

УДК 579.66

ХАРАКТЕРИСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ, ОБРАЗУЕМЫХ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К

© 2012 г. Е. А. Устюгова*, А. В. Тимофеева**, Л. Г. Стоянова*,
А. И. Нетрусов*, Г. С. Катруха***

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва 119992

** Научно-исследовательский институт физико-химической биологии

им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва 119991

***ФГБУ научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков

им. Г.Ф. Гаузе РАН, Москва 119021

e-mail: ustyugova.katya@mail.ru, stoyanovamsu@mail.ru

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Установлено, что штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К обладал способностью к образованию двух бактериоцинов, один из которых был идентифицирован как известный лантибиотик низин А, а другой бактериоцин 194-Д представлял собой полипептид с молекулярной массой 2589 Да и состоял из 20 аминокислотных остатков. Оба бактериоцина в различном соотношении образовывались на всех изученных питательных средах, поддерживающих рост продуцента. В зависимости от среды культивирования содержание низина А в культуральной жидкости штамма 194-К было в 380–1123 раз меньше, чем пептида 194-Д. Бактериоцин 194-Д в отличие от низина А обладал широким спектром антибактериального действия и подавлял рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Показано, что оптимальной средой для синтеза бактериоцина 194-Д была ферментационная среда, содержащая глюкозу, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и фосфат калия. Биосинтез бактериоцина 194-Д штаммом 194-К на этой среде происходил параллельно росту продуцента, а максимальное накопление его в культуральной жидкости наблюдали к 14–20 ч роста штамма.

В последние годы большое внимание уделяется поиску новых антимикробных пептидов — бактериоцинов, продуцируемых молочнокислыми бактериями (МКБ). Бактериоцины МКБ находят широкое применение в пищевой промышленности в качестве консервантов [1, 2]. Их основные преимущества заключаются в том, что они безопасны, так как легко расщепляются ферментами пищеварительного тракта, термостабильны, а также обладают относительно широким спектром антимикробного действия [3, 4]. По химической природе бактериоцины представляют собой катионные пептиды, которые синтезируются на рибосомах и в зависимости от структуры и аминокислотной последовательности подразделяются на 4 класса: I — лантибиотики, содержащие модифицированные аминокислоты (лантионин и метиллантионин); II — бактериоцины, содержащие белковые аминокислоты (IIa подкласс), либо IIb подкласс — дипептидные бактерицины [5]. III и IV — классы бактериоцинов включают крупные (с молекулярной массой более 30 кДа) термолабильные белки [6].

Известными продуцентами бактериоцинов среди МКБ являются бактерии вида *Lactococcus lactis*, которые образуют широко используемый в пищевой промышленности бактериоцин низин

А. Однако частое и бесконтрольное применение низина привело к появлению резистентных к нему патогенных бактерий. Кроме этого, низин подавляет развитие только грамположительных бактерий, что ограничивает область его применения [7, 8]. Поэтому поиск новых бактериоцинов с более широким спектром действия является актуальной проблемой.

На кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова из коровьего молока Бурятии был выделен штамм *L. lactis* subsp. *lactis* 194-К, который обладал широким спектром антимикробного действия, включая и фунгицидное [9, 10]. Было установлено, что за антимикробную активность штамма отвечает антибиотический комплекс, состоящий из пяти отдельных компонентов 194-(А, В, С, D, Е), которые различались по химической природе и спектру антимикробного действия. Ранее были выделены антибиотики 194-А и 194-В, изучены их биологические и физико-химические свойства [11]. Природу антибиотических компонентов 194-С и 194-Е не удалось установить из-за их неустойчивости. Не был изучен антибиотик пептидной природы 194-Д.

Синтез биологически активных метаболитов во многом определяется составом ферментаци-

онной среды. Известно, что бактерии рода *Lactococcus* являются ауксотрофами, требовательными к составу питательных сред, оказывающих большое влияние на их рост и синтез бактериоцинов [12, 13]. В связи с этим в нашей работе было проведено изучение влияния состава ферментационной среды на биосинтез антимикробных пептидов штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К.

Цель работы – выделение и идентификация антимикробных пептидов, образуемых *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К, а также изучение влияния среды культивирования на их биосинтез.

