

УДК 579:577.112.6

doi: 10.17223/19988591/29/4

**В.М. Храмов, Т.А. Калмантаев, Г.Т. Садикова,
В.В. Перелыгин, В.Д. Похиленко**

*Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии, п. Оболensk, Московская обл., Россия*

Антимикробный комплекс пептидной природы *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы
«Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-
эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости
в РФ (на 2011–2015 гг.)» по НИР № 045 на тему «Разработка и исследование новых
дезинфектантов, антимикробных и инсектицидных препаратов» в 2013 г.

Показаны способность штамма E. mundtii PPHS-5/13 вырабатывать бактерицидную субстанцию, кинетика ее накопления и зависимости выхода от компонентного состава питательной среды. Найдены способ и условия выделения из культуральной жидкости бактерицидного комплекса, определены молекулярная масса и подходы по накоплению активной фракции антимикробного пептида. Доказательствами пептидной природы бактерицидного комплекса и его близости к бактериоцинам подкласса Па являются экспериментальные данные по его разрушению протеолитическими ферментами, выявление при помощи трицин-SDS-PAGE электрофореза индивидуальной полосы с молекулярным весом около 5–6 кДа с активностью против грамположительных бактерий. По данным MALDI-TOF антимикробный комплекс пептидной природы имеет в своем составе преимущественно вещество с молекулярной массой 5 762 Да. Проведенные исследования позволяют рассматривать штамм E. mundtii PPHS-5/13 в качестве перспективного продуцента нового антибактериального средства натурального происхождения, особенно эффективного против листерий.

Ключевые слова: *Enterococcus*; бактериоцины; BLIS; антимикробный комплекс.

Введение

Стремительный рост устойчивости микроорганизмов к антибиотикам создал ряд серьезных проблем в лечении инфекционных болезней микробной этиологии. В связи с необходимостью поиска новых лекарственных средств, в результате быстрого появления лекарственно устойчивых форм микроорганизмов, подавления иммунитета, аллергизации организма, обусловленных частым применением антибиотиков, на сегодняшний день все больше востребованы новые средства естественного происхождения с анти-

микробным действием [1, 2]. В качестве претендентов на такую роль часто рассматриваются пробиотические бактерии, бактериофаги и бактериоцины [3–6]. Если пробиотические бактерии после колонизации на слизистых действуют комплексно, продуцируя метаболиты с антимикробным действием, то бактериофаги и бактериоцины – избирательно. Считается, что бактериоцины, в отличие от вирусов бактерий, более безопасны для потребления человеком [7]. Кроме того, близкий к антибиотикам антимикробный потенциал бактериоцинов делает их весьма перспективным объектом исследований, претендующих на роль антимикробных средств естественного происхождения [8, 9].

Бактериоцины и бактериоциноподобные ингибирующие субстанции (bacteriocin-like inhibitory substances – BLIS) представляют собой низкомолекулярные пептиды, обладающие антимикробным действием [5, 8, 9]. Их могут вырабатывать не только микроорганизмы, но и растения, насекомые, а также животные [1, 10, 11]. Бактериоцины отличаются от антибиотиков по своему происхождению: если первые синтезируются на рибосомах, то вторые – без их участия при помощи специальных ферментов [7, 12]. Наиболее известными бактериоцинами с 60-летней историей применения являются низин и его стандартизованный вариант низаплин [13], выпускаемый английской компанией «Aplin&Barrett Ltd» [14, 15]. Недостаток низина – узкий спектр антимикробной активности и стабильность лишь в области кислых значений pH. В связи с этим поиск новых бактериоцинов, отвечающих требованиям потребителей и производителей, – актуальный вопрос и для нашей страны. К сожалению, изучение бактериоцинов в России ведется в недостаточной степени [16].

При поиске новых продуцентов бактериоцинов рекомендовано обращать внимание на «практически безопасные» (generally recognized as safe – GRAS) микроорганизмы [7]. Этим требованиям удовлетворяют некоторые виды энтерококков, продуцирующие более двух десятков энтероцинов бактериоцинов энтерококков [17, 18]. Наиболее привлекательными в этом плане являются негемолитичные виды *Enterococcus*: *E. faecium* и *E. mundtii*, способные вырабатывать бактериоцины класса II [17–19]. Выделенный нами штамм *E. mundtii* PPHS-5/13 способен накапливать в ферментате бактериоцидные вещества, однако его природа оставалась неизвестной.

