) для защиты их от гибели [107]. Эта модель возможна также для лактококцина В и некоторых педиоцинподобных бактериоцинов.

Механизм действия лактококцина Q отличается от действия бактериоцинов IIa подкласса. Для проявления его действия не нужно присутствие молекулы рецептора на плазматической мембране. Предполагается, что лактококцин Q электростатически связывается с отрицательно заряженной мембраной бактериальной клетки, после чего встраивается в нее, образуя поры [110].

Дипептидные бактериоцины IIb класса усиливают проницаемость клеточной мембраны для ионов за счет образования пор, в которые включаются оба пептида [111, 112]. Причем каждый бактериоцин образует поры, проницаемые только для определенного типа ионов. Так, лактококцин G усиливает проницаемость для многих моновалентных катионов и холина за исключением H^+ , а плантарицины E/F и J/K делают мембрану проницаемой для всех моновалентных катионов, включая и H^+ [113].

В связи с тем, что бактериоцины МКБ, относящиеся ко II классу, обладают высокой антибиотической активностью в отношении патогенов *Listeria innocua* и *L. monocytogenes*, развивающихся в продуктах питания и пищевом сырье в процессе длительного хранения, они перспективны для применения в качестве биоконсервантов [114]. Среди таких бактериоцинов известны курвацин А [81], диверцин V41 [82], лактоцин MMFII [84],

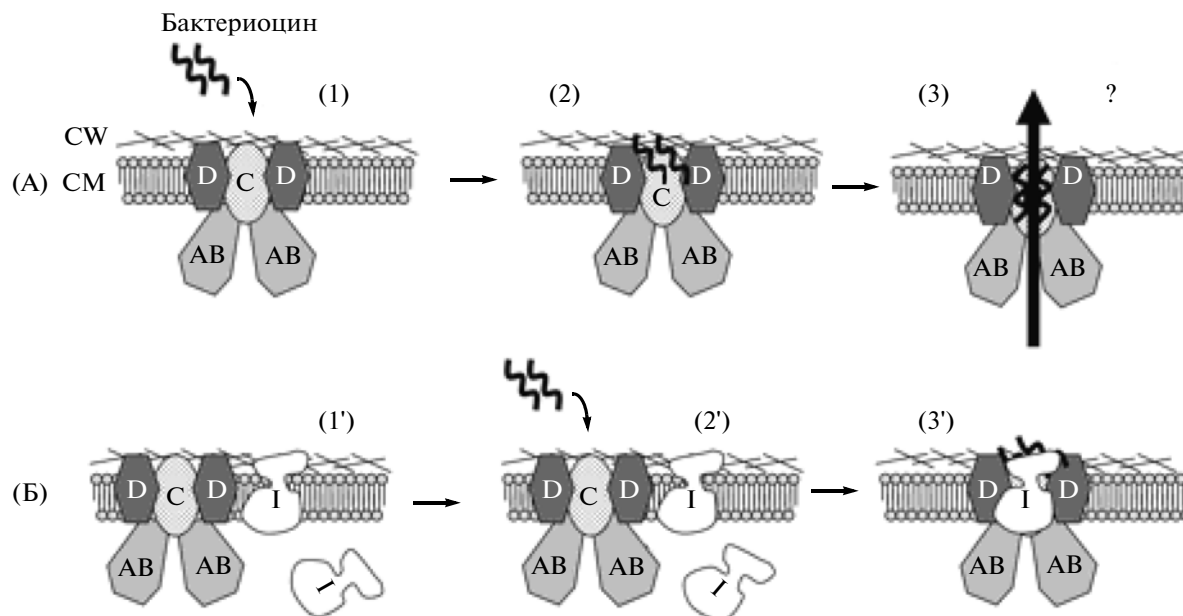


Рис. 6. Модель действия на клетку-мишень и иммунитет для лактококцина А [83]. А – бактериоцин взаимодействует с рецепторными белками клеточной поверхности (А-D) – компонентами ман-ФТС (положение 1 и 2). После связывания бактериоцин усиливает проницаемость мембраны (3), что и приводит к клеточной гибели. Пора образуется за счет олигомеризации молекул бактериоцина либо за счет разрушения манн-ФТС комплекса.