МЕТОДИКА

Объекты, среды и условия ферментации. В работе использовали природный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К, выделенный из коровьего молока Бурятии [9]. Лактококки, хранившиеся в оборте (обезжиренное молоко), культивировали при 28°C в течение 20–24 ч в стационарных условиях в посевной среде, приготовленной на водопроводной воде с дрожжевым экстрактом и глюкозой по 10 г/л, pH 6.8–7.0. Затем культуру из посевной среды вносили в количестве 5% в ферментационные среды разного состава и культивировали в тех же условиях. Состав питательных сред приведен ниже: **среда 1** (г/л): глюкоза – 20, гидролизат казеина – 20, дрожжевой экстракт – 10, K_2HPO_4 – 30; **среда 2** (г/л): меласса – 20, дрожжевой экстракт – 20, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 20, K_2SO_4 – 10; **среда 3** (г/л): меласса – 20, дрожжевой экстракт – 20, K_2HPO_4 – 20; **среда 4** (г/л): пептон – 4.5, сахароза – 10, дрожжевой экстракт – 10, K_2HPO_4 – 28.4, MgSO_4 – 0.2, NaCl – 2 [14]; **среда 5** (г/л): глюкоза – 25, пептон – 10, дрожжевой экстракт – 10, ацетат натрия – 15, цитрат Na – 15, K_2HPO_4 – 5, Na_2SO_4 – 10 [1]; **среда 6** (г/л): сахароза – 20.0, дрожжевой экстракт – 20.0, K_2HPO_4 – 10.0, NaCl – 2.0, MgSO_4 – 0.2 [9]; **среда 7** (г/л): сахароза – 20, гидролизат казеина – 10, дрожжевой экстракт – 5, K_2HPO_4 – 2, ацетат натрия – 5, MgSO_4 – 0.2, MnSO_4 – 0.5 [15]; **среда 8** (г/л): сахароза – 26.8, триптон – 5, дрожжевой экстракт – 10, твин-80 – 3.0, MgSO_4 – 0.2, NaCl – 8.1, K_2HPO_4 – 1.91 [16]. Во всех средах устанавливали pH на уровне 6.5–6.8. Определяли рост продуцента, накопление антимикробных пептидов и их соотношение на разных средах.

Выделение антимикробных пептидов, образуемых *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К. Культуральную жидкость штамма 194-К обрабатывали избытком метанола для получения порошка, содержащего биологически активный компонент 194-D [11]. Выделение пептидного компонента 194-D из порошка проводили методом препаративного изоэлектрофокусирования (ИЭФ) на приборе для камерного электрофореза [17]. Для

этого порошок массой 3 г растворяли в 0.5 н. уксусной кислоте, полученный раствор вносили в ячейку № 7 камеры для электрофореза. Остальные ячейки заполнялись 0.5 н. раствором уксусной кислоты, после чего камеру подключали к источнику постоянного тока на 24 ч. Напряжение в приборе изменяли следующим образом: 1 ч – 200 В, 4 ч – 400 В, следующие 19 ч – 250 В. По окончании процесса содержимое ячеек собирали и упаривали на ротаторном испарителе “Rotavapor-R Büchi” (Швейцария). Сухой остаток растворяли в 0.1%-ной трифторуксусной кислоте (ТФУ). Антибактериальную активность полученных фракций определяли дисковым методом, используя в качестве тест-организма *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Биологически активные фракции ИЭФ-11 и ИЭФ-15 (из 11 и 15 ячеек соответственно) обессоливали с использованием 0.1%-ного раствора ТФУ на колонках, заполненных Sephadex G-25 (“Pharmacia Fine Chemicals”, Швеция). Затем очистку продолжали на картриджах С-16 (ЗАО “БиоХимМак СТ”, Россия), используя градиент концентрации от 0 до 100% ацетонитрила в 0.1% ТФУ. После обессоливания фракции ИЭФ-11 и ИЭФ-15 анализировали методом электрофореза на бумаге с последующей биоавтографией и обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ).

Электрофорез проводили на бумаге Filtrak F-14 на V-образном приборе Durguma [18], изготовленном на химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, при 550 В в течение 150 мин в 2н. уксусной кислоте с pH 2.5. Электрофоретическую подвижность определяли по величине смещения вещества (см) от линии старта к катоду. Биоавтографию выделенных антибиотиков проводили по методике [19] с использованием в качестве тест-организма *B. subtilis* ATCC 6633. В качестве контрольного препарата использовали нистин А.