Цель исследования – определение условий получения и выделения антимикробной субстанции, продуцируемой штаммом *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13, изучение ее природы и возможности практического использования.

Материалы и методики исследования

Материалом для исследования послужили штамм энтерококкового микроорганизма, выделенного из молока, и вырабатываемый им антимикробный комплекс веществ [20].

Штамм PPHS-5/13, идентифицированный с применением MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH), генетических 16SrDNA методов, биохимических тестов API® (BioMerieux) и морфокультуральных признаков как *Enterococcus mundtii*, был депонирован в Государственной коллекции «ГКПМОболенск» (№ В-7424). В качестве индикаторных культур для оценки антимикробной активности образцов энтероцина использовали микроорганизмы из коллекции Центра. В качестве питательных сред использовали коммерческие Nutrient Agar M001 и MRS-broth, HiMedia, (Индия), ГРМ-агар, ГРМ-бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и экспериментальные варианты.

При отработке условий глубинного культивирования штамма *E. mundtii* PPHS-5/13 опыты проводили в качалочных колбах объемом 700 мл с 200 мл питательной среды при температуре $34 \pm 2^\circ\text{C}$. Базовая среда включала (г/л): солянокислотный гидролизат казеина (5–10), дрожжевой экстракт (5–7), натрия хлорид (3–5), магния сульфат (0,3–0,5). Другие исследуемые компоненты (углеводы, фосфаты, цитраты, азид натрия) в базовую пропись вносили отдельно. Контролем являлось выращивание бактерий на MRS-бульоне – традиционной среде для глубинного культивирования большинства лактобактерий. Среды стерилизовали при 0,5 атм 30 мин. Варианты питательных сред, давшие лучшие результаты по уровню антимикробной активности в опытах на колбах, апробированы при культивировании штамма в 10 л ферментере NBS, модель 511 (США), с 6,5 л питательной среды, где дополнительно оптимизировали условия по перемешиванию, аэрации и продолжительности выращивания. Для определения бактерицидной активности пробы культуральной жидкости (КЖ) освобождали от клеток на микрофуге MiniSpin (13000 об/мин, 10 мин в «Eppendorf AG 22232», Germany) и по 10 мкл наносили на свежесазеянные газоны тест-штамма *Listeria monocytogenes* 776. Антимикробную активность количественно выражали в арбитражных единицах (AU; взяты из общепринятого английского обозначения *arbitration units*, аналогичного аббревиатуре МПК – минимальная подавляющая концентрация), отнесенных к 1 мл или 1 мг пробы. Для ее определения тестируемую жидкость разводили с двукратным шагом (1:1) в физрастворе в 512 раз (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16...1:512) или более. Из каждого разведения отбирали по 10 мкл и наносили на питательный агар в чашке Петри, которая перед этим засеивалась тест-штаммом; инкубировали в течение ночи при 36°C . При учете антимикробной активности отмечали то максимальное разведение пробы, в котором заметна зона отсутствия роста тест-штамма. Если, например, в разведении 1:64 наблюдалась зона ингибирования индикаторного микроорганизма, то с учетом ее количества (10 мкл) активность пробы в единице объема (1 мл) составила 6400 AU.

Удельные скорости накопления бактериоцидного комплекса (q_p , ч⁻¹) рассчитывали по формуле

$$q_p = \Delta P / X \Delta t,$$

где P – концентрация антимикробных веществ (мг/мл), t – время (ч), X – биомасса (мг/мл).

Отработка метода выделения BLIS из культуральной жидкости включала выбор способа ее разделения (центрибежное, мембранное) с последующей сепарацией бесклеточной жидкости при помощи классических методов – высаливания, сорбции, на границе фаз и их модификаций со сбором преципитатов, интерфазных пленок, их отмывкой, концентрированием, оценкой активности и физико-химических свойств [20].