Б – в иммунных клетках, не продуцирующих бактериоцин, иммунный белок не связан с маннозо-ФТС (положение 1'); в клетках, продуцирующих бактериоцин, иммунные белки прочно связаны с рецепторными белками (А-D) для защиты от гибели.

Единицы ман-ФТС показаны в стехиометрическом соотношении 2 : 1 : 2 для АВ:С:D. CW – клеточная стенка; CM – цитоплазматическая мембрана.

лейкоцин А [85], плантарицин 423 [87], педиоцины РА-1 и АсН [114, 115, 116], сакацины Р и G [75, 90].

В настоящее время резко возрос интерес исследователей к МКБ, которые из-за своей безопасности, высокой ферментативной и антимикробной активности являются объектом фундаментальных исследований по созданию новых активных пробиотиков и разнообразных антимикробных препаратов с консервирующим эффектом.

МКБ являются продуцентами широкого круга антимикробных метаболитов, относящихся к разным классам химических веществ. Наиболее хорошо изучена группа бактериоцинов, так как бактериоцины вследствие их нетоксичности наиболее перспективны в качестве кандидатов для развития нового поколения антибиотических препаратов с пробиотическими свойствами [27, 117, 118]. В связи с тем, что МКБ имеют “GRAS” статус, их бактериоцины востребованы промышленностью как безопасные и специфичные био-консерванты [119, 120]. Многие бактериоцины этой группы бактерий успешно зарекомендовали

себя в качестве биоконсервантов для мясных продуктов, рыбы, кисломолочных продуктов, овощей и фруктов [121, 122]. Основные направления более эффективного использования бактериоцинов с целью увеличения сроков годности пищевых продуктов заключаются в использовании их смесей, включения бактериоцинов в упаковочные материалы, сочетание их с другими консервантами. Эффективность бактериоцинов определяется активностью их продуцентов. Для этого проводят скрининг природных высокопродуктивных штаммов из различных субстратов, используют различные генетические методы, включая методы клеточной инженерии [18, 20, 123–127].

С другой стороны, возможно применение бактериоцинов в медицине в качестве альтернативных антибиотиков [128, 129].

Между разными классами бактериоцинов имеются существенные отличия в строении молекулы, а, следовательно, и в их стабильности, механизме и спектре антимикробного действия. В частности, лантибиотики характеризуются сложным процессом посттрансляционных превращений, которые приводят к формированию лантиотиновых мостиков в молекуле, что и обусловли-

вает стабильность пептида во внешней среде и более широкий спектр действия.