ОФ-ВЭЖХ анализ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром А-02 (ЗАО “Эконова”, Россия), термостатируемым при 35°C с колонками из нержавеющей стали (размером 2.0 × 75.0 мм), заполненных сорбентом Prontosil 120-5C18AQ (“Macherey-Nagel”, Германия). В работе использовали линейный градиент подвижной фазы, создаваемый элюентом А (0.1%-ный раствор ТФУ в воде) и элюентом В (0.1%-ный раствор ТФУ в ацетонитриле) при скорости потока 100 мкл/мин. Реагенты готовили с применением воды высшей степени очистки (18.1 Мом/см), полученную на установке Milli-Q® Plus (“Millipore”, Франция). Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил фирмы “Sigma-Aldrich” (Германия). Детектирование разделяемых веществ осуществляли при двух длинах волн 214 и 270 нм в градиенте концентрации элюента В (от 0

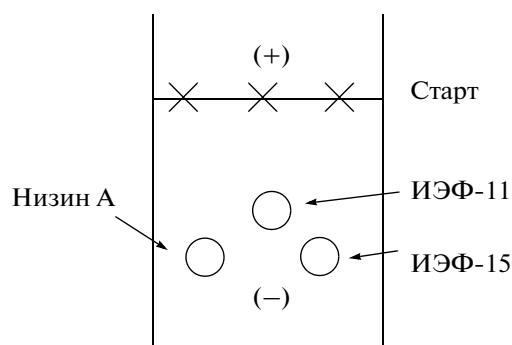


Рис. 1. Биоавтография электрофореза фракций ИЭФ-11 и ИЭФ-15, антибиотика, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К (тест-организм *Bacillus subtilis*).

до 80%); время анализа составляло 20–25 мин для каждой пробы. Объем вводимых проб фракции ИЭФ-11 и ИЭФ-15 составлял 15 мкл. Контрольным образцом был низин А, растворенный в 0.1%-ной ТФУ с концентрацией 1 мг/мл. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Полученные в ходе ОФ-ВЭЖХ-анализа фракции, соответствующие отдельным пикам, были собраны. Спектр антимикробного действия выделенных из фракций веществ определяли дисковым методом, используя в качестве тест-организмов грамположительные бактерии: *Bacillus coagulans* 429, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. mycoides* 537, *Micrococcus luteus* NCTC 8340; а также грамотрицательные бактерии: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ATCC 8461. Тест-организмы выращивали и культивировали, как описано в работе [11].

Фракции, содержащие антибиотик, анализировали масс-спектрометрически. Масс-спектры антибиотиков получены на приборе Ultraflex II MALDI ToF/ToF “Bruker Daltonics” (Германия), оснащенный УФ лазером 355 нм (Nd) в режиме получения положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных масс составляла 0.001%. На мишени смешивали по 1 мкл раствора образца и 0.3 мкл раствора 2.5-дигидроксибензойной кислоты с концентрацией 10 мг/мл в 20%-ном ацетонитриле с 0.5%-ной ТФУ. Полученную смесь высушивали на воздухе.

Аминокислотный состав веществ, содержащихся во фракциях, собранных в ходе ОФ-ВЭЖХ, определяли методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе “Hitachi L-8800” (Япония) после полного кислотного гидролиза при следующих условиях: $\text{HCl}_{\text{конц}}$: ТФУ (2 : 1) с добавлением 0.01%-ного раствора β-меркаптоэтанола в течение 1 ч при 155°C. Объем вводимой пробы на колонку 95 мкл.

Исследование биосинтеза антимикробных пептидов, продуцируемых *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К, при росте культуры на средах разного состава. По 50 мл 23-часовой культуры *L. lactis* subsp. *lactis* 194-К, выращенной на вышеуказанных средах, центрифугировали при 2240 g в течение 30 мин. Таким образом были получены осадок (клетки) массой 3–4 г и нативные растворы (НР) объемом 50 мл. Клетки дважды промывали фосфатным буфером, pH 5.5, после чего их обрабатывали 5 мл смеси: ацетон–вода–уксусная кислота (4 : 5 : 1). В результате был получен клеточный экстракт (КЭ) объемом 5 мл. Фракции культуральной жидкости (КЭ и НР) анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ в условиях, как описано