Первичное определение молекулярной массы образцов BLIS проводили методом трицин-SDS-PAG электрофореза в камере фирмы «Hoefler» (США) по Shagger [21]. После окраски и отмывки гелиевую пластину помещали в стерильные чашки Петри и заливали агаровой суспензией индикаторного штамма (1 мл взвеси клеток смешивали с 15 мл расплавленного и охлажденного до 45°C ГРМ-агара с добавлением 0,5% дрожжевого экстракта). После инкубации чашек в термостате (37°C) в течение 18–20 ч отмечали наличие и расположение зоны подавления роста тест-культуры на агаре с привязкой к белковым маркерам молекулярных весов PageRuler™ или Spectra™ Multicolor.

Хроматографический анализ образцов BLIS проводили методом гель-фильтрации с помощью жидкостного хроматографа Acta Purifier 10 (GE HealthCare, США) на колонке для ВЭЖХ Luna 5u C18(2) 100A 250×4,6 mm (Phenomenex) с обработкой полученных данных по программе UNICORN 5.31 (Швеция).

Определение молекулярного веса пептида *E. mundtii* PPHS-5/13 проводили на основе данных исследований лазерной десорбции и ионизации из матрицы времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF, Bruker Daltonics, Германия) по протоколу для анализа белков [22].

Антимикробная активность BLIS в натуральных условиях испытывалась на тушках охлажденных коммерческих бройлеров. Для этого снятую кожу растягивали по поверхности стерильной марли в лотке и с помощью стального пробойника из нее нарезами кружки площадью около 4,5 см², которые вкладывали в чашки Петри диаметром 35 мм внешней стороной наружу и по 100 мкл инфицировали смесью листерий и сальмонелл в концентрации $2,5 \times 10^8$ клеток/мл каждого вида. На контрольные образцы кожи в таком же количестве наносили стерильный 0,9% раствор NaCl (физраствор). После 30 мин экспозиции при комнатной температуре инфицированные поверхности кож орошали жидким BLIS PPHS-5/13 (100 мкл/пробу), чашки с пробями закрывали крышками и на 45 мин помещали в холодильник (4°C). Затем все образцы кожи (опытные и контрольные) промывали стерильным физраствором (по 3 мл). Из накопившейся жидкости отбирали и высевали на питательный агар пробы для оценки в них общего микробного числа, которое определяли по количеству выросших колоний.

Количественную оценку результатов экспериментов представляли после их обработки с помощью программы MS Excell.

Результаты исследования и обсуждение

Для накопления практически значимых количеств бактериоцидного комплекса в культуральной жидкости (КЖ) при глубинном культивировании продуцента требовалось определить состав питательной среды и подобрать температурно-временные параметры выращивания штамма в опытах на колбах и затем в ферментере.

В результате выполненных исследований установлено, что антимикробная активность бесклеточного супернатанта, обусловленная накоплением бактериоцидного комплекса при глубинном культивировании штамма *E. mundtii* PPHS-5/13, зависела от компонентного состава питательных сред (табл. 1).

Таблица 1 [Table 1]

Антимикробная активность образцов бесклеточного супернатанта культуральной жидкости штамма *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 при нейтральном значении pH в зависимости от компонентного состава питательных сред
[Antimicrobial activity of *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 cell-free cultural supernatant samples at neutral pH depending on the component composition of nutrient media]