Особую научную и практическую ценность представляют синтезируемые МКБ соединения, которые обладают фунгицидным действием. Эта разнородная группа веществ на данный момент изучена недостаточно. Штаммы лактококков, идентифицированные как *L. lactis* subsp. *lactis*, синтезировали вещества, относящиеся к алкилароматическим кетонам, которые и определяют их фунгицидную активность. Многие авторы отмечают возможность использования штаммов МКБ для продления сроков хранения фруктов и овощей, наиболее подверженных порче микроскопическими грибами [12, 13, 23]. Учитывая, что потребность пищевой промышленности, медицины и сельского хозяйства в фунгицидных препаратах растет с каждым годом, а используемые в настоящее время фунгициды (химические препараты) обладают токсичностью для человека и животных, накапливаются в почве и воде, поиск новых фунгицидных веществ среди непатогенных форм микроорганизмов является актуальной проблемой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мечников И.И. Молочные микробы и их польза для здоровья. СПТ: Изд. Зворыкин, 1911. С. 30.
2. Leroy F., Verluyten J., Luc De Vuyst // Int. J. Food Microbiol. 2006. V. 106. P. 270–285.
3. Atanassova M., Choiset Y., Dalgalarondo M., Chobert J., Doussset X., Ivanova I., Haertle T. // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 87. P. 63–73.
4. Albano H., Todorov S., van Reenen C., Hogg T., Dicks L., Teixeira P. // Int. J. Food Microbiol. 2007. V. 116. P. 239–247.
5. Salminen S. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2 Ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1998. P. 14–22.
6. Yang Z., Suomalainen T., Mäyrä-Mäkinen A., Hutunen E. // J. Food Prot. 1997. V. 60. P. 786–790.
7. Lowe D., Arendt E. // J. Inst. Brew. 2004. V. 110. P. 163–180.
8. Jay M., Loessner M., Golden D. // Modern Food Microbiology. 7 Ed. New York: Springer Science Business Media. Inc. 2005. P. 336–339.
9. Sjögren J., Magnusson J., Broberg A., Schnürer A., Kenne L. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 7554–7557.
10. Broberg A., Jacobsson K., Ström K., Schnürer J. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 5547–5552.
11. Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer J. // FEMS Microbiol. Let. 2003. V. 219. P. 129–135.
12. Yang E., Chang H. // Int. J. Food Microbiol. 2010. V. 139. P. 56–63.
13. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobetti M. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 4084–4090.
14. Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 4322–4327.
15. Lertcanawanichakul M. // Walailak J. Sci. Tech. 2005. V. 2. P. 179–187.
16. Roy U., Batish V., Grover S., Neelakantan S. // Int. J. Food Microbiol. 1996. V. 32. P. 27–34.
17. Coallier-Ascan J., Idziac E. // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 49. P. 163–167.
18. Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Sultimova T.D., Bilanenko E.N., Fedorova G.B., Khatrukha G.S., Netrusov A.I. // Am. J. Agricult. Biol. Sci. 2010. V. 5. P. 477–485.
19. Стоянова Л.Г., Сультимова Т.Д., Ботина С.Г., Нептрусов А.И. // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 42. С. 560–568.
20. Стоянова Л.Г., Федорова Г.Б., Егоров Н.С., Нептрусов А.И., Камруха Г.С. // Прикл. биохим. и микробиол. 2007. Т. 43. № 6. С. 677–684.
21. Rouse S., Harnett D., Vaughan A., D. van Sinderen. // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 104. P. 915–923.
22. Sathe S., Nawani N., Dhakephalkar P., Kapadnis B. // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 103. P. 2622–2628.
23. Trias R., Bañeras L., Montesinos E., Badosa E. // Int. Microbiol. 2008. V. 11. P. 231–236.
24. Hurst A. // Adv. Appl. Microbiol. 1981. V. 27. P. 85–123.
25. Yanagida F., Chen Y., Shinohara T. // J. Gen. Appl. Microbiol. 2005. V. 52. P. 21–28.
26. Beasley S., Saris P. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 5051–5053.
27. Gillor O., Etzion A., Riley M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 81. P. 591–606.
28. Mulders J., Boerrigter I., Rollema H., Siezen R., de Vos W. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 201. P. 581–584.
29. Kogler H., Bauch M., Fehlhaber M., Griesinger C., Schubert W., Teetz V. Nisin and Novel Lantibiotics / Ed. G. Jung, H.-G. Sahl, Leiden: ESCOM, 1991. P. 113–122.
30. Schmitz S., Hoffmann A., Szekat S., Rudd B., Bierbaum G. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 7270–7277.
31. Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen M., Prévost H. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006. V. 70. P. 564–582.
32. Nissen-Meyer J., Oppegard C., Rogne P., Haugen H., Kristiansen P. // Probiotics Antimicrob. Prot. 2010. V. 2. P. 52–60.
33. Joerger R. // Poultry Sci. 2003. V. 82. P. 640.
34. Franz C., van Belcum M., Holzappel W., Abriouel H., Galvez A. // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. P. 293–310.
35. Kwaadsteniet M., Doeschate K., Dicks L. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 547–549.