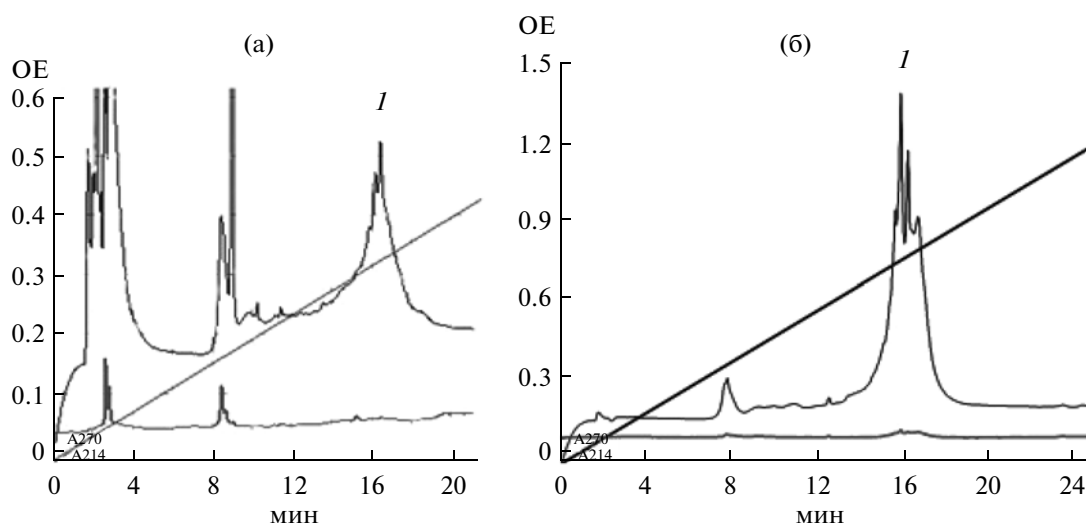


Рис. 2. ОФ-ВЭЖХ анализ антибиотика, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К. а – фракция ИЭФ-15; б – стандарт (антибиотик низин А).

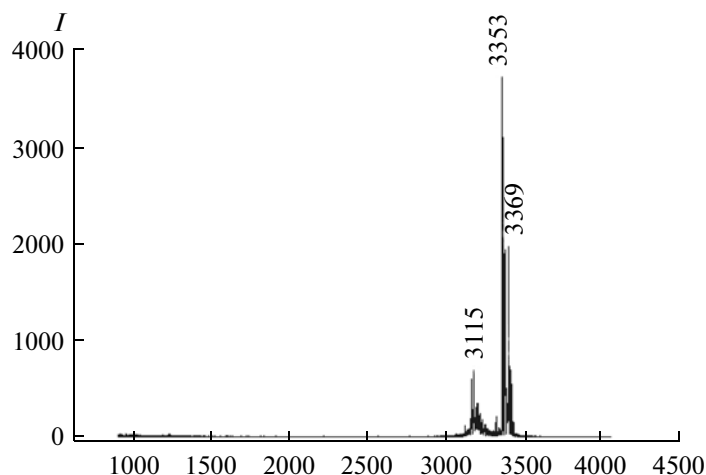


Рис. 3. Масс-спектр антибиотика, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К, содержащегося в пике 1 фракции ИЭФ-15.

выше. Предварительно КЭ и НР центрифугировали, используя микроцентрифугу фирмы “BECKMAN COULTER” (™Microfuge® 18 Centrifuge, США) при 5564 g. Объем вводимых проб составлял для НР – 3 мкл и для КЭ – 15 мкл. Полученные в ходе ОФ-ВЭЖХ анализа фракции, содержащие отдельные пики, были собраны и антимикробную активность веществ в пиках определяли, как описано выше. Фракции, содержащие антибиотик, были также анализированы методом масс-спектрометрического анализа.

Количественное содержание бактериоцинов в НР и КЭ определяли по высоте пика и выражали в оптических единицах в мл культуральной жидкости. Динамику образования антимикробного пептида 194-D изучали на наиболее оптимальной для его биосинтеза среде (среда 1). Отбор проб культуральной жидкости проводили каждые 3 ч в течение 30 ч роста культуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе [11] было показано, что наряду с антибиотиками гидрофобной природы штамм *L. lactis* subsp. *lactis* 194-К образует антимикробное вещество пептидной природы 194-D. Пептидная природа вещества 194-D была подтверждена положительной реакцией с нингидрином и миграцией к катоду в слабокислой среде. Ранее на примере лактококцина В и педиоцина РА-1 было показано, что для выделения небольших катионных пептидов можно успешно применять метод препаративного изоэлектрофокусирования [20]. Поэтому данный метод в модификации [17] был использован в нашей работе для выделения антибиотика 194-D, содержащегося в порошке, полученном из культуральной жидкости штамма-продуцента.

В результате препаративного изоэлектрофокусирования было установлено, что порошок содержит два биологически активных вещества, которые были распределены в ячейках 11 и 15 ИЭФ соответственно. После обессоливания содержимого ячеек были получены фракции ИЭФ-11 и ИЭФ-15, биоавтография которых после электрофореза на бумаге представлена на рис. 1. Из схемы видно, что во фракции ИЭФ-15 содержится вещество, сопоставимое по электрофоретической подвижности (R_f) с низином А ($R_f = 6.5$), а во фракции ИЭФ-11 содержится вещество с $R_f = 5.1$, отличное по подвижности от низина А.