Среда (№) [Medium]	1	2	3	4	5	6
Состав, г/л [Composition, g/L]	HC (5), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,3)	HC (6), YE (6), NaCl (4), MgSO ₄ (0,3)	HC (7), YE (7), NaCl (3), MgSO ₄ (0,3)	HC (8), YE (7), NaCl (3), MgSO ₄ (0,3)	HC (9), YE (7), NaCl (3), MgSO ₄ (0,3)	HC (10), YE (7), NaCl (3), MgSO ₄ (0,3)
AA, AU/ml	400	400–800	800	800–1 600	1 600–3 200	1 600–3 200
Среда (№) [Medium]	7	8	9	10	11	12
Состав, г/л [Composition, g/L]	HC (10), YE (6), NaCl (4), MgSO ₄ (0,3)	HC (10), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,3)	HC (10), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,5)	HC (9), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,5)	HC (9), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,5), Gly (1)	HC (9), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,5), SA (1)
AA, AU/ml	1 600–3 200	1 600–3 200	1 600–3 200	1 600–3 200	3 200–6 400	1 600–3 200
Среда (№) [Medium]	13	14	15	16	17	18
Состав, г/л [Composition, g/L]	GK (9), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,5), SA (3)	GK (9), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,5), Gly (1), K ₂ HPO ₄ (3)	GK (9), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,5), SC (1)	GK (9), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,5), SC (3)	GK (9), YE (5), NaCl (5), MgSO ₄ (0,5), SC (1), K ₂ HPO ₄ (3)	MRS-broth 100% (55)
AA, AU/ml	1 600	3 200–6 400	3 200	3 200	3 200–6 400	3 200

Окончание табл. 1 [Table 1 (end)]

Среда (№) [Medium]	19	20	21	22	23	24
Среда (№) [Medium]	1	2	3	4	5	6
Состав, г/л [Composition, g/L]	MRS-broth 50% (27,5)	MRS-broth 10% (5,5)	GK (9), YE (5), NaCl (3), MgSO ₄ (0,5), L (10)	GK (9), YE (5), NaCl (3), MgSO ₄ (0,5), L (10), K ₂ HPO ₄ (3)	GK (9), YE (5), NaCl (3), MgSO ₄ (0,5), L (20), K ₂ HPO ₄ (3)	GK (9), YE (5), NaCl (3), MgSO ₄ (0,5), S (10)
AA, AU/ml	3 200	1 600–3 200	6 400–12 800	6 400–12 800	12 800	12 800
Среда (№) [Medium]	25	26	27	28	29	30
Состав, г/л [Composition, g/L]	GK (9), YE (5), NaCl (3), MgSO ₄ (0,5), S (10), K ₂ HPO ₄ (3)	GK (9), YE (5), NaCl (3), MgSO ₄ (0,5), S (20), K ₂ HPO ₄ (3)	GK (9), YE (5), NaCl (3), MgSO ₄ (0,5), S (20), SA (1), K ₂ HPO ₄ (3)	MRS-broth 10% (5,5) + SA (1)	MRS-broth 10% (5,5) + SC (1)	MRS-broth 10% (5,5) + Gli (1)
AA, AU/ml	12 800	12 800–25 600	12 800	1 600–3 200	3 200–6 400	3 200

Примечание. GK – гидролизат казеина, YE – дрожжевой экстракт, L – лактоза, S – сахароза, Gly – глицерин, SA – азид натрия, SC – цитрат натрия, MRS-broth – MRS-бульон (контрольная среда). AA – антимикробная активность против тест-штамма *Listeria monocytogenes* 776 в арбитражных единицах.

[Note (the columns of the table display the numbers, the composition of the nutrient medium (g/L) and the values of antimicrobial activity of the samples of the cultural liquid, which were obtained in these media)]: GK - hydrolyzed casein, YE - yeast extract, L - lactose, S - sucrose, Gly - glycerol, SA - sodium azide, SC - sodium citrate, MRS-broth - control medium. AA - antimicrobial activity against the test strain of *Listeria monocytogenes* 776 in arbitration units (AU) per ml of the sample].

Лучшие результаты получены в среде № 26: BLIS, выделенная из супернатанта данной среды, в 4–8 раз активнее, чем полученная при выращивании продуцента в контрольном MRS-бульоне. Цитрат и азид натрия обеспечивали лишь функции селективных добавок, фосфаты в первую треть периода культивирования препятствовали падению pH ниже 5 единиц, а глицерин как источник углерода существенно хуже, чем лактоза и сахароза.