36. Morgan S., O'Connor P., Cotter P., Ross R., Hill C. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 49. P. 2606–2611.
37. Martínez B., Böttiger T., Schneider T., Rodríguez A., Sahl H., Wiedemann I. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 74. P. 4666–4670.
38. Fujita K., Ichimasa S., Zendo T., Koga S., Yoneyama F., Nakayama J., Sonomoto K. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 2871–2877.
39. Sawa N., Zendo T., Kiyofuji J., Fujita K., Himeno K., Nakayama J., Sonomoto K. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 1552–1558.
40. Berdy J. BNPD, Data Base for Microbial Metabolite Research // Abstr. Int. Conf. Microbial Secondary Metabolism. Interlaken. Suisse. 1994. P. 2.
41. Стоянова Л.Г., Федорова Г.Б., Егоров Н.С., Катруха Г.С., Непрусов А.И. Патент РФ № 2374320. 2009.
42. Willey M., van der Donk W. // Ann. Rev. Microbiol. 2007. V. 61. P. 477–501.
43. Nes I., Diep D., Havarstein L., Holo H. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1996. V. 70. P. 113–128.
44. Mota-Meira M., Lapointe G., Lacroix C., Lavoie M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 24–29.
45. Pol I., van Arendonk W., Mastwijk H., Krommer J., Smid E.J., Moezelaar R. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 1693–1699.
46. Gut I., Prouty A., Ballard J., van der Donk W., Blanke S. // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. V. 52. P. 4281–4288.
47. Ross R., Galvin M., McAuliff O., Morgan S., Ryan M., Twomey D., Meaney W., Hill C. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. V. 76. P. 337–346.
48. Holo H., Jeknic Z., Daeschel M., Stevanovic S., Nes I. // Microbiology. 2001. V. 147. P. 643–651.
49. Barrett E., Hayes M., O'Connor P., Gardiner G., Fitzgerald G., Stanton C., Ross P., Hill C. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 3719–3723.
50. McAuliffe O., Ross R., Hill C. // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 25. P. 285–308.
51. Jack R., Tagg J., Ray B. // Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 1995. V. 59. P. 171–200.
52. Li B., Paul J., van der Donk W., Nair S. // Science. 2006. V. 311. P. 1464–1467.
53. Kuipers O., Beerthuyzen M., de Ruyter B., Luesink E., de Vos M. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 27299–27304.
54. Koponen O., Tolonen M., Qiao M., Wahlström G., Helin J., Saris P. // Microbiology. 2002. V. 148. P. 3561–3568.
55. Li B., van der Donk W. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 21169–21175.
56. Котельникова Е.А., Гельфанд М.С. // Генетика. 2002. Т. 38. С. 758–772.
57. Xie L., Miller, Chatterjee C., Averin O., Kelleher N., van der Donk W. // Science. 2004. V. 303. P. 679–681.
58. Kleerebezem M., Quadri L., Kuipers O., de Vos W. // Mol. Microbiol. 1997. V. 24. P. 895–904.
59. Turovskiy E., Kashtanov D., Paskhover B., Chikindas M.L. // Adv. Appl. Microbiol. 2007. V. 62. P. 191–234.
60. Pascalle G. de Ruyter., Kuipers O., de Vos M. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 3662–3667.
61. Nagao J., Assaduzzaman S., Asso Y., Okuda K., Nakayama J., Sonomoto K. // J. Biosci. Bioeng. 2006. V. 102. P. 139–149.
62. Hester E., Kramer N., Smith J., Hillman D., Zachariah C., Kuipper O. // Science. 2006. V. 313. P. 1636–1637.
63. Breukink E., van Craaij C., Demel R., Siezen R., Kuipers O., Kruijff B. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 6968–6976.
64. Montville T.J., Chen Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 50. P. 511–519.
65. Breukink E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O., Sahe H. // Science. 1999. V. 286. P. 2361–2363.
66. Wiedemann I., Breukink E., van Craaij C., Kuipers O., Bierbaum G., de Kruijff B., Sahl H. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 1772–1779.
67. Bonev B., Breurir E., Swiezewska E., de Kruijff B., Watts A. // FASEB J. 2004. P. 1862–1869.
68. Hsu S., Breukink E., Tischenko E., Lutters M., de Kruijff B., Kaptein R., Bonvin A., van Nuland N. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. P. 963–967.
69. Hasper H., Kruijff B., Breukink E. // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 11567–11575.
70. Wiedemann I., Benz R., Sahl H. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 3259–3261.
71. Bonelli R., Schneider T., Sahl G., Wiedemann I. // Antimicrob. Agents Chemother. 2006. V. 50. P. 1449–1457.
72. Wiedemann I., Böttiger T., Bonelli R., Schneide T., Sahl H., Martínez B. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 2809–2814.
73. Fimland G., Eijsink, Nissen-Meyer J. // Microbiology. 2002. V. 148. P. 3661–3670.
74. Holck A., Axelsson L., Birkeland S.E., Aukrust T., Blom H. 1992. // J. Gen. Microbiol. V. 138. P. 2715–2720.
75. Holck A., Axelsson L., Hühne K., Kröckel L. // F. Microbiol. Lett. 1994. V. 115. P. 143–149.
76. Holo H., Nilsen Q., Nes I.F. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 3879–3887.
77. Martinez B., Suarez J.E., Rodriguez A. // Microbiology. 1996. V. 142. P. 2393–2398.
78. Rince A., Le Pogam S., Thuault D., Bourgeois C.M., Le Pennec J.P. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 1652–1657.
79. Worobo R., Henkel T., Sailer M., Roy K., Vederas J., Stiles M. // Microbiology. 1994. V. 140. P. 517–526.
80. Quadri L., Sailer M., Ron K.L., Vederass J.C., Stiles M. 1994. // J. Biol. Chem. V. 269. P. 12204–12211.
81. Tiejaczek P.S., Vogel R.F., Hammes W.P. 1993. // Arch. Microbiol. V. 160. P. 279–283.