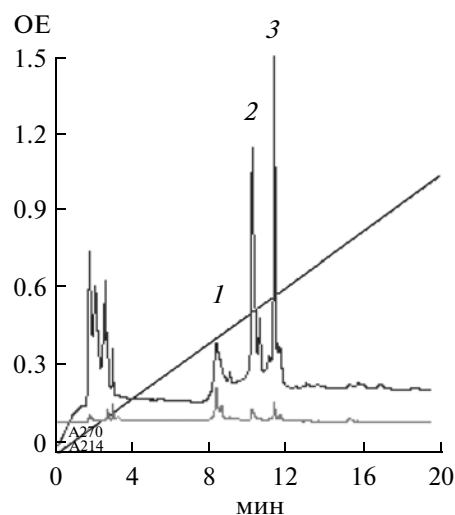


Рис. 4. ОФ-ВЭЖХ анализ фракции ИЭФ-11, содержащий антибиотик, образуемый *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К.

Пики 1 и 3 – биологически неактивные вещества; пик 2 – антимикробный полипептид 194-D.

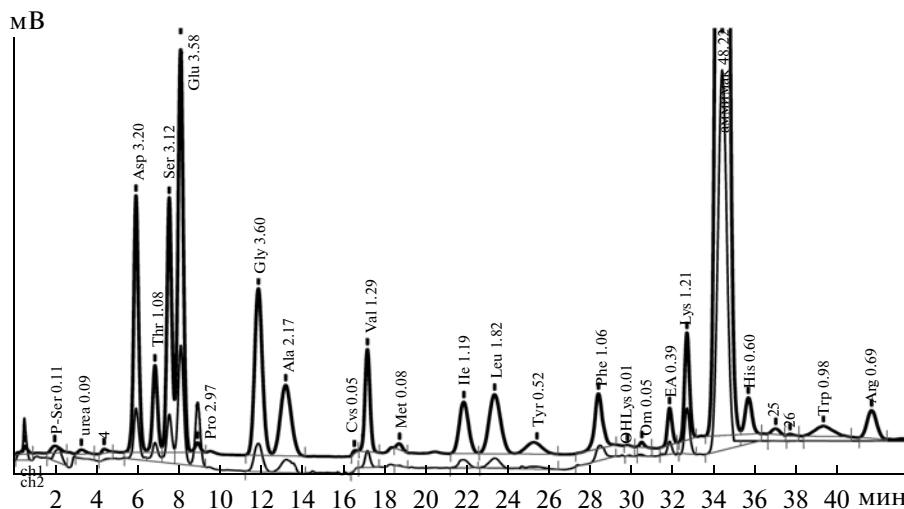


Рис. 5. Хроматограмма кислотного гидролизата полипептида 194-D, содержащегося в пике 2 фракции ИЭФ-11 антибиотика, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K. (Числа в максимумах пиков соответствуют количеству аминокислоты, в пробе, нМ).

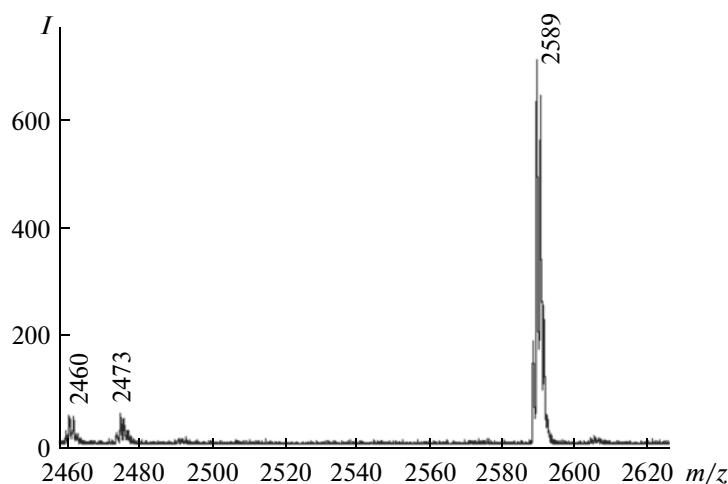


Рис. 6. Масс-спектр полипептида 194-D, содержащегося в пике 2 фракции ИЭФ-11 антибиотика, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K.

ОФ-ВЭЖХ анализ показал, что вещество, содержащееся во фракции ИЭФ-15 (пик 1, рис. 2а) по времени выхода (16.2 мин) совпадает с пиком содержащим бактериоцин низин А (пик 1, рис. 2б). С помощью масс-спектрометрического анализа было установлено, что молекулярная масса вещества, содержащегося в пике 1, равна 3353 Да (рис. 3), что идентично массе низина А [21]. Из полученных результатов можно сделать вывод, что фракция ИЭФ-15 содержала вещество, которое было идентифицировано, как известный бактериоцин низин А (основной компонент коммерческого препарата “Nisaplin”).