Максимальный выход BLIS PPHS-5/13 наблюдался у 12-часовой культуры при переходе микроорганизмов в стационарную фазу роста (рис. 1). Далее с продолжением времени культивирования до 24 ч накопление BLIS постепенно падает, что связано с истощением в среде питательных веществ и увеличением концентрации кислых продуктов. Дальнейшему росту активности КЖ способствовало pH-стагирование ($6,0 \pm 0,5$) в сочетании с ведением процесса инкубации при температуре $33 \pm 1^\circ\text{C}$ (табл. 2).

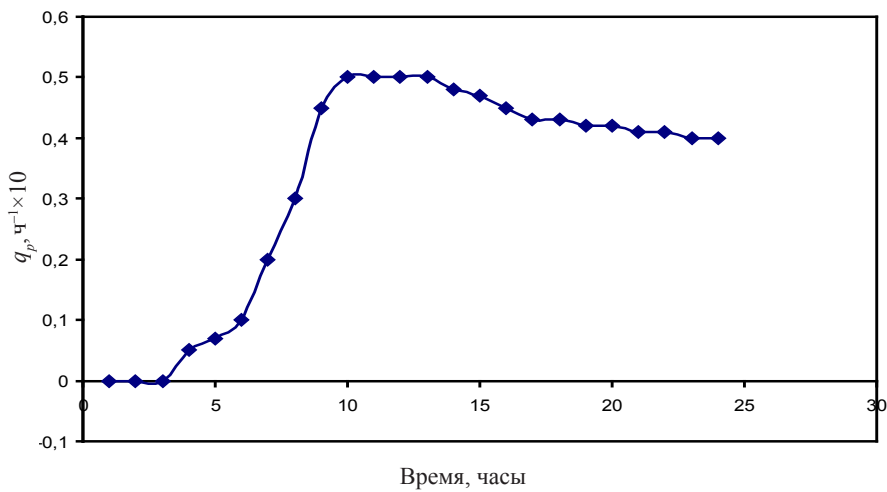


Рис. 1. Удельные скорости накопления антимикробного комплекса *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13

[Fig. 1. Specific accumulation rate of antimicrobial complex *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 (on the ordinate axis - rate of accumulation, $q_p, h^{-1} \times 10$; on the abscissa axis - time of cultivation, hours)]

Таблица 2 [Table 2]

Антимикробная активность (АА) образцов бесклеточного супернатанта культуральной жидкости *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 в зависимости от температуры, pH и продолжительности выращивания штамма
[Antimicrobial activity (AA) of *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 cell-free supernatant cultural liquid samples depending on temperature, pH and duration of the growing strain]

Условия роста (температура, pH, время) [Growth conditions (temperature, pH, time)]	30±0,5°C; pH 7,0...4,3; в течение 12 ч [within 12 h]	30±0,5°C; pH 7,0...4,1; в течение 24 ч [within 24 h]	30±0,5°C; pH 5,8...6,2; в течение 12 ч [within 12 h]	30±0,5°C; pH (5,8...6,2); в течение 24 ч [within 24 h]
АА, АУ/мл	6 400	6 400	6 400–12 800	6 400
Условия роста (температура, pH, время) [Growth conditions (temperature, pH, time)]	33±1°C; pH 7,0...4,2; в течение 12 ч [within 12 h]	33±1°C; pH 7,0...3,9; в течение 24 ч [within 24 h]	33±1°C; pH (6,0±0,2); в течение 12 ч [within 12 h]	33±1°C; pH (6,0±0,2); в течение 24 ч [within 24 h]
АА, АУ/мл	12 800	12 800	12 800–25 600	12 800

Окончание табл. 2 [Table 2 (end)]

Условия роста (температура, pH, время) [Growth conditions (temperature, pH, time)]	37±1°C; pH = 7,0...4,0; в течение 12 ч [within 12 h]	37±1°C; pH = 7,0...3,9; в течение 24 ч [within 24 h]	37±1°C; pH (6,0±0,2); в течение 12 ч [within 12 h]	37±1°C; pH (6,0±0,2); в течение 24 ч [within 24 h]
AA, AU/ml	12 800	6 400–12 800	12 800	6 400–12 800

Примечание. AU/мл – арбитражные единицы антимикробной активности образцов на миллилитр пробы против тест-штамма *Listeria monocytogenes* 776.
[Note. AU/ml - arbitrary units of antimicrobial activity of samples per milliliter against the test strain of *Listeria monocytogenes* 776].