82. *Métivier A., Pilet M., Dousset X., Sorokine O., Anglade P., Zagorec M., Piard J., Marion D., Cenatiempo Y., Frémaux E.* // *Microbiology*. 1998. V. 144. P. 2837–2844.
83. *Tahiri I., Desbiens M., Benech R., Kheadr E., Lacroix C., Thibault S., Ouellet D., Fliss I.* // *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 97. P. 123–136.
84. *Ferchichi M., Frère J., Mabrouk K., Manai M.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 205. P. 49–55.
85. *Hastings J., Sailer M., Johnson K., Roy K., Vederas J., Stiles M.* // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 7491–7500.
86. *Hechard Y., Berjeaud J.M., Cenatiempo Y.* // *Curr. Microbiol.* 1999. V. 39. P. 265–269.
87. *Van Reenen C., Dicks L., Chikindas M.* // *J. Appl. Microbiol.* 1998. V. 84. P. 1131–1137.
88. *Henderson J., Chopko A., Dick van Wassenaar P.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1992. V. 295. P. 5–12.
89. *Motlagh A., Bhunia A., Szostek F., Hansen T.R., Johnson M.C., Ray B.* // *Let. Appl. Microbiol.* 1992. V. 15. P. 45–48.
90. *Simon L., Fremaux C., Cenatiempo Y., Berjeaud J.M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 6416–6420.
91. *Nissen-Meyer J., Holo H., Håvarstein L.S., Sletten K., Nes I.F.* // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. P. 5686–92.
92. *Zendo T., Yoneyama F., Sonomoto K.* // *Appl. Microbiol. Biotech.* 2010. V. 88. P. 1–9.
93. *Nissen-Meyer J., Larsen A.G., Sletten K., Daeschel M., Nes I.F.* // *J. Gen. Microbiol.* 1993. V. 139. P. 1973–1978.
94. *Diep D.B., Havarstein L.S., Nes I.F.* // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 4472–4483.
95. *Maldonado A., Ruiz-Barba J., Jiménez-Díaz R.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 383–389.
96. *Muriana P.M., Klaenhammer T.R.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. P. 114–121.
97. *Palacios J., Vignolo G., Farias M.E., de Ruis Holgado A.R., Oliver G., Sesma F.* // *Microbiol. Res.* 1999. V. 154. P. 199–204.
98. *Marciset O., Jeronimus-Stratingh M.C., Mollet B., Poolman B.* // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 14277–14284.
99. *Blom H., Katla T., Holck A., Sletten K., Axelsson L., Holo H.* // *Curr. Microbiol.* 1999. V. 39. P. 43–48.
100. *Zendo T., Koga S., Shigeri Y., Nakayama J., Sonomoto K.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 3383–3389.
101. *Papagianni M., Anastasiadou S.* // *Microb. Cell Fact.* 2009. V. 8. P. 3–9.
102. *Hühne K., Axelsson L., Holck A., Kröckel A.* // *Microbiology*. 1996. V. 142. P. 1437–1448.
103. *Oppegård C., Rogne P., Emanuelsen L., Kristiansen E., Fimland G., Nissen-Meyer J.* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 13. P. 210–219.
104. *Anderssen E., Diep D., Nes I., Eijsink V., Nissen-Meyer J.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 2269–2272.
105. *Cuozzo S., Castellano P., Sesma F., Vignolo G., Raya R.* // *Curr. Microbiol.* 2003. V. 46. P. 180–183.
106. *Hauge H., Mantzilas D., Eijsink V., Nissen-Meyer J.* // *J. Bacteriology*. 1998. V. 181. P. 740–747.
107. *Diep D., Skaugen M., Salehian Z., Holo H., Nes I.* // *Microbiology*. 2007. V. 104. P. 2384–2389.
108. *Dalet K., Cenatiempo Y., Cossart P., Héchard Y.* // *Microbiology*. 2001. V. 147. P. 3263–3269.
109. *Miller K., Schamber R., Osmanagaoglu O., Ray B.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 1997–2005.