Анализ фракции ИЭФ-11 с помощью ОФ-ВЭЖХ (рис. 4) показал, что в ней содержатся два вещества (пик 2 со временем выхода 10.2 мин и пик 3 — время выхода 11.7 мин). Вещества, содержащиеся в пиках 2 и 3, были препаративно собраны и методом дисков установлено, что антимикробной активностью обладало вещество, содержащееся в пике 2. Для подтверждения пептидной природы вещества из пика 2 фракции ИЭФ-11 был проведен аминокислотный анализ этого соединения (рис. 5). Из данных аминокислотного анализа, представленных на рис. 5, следует, что вещество содержало следующие аминокислоты: Асп, Тре, Сер, Глу, Про, Гли, Ала, Вал, Иле, Лей, Фен, Лиз,

Трп в количественном соотношении 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 2 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1. Полученные данные аминокислотного и масс-спектрометрического анализа свидетельствуют о том, что выделенное из фракции ИЭФ-11 биологически активное вещество представляет собой полипептид с молекулярной массой m/z 2589 (рис. 6), который был нами обозначен, как 194-D.

Полипептид 194-D, в отличие от низина А [2], обладал широким спектром антимикробного действия и подавлял развитие как грамположительных (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. mycoides*, *Micrococcus luteus*), так и грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Comamonas terrigena*), что является не характерным свойством для бактериоцинов, синтезируемых бактериями *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Для идентификации выделенного бактериоцина по имеющимся физико-химическим характеристикам был проведен поиск аналогов по компьютерной базе данных BNPD [22, 23]. На данном этапе работы аналогов бактериоцину 194-D не было выявлено.

Поскольку известно, что на синтез бактериоцинов большое влияние оказывают условия культивирования штамма-продуцента, в особенности состав питательных сред, был изучен синтез двух бактериоцинов (низина А и 194-D) штаммом 194-К в зависимости от состава среды культивирования. Было установлено, что при росте на разных средах к 23 ч количество бактериоцина 194-D в культуральной жидкости значительно превышало количество низина А (таблица). В клеточных экстрактах на всех средах присутствовали оба антимикробных пептида (рис. 7б, таблица), в то время как в нативном растворе культуральной жидкости

Количественное содержание бактериоцинов (194-D, низина А) в культуральной жидкости *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К к 23 ч в зависимости от среды культивирования

Среда культивирования	Количественное содержание бактериоцинов, ОЕ/мл*			
	нативный раствор		клетки	
	194-D,	низин А	194-D	Низин А
1	1683 ± 117	—	2.2 ± 0.05	1.5 ± 0.05
2	543 ± 103	—	2.6 ± 0.05	2.0 ± 0.24
3	465 ± 49	—	1.2 ± 0.14	1.90 ± 0.09
4	687 ± 65	—	1.6 ± 0.05	1.7 ± 0.09
5	813 ± 75	—	2.1 ± 0.19	1.2 ± 0.05
6	456 ± 39	—	—	1.2 ± 0.03
7	933 ± 34	—	1.3	0.93 ± 0.02
8	758 ± 19	—	2.4 ± 0.09	1.2 ± 0.09

* ОЕ/мл — оптические единицы в 1 мл культуральной жидкости; “—” — не обнаружено.

был обнаружен только бактериоцин 194-D (рис. 7а, таблица). На среде № 6, содержащей сахарозу и дрожжевой экстракт, бактериоцин 194-D выделялся в среду культивирования, а в клетках присутствовал только низин А (таблица).

На средах 2, 4 соотношение низина А и полипептида 194-D в клетках было практически равным, на средах 5, 8 низина А было в два раза меньше. При культивировании штамма на среде 3, содержащей KH_2PO_4 , мелассу и дрожжевой экстракт, в клеточном экстракте низина А было на 58%