В условиях улучшенной массопередачи ферментера накопление бактериоцидной субстанции клетками штамма PPHS-5/13 в процессе их глубинного культивирования становилось еще более стабильным (табл. 3).

Таблица 3 [Table 3]
**Параметры культивирования штамма *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13
в 10 л ферментера и показатели бесклеточной жидкости**
[Cultivation parameters of the strain *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13
in 10-L fermenter and indicators of cell-free liquid]

Время роста, ч [Growth time, h]	Темпера- тура, °C [Tempera- ture, °C]	Поддержа- ние pH* [pH* support]	Перемешива- ние, об/мин [Mixing, r/ min]	Аэрация, л/мин [Aeration, L/min]	Достигаемые выходы [Achieved outputs]	
					OD (550 nm)	AA КЖ [AA CL]
11,0±1,5	33,0±1,0	6,0±0,5	220–450	3±1	2,8±0,6	12 800–25 600

Примечание. * – при помощи 20% KOH; OD – оптическая плотность культуральной жидкости; AA КЖ – антимикробная активность в отношении *Listeria monocytogenes* шт. 776, в арбитражных единицах (AU/мл).
[Note. The columns of the table contain data about the values of monitored parameters. * the adjustment of pH was carried out using 20% KOH solution; OD - the optical density of the cultural liquid; AA CL - antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* 776 in arbitrary units (AU/ml)].

В дальнейшем требовалось отработать способ извлечения BLIS из КЖ. Для этого КЖ освобождают от клеток (центрифуга «Beckmann», 8 000 об/мин, 5°C, 45 мин) и упаривают в 6–10 раз на роторном вакуумном испарителе (Heidolph, модель Laborota 4000, Германия, при 60°C), чтобы снизить объем перерабатываемой жидкости. Применение мембранной технологии оказалось неприемлемым из-за существенной потери антимикробной активности фильтрата, обусловленной налипанием BLIS на полые волокна фильтрационного патрона. Далее концентрат супернатанта при отсутствии возможности его переработки в день получения замораживают и хранят при температуре не выше (–12)°C либо распылительно высушивают на установке Mini Spray Dryer Buchi B-190 (Швейцария) при следующих параметрах: тем-

пература входа/выхода – 130°C/90°C, подача жидкости – около 17 мл/мин. Получаемый сухой порошок с остаточной влажностью не более 6% и антимикробной активностью от 400 до 1000 AU/мл может быть использован непосредственно для приготовления кормовых добавок для животных, лечебных деконтаминирующих растворов, либо как сырьё для отработки способа выделения BLIS, ее очистки и определения свойств.

Отработка способа выделения и очистки BLIS проводилась как из бесклеточной жидкости, так и регидратированного порошка с использованием приемов высаливания, сорбции и межфазного разделения.

При использовании метода солевой преципитации в отмеренный объем бесклеточного супернатанта (нативного/замороженного-оттаянного/регидратированного) дробно с перемешиванием вводили навеску сульфата аммония до концентрации 60%, выставляли на холод (4...7°C) и далее центрифугировали (25 000 G, 20 мин, при 5°C). Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли 50–100 мл воды до полного растворения осадка; полученный раствор диализовали (мешок H1, размер пор 3,5 кДа) против дистиллированной воды в течение суток. Установлено, что выход по отношению к суммарному расчетному количеству бактериоцина составил до 30%, а по времени процесс выделения занимал около 2 сут (табл. 4).