110. *Yoneyama F., Imura Y., Ichimasa S., Fujita K., Zendo T., Nakayama S., Matsuzaki K., Sonomoto K.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 538–541.
111. *Garneau S., Martin N., Vederas J.* // *Biochimie*. 2002. V. 84. P. 577–92.
112. *Héchard Y., Sahl H.* // *Biochimie*. 2002. V. 84. P. 545–57.
113. *Moll G., van den Akker E., Hauge H., Nissen-Meyer J., Nes I., Konings W., Driessen A.* // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 4848–52.
114. *Hugas M., Pages F., Garriga M., Monfor J.* // *Food Microbiol.* 1998. V. 15. P. 639–650.
115. *Chikindas M., Garcia-Garcera M., Driessen A., Ledebøer A., Nissen-Meyer J., Nes I., Abee T., Konings W., Venema G.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 59. P. 3577–3584.
116. *Biswas S., Ray P., Johnson M., Ray B.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. P. 1265–1267.
117. *Cleveland J., Montville T., Nes I., Chikindas M.* // *Int. J. Food Microbiol.* 2001. V. 50. P. 131–149.
118. *Millette M., Cornut G., Dupont C., Shareck F., Archambault D., Lacroix M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 1997–2003.
119. *Lauková A., Czikková S.* // *J. Appl. Microbiol.* 1999. V. 87. P. 182–186.
120. *De Vuyst L., Leroy F.* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 13. P. 194–199.
121. *Cotter P., Hill C., Ross R.* // *Curr. Protein. Pept. Sci.* 2005. V. 6. P. 61–75.
122. *Galvez A., Lopez R., Abriouel H., Valdivia E., Omar N.* // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2008. V. 28. P. 125–52.
123. *Ming X., Weber G., Ayres J., Sandine W.* // *J. Food Sci.* 1997. V. 62. P. 413–415.
124. *Natrajan N., Sheldon B.* // *J. Food Prot.* 2000. V. 63. P. 1189–1196.
125. *Brumfitt W., Salton M., Hamilton-Miller J.* // *J. Antimicrob. Agents Chem.* 2002. V. 50. P. 731–734.
126. *Стоянова Л.Г., Егоров Н.С.* // *Микробиология*. 1998. Т. 67. С. 38–44.
127. *Стоянова Л.Г., Егоров Н.С.* // *Микробиология*. 1999. Т. 68. С. 235–240.
128. *Wu J., Hu S., Cao L.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. V. 51. P. 3131–3135.
129. *Lay C., Akerey B., Fliss I., Sibirade M., Rouabhia M.* // *J. Appl. Microbiol.* 2008. V. 105. P. 1630–1639.

Antibacterial Metabolites of Lactic Acid Bacteria: Their Diversity and Properties

L. G. Stoyanova, E. A. Ustyugova, and A. I. Netrusov

Biology Department, Moscow State University, Moscow, Russia

e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Received June 16, 2011

Abstract—The review is devoted to literature data on antimicrobial metabolites produced by lactic acid bacteria (LAB), which have long been used for the preparation of cultured dairy products. This paper summarizes data on low-molecular-weight antimicrobial substances, which are primary products or by-products of lactic fermentation. Individual sections are devoted to a variety of antifungal agents and bacteriocins produced by LAB; their potential use as food preservatives has been discussed. The characteristics and classification of bacteriocins are presented in a greater detail; their synthesis and mechanism of action are described using the example of nisin A, which belongs to class I lantibiotics synthesized by the bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. The mechanism of action of class II bacteriocins has been demonstrated with lacticin. Prospective directions for using LAB antimicrobial metabolites in industry and medicine are discussed in the Conclusion.