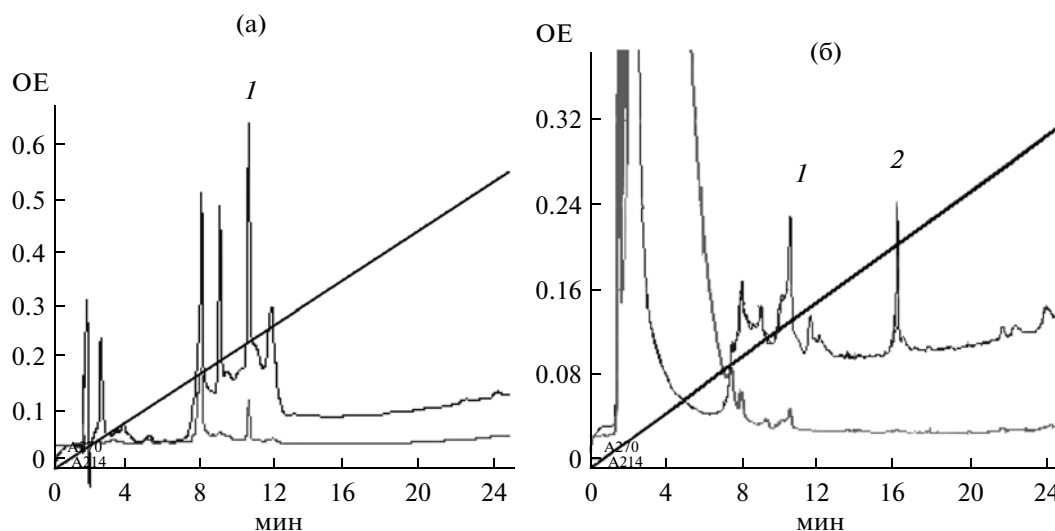


Рис. 7. ОФ-ВЭЖХ анализ нативного раствора (а) и клеточного экстракта (б) 23-часовой культуры *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К при росте на среде 4 с пептоном, сахарозой и дрожжевым экстрактом. Пик 1 — полипептид 194D, пик 2 — низин А.

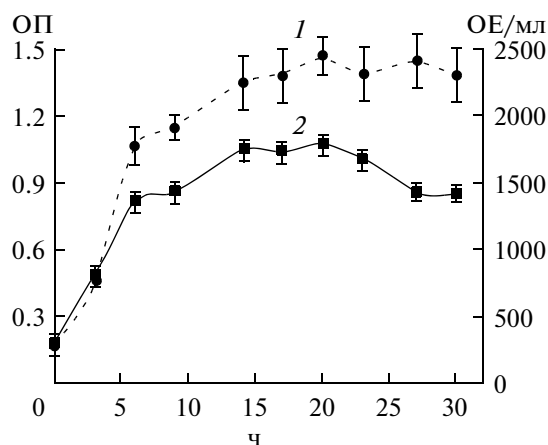


Рис. 8. Динамика образования бактериоцина 194-D при выращивании штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K на среде 1 с глюкозой, гидролизатом казеина, дрожжевым экстрактом и фосфатом калия: 1 – рост штамма; 2 – продукция бактериоцина.

больше, чем полипептида 194-D (таблица). Наибольший выход полипептида 194-D наблюдался при росте культуры на среде 1 с глюкозой, дрожжевым экстрактом, гидролизатом казеина и фосфатом калия. На этой среде количество антибиотика 194-D в культуре штамма 194-K превышало содержание низина А в 1123 раза. Это говорит о том, что низин А – минорный бактериоцин, а среда № 1 является оптимальной для биосинтеза нового бактериоцина 194-D.

Результаты исследований по культивированию штамма-продуцента на оптимальной для образования пептида 194-D среде (среда 1) показали, что его биосинтез происходит параллельно росту штамма 194-K (рис. 8). Это свидетельствует о том, что, возможно, биосинтез пептида 194-D протекает на рибосомах клетки, поэтому его можно считать бактериоцином. Как видно из рис. 8, максимальное количество бактериоцина 194-D присутствовало в среде к 14–20 ч роста культуры. К 30 ч происходит уменьшение количества полипептида на 21%, что можно объяснить его лабильностью.

В результате проведенного исследования было установлено, что штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K наряду с нейтральными гидрофобными антибиотиками ароматической природы [11] способен продуцировать два биологически активных вещества полипептидной природы. Одно из них по молекулярной массе и ОФ-ВЭЖХ анализу было идентифицировано как низин А, относящийся к классу лантибиотиков. Другое вещество, обозначенное как полипептид 194-D, состояло из 20 аминокислот и обладало молекулярной массой 2589 Да. Исходя из того, что 194-D имеет

пептидную природу, и синтез его в процессе культивирования штамма 194-K происходил параллельно росту продуцента, то можно считать, что данное вещество является бактериоцином.

В отличие от низина А бактериоцин 194-D имел более широкий спектр действия и обладал способностью подавлять рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Синтез бактериоцинов происходит на всех средах, поддерживающих рост данного штамма. Содержание бактериоцина 194-D в зависимости от среды культивирования было в 380–1123 раза больше, чем низина А. Это говорит о том, что низин А в культуре *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K образуется в незначительных количествах. Установлено, что оптимальной для синтеза антимикробного пептида 194-D является среда 1, содержащая глюкозу, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и фосфат калия.

Авторы приносят благодарность Хряповой Е.В. (Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН) за масс-спектрометрический анализ выделенных антибиотиков и Ксенофонтову А.Л. (Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского) за проведение аминокислотного состава пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hirsh A. // J. Gen. Microbiol. 1951. V. 5. P. 208–221.
- Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R.J., Hugenholtz J. // Antonie Leeuwenhoek. 1996. V. 69. № 2. P. 193–202.
- Galvez A., Abriouel H., Lopez R., Omar N. // J. Food Microbiol. 2007. V. 120. № 1–2. P. 51–70.
- Nes I., Yoon S.-S., Diep D.B. // Food Sci. Biotechnol. 2007. V. 16. № 5. P. 675–690.
- Nissen-Meyer J., Oppegard C., Rogne P., Haugen H.S., Kristiansen E. // Probiotics & Antimicro. Prot. 2010. V. 2. № 2. P. 52–60.
- Oscariz J.C., Pisabarro A.G. // Int. Microbiol. 2001. V. 4. № 1. P. 13–19.
- Mantovani H., Russell J. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 2. P. 808–813.
- Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Нетрусов А.И. // Вестн. Моск. ун., сер. Биология. 2003. Т. 16. № 4. С. 17–22.
- Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Ботина С.Г., Нетрусов А.И. // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. С. 560–568.
- Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Sultimova T.D., Bilanenko E.N., Fedorova G.B., Khatruxha G.S., Netrusov A.I. // Amer. Agricult. Biol. Sci. 2010. V. 5. № 4. P. 477–485.
- Устюгова Е.А., Фёдорова Г.Б., Камруха Г.С., Стоянова Л.Г. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 5. С. 644–650.

12. Jensen P., Hammer K. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 12. P. 4363–4366.
13. Стоянова Л.Г., Левина Н.В. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 3. С. 286–291.
14. Li C., Bai J., Cai Z., Ouyang F. // J. Biotechnol. 2002. V. 93. № 1. P. 27–34.
15. de Man J.D., Rogosa M., Sharpe M.E. // J. Appl. Bact. 1960. V. 23. № 1. P. 130–135.
16. Zhou X., Pan Y.-J., Wang Y.-B., Li W.-F. // J. Food Sci. 2008. V. 73. № 6. P. 245–249.
17. Sova O. // Electrophoresis. 1990. V. 11. № 11. P. 963–966.
18. Durrum E.L. // Science. 1951. V. 113. № 2925. P. 66–68.
19. Haese A., Keller U. Genetics of actinomycin C production in *Streptomyces chrysomallus* // J. Bacteriol. 1988. V. 170. № 3. P. 1360–1368.
20. Venema K., Chikindas M., Seegers M., Haandrikman J., Leenhouts K.J., Venema G., Kok J. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 1. P. 305–309.
21. Zendo T., Yoneyama F., Sonomoto K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 1. P. 1–9.
22. Berdy J. // J. Antibiot. 2005. V. 58. № 1. P. 1–26.
23. Bostian M., McNitt K., Aszalos A., Bérdy J. // J. Antibiot. 1977. V. 30. № 1. P. 633–634.

Characteristics and Identification of Bacteriocins Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K

E. A. Ustyugova^a, A. V. Timofeeva^b, L. G. Stoyanova^a, A. I. Netrusov^a, and G. S. Katrukha^c

^a Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

^b Science Park, Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^c Gauze Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119021 Russia

e-mail: ustyugova.katya@mail.ru, stoyanovamsu@mail.ru

Received January 26, 2012

Abstract—The *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K strain has been established to be able to produce two bacteriocins, one of which was identified as the known lantibiotic nisin A, and the other 194-D bacteriocin represents a polypeptide with a 2589-Da molecular mass and comprises 20 amino acid residues. Both bacteriocins were produced in varying proportions in all of the studied nutrient media, which support the growth of the producer. Depending on the cultivation medium, the nisin A content was 380- to 1123-fold lower in the 194-K strain culture fluid than that of the 194-D peptide. In comparison to nisin A Bacteriocin 194-D possessed a wide range of antibacterial activity and suppressed the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. An optimal medium for 194-D bacteriocin synthesis was shown to be a fermentation medium which contained yeast extract, casein hydrolysate, and potassium phosphate. The biosynthesis of bacteriocin 194-D by the 194-K strain in these media occurred parallel to producer growth, and its maximal accumulation in the culture fluid was observed at 14–20 h of the strain's growth.