Таблица 4 [Table 4]

**Показатели образцов BLIS *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13
в зависимости от способа обработки супернатанта
[The indicators of samples BLIS *Enterococcus mundtii*
PPHS-5/13 depending on a supernatant treatment method]**

Способы и средства выделения [Methods and means of excretion]		Выход [Output], AU/ml	Затраты по времени [Time costs]
Высаливание [Salting-out]	(NH ₄) ₂ SO ₄	51 200±7 400	Около 2 суток [About 2 days]
Сорбция на твердых носителях [Adsorption on solid media]	Силикагель 100/250 [Silica gel 100/250]	51 200±4 500	Около суток [About 1 day]
	Al ₂ O ₃	12 800±3 700	То же [The same]
	Аэросил А-300 [Aerosil A-300]	51 200±8 100	То же [The same]
	Смола КБ-4П2 [Resin KB-4P2]	6 400±800	То же [The same]
Разделение в двухфазной системе [Interfacial separation]	Хлороформ [Chloroform]	102 400±11 000	Около 3 часов [About 3 hours]
	Дихлорметан [Dichloromethane]	102 400±9 000	То же [The same]
	Толуол [Toluene]	51 200±5 300	То же [The same]

Примечание. AU/ml – арбитражная единица активности в отношении тест-штамма *Listeria monocytogenes* 776.

[Note. AU/ml - arbitrary units of antimicrobial activity of samples per milliliter against the test strain of *Listeria monocytogenes* 776].

При применении метода сорбции-десорбции в качестве носителей использованы: силикагель 100/250 мкм (Lachema, Чехия), окись алюминия для хроматографии 5/40 мкм (Lachema, Чехия), аэросил (диоксид кремния) марки А300 (Калушский ОЭЗ, Украина) и карбоксильный катионит (ионообменная смола) КБ-4П-2 (ГОСТ 20298–74). Указанные носители использовали в колоночном и «ванночном» (bath) вариантах. В первом исполнении сорбенты засыпали на 1/3 объема в стеклянные колонки (300×20 мм), во втором – в колбы на 750 мл. Подготовка сорбентов заключалась в промывке водой и уравнивании ацетатным буфером (рН = 4,6). Посадка образцов BLIS-содержащей жидкости заключалась в постепенном ее прибавлении в колонки или колбы с подготовленными сорбентами. При bath-методе колбы с ее содержимым помещали на качалку и перемешивали (60 об/мин) в течение 68 ч. Съем BLIS осуществляли в такой последовательности: дистиллированная вода (рН = 7,2), ацетатный буфер (рН = 4,7), дистиллированная вода (рН = 7,2), 5-, 10-, 20-, 30- и 35%-ные растворы ацетонитрила, дистиллированная вода (рН = 7,2). Образцы элюатов далее концентрировали методом упаривания (в 10 раз) и тестировали на активность. Установлено, что лучшие результаты по выходу антимикробной субстанции получались при использовании силикагеля и аэросила, худшие – на ионообменной смоле КБ-4П2 (см. табл. 4). В целом более удобным оказался колоночный вариант с применением силикагеля.

При отработке метода фазовой сепарации в качестве нерастворимого в воде органического растворителя применяли ди- и трихлорметан (хлороформ), толуол. Чистый стеклянный или фарфоровый стакан на 1/3 объема заполняли образцом бесклеточного супернатанта, туда же вносили (1:1) растворитель. Содержимое стакана гомогенизировали с помощью механического смесителя с металлической мешалкой (800 об/мин, 10 мин). Полученную эмульсию разливали в металлические стаканы, устанавливали в бакет-ротатор (4х150) центрифуги К-23Д фирмы «MLM» (ГДР) и откручивали в течение 20–25 мин при 5000 об/мин, 4–6°C. В результате гравитационного разделения эмульсии на границе фаз образовывался хорошо заметный интерфазный слой пленки (ИФС), содержащий концентрат бактериоцина с остатками среды роста. Разделенные фазы со стаканов осторожно удаляли с помощью вакуумного насоса Комовского, а остающийся ИФС высушивали при 90°C до постоянного веса, что обеспечивало удаление из нее органического растворителя.

Установлено, что в результате фазовой сепарации уходит более 98% балласта, представляющего собой компоненты питательной среды, минеральные соли и метаболиты (табл. 5).

Дихлорметан (ДХМ) предпочтительнее других растворителей из-за его более низкой температуры кипения (40°C), меньшим по сравнению с хлороформом и толуолом уровнем токсичности, легкости удаления из жидкостей и большей возможности многократного использования. При этом подсчита-

но, что выход BLIS по активному началу с использованием ДХМ составлял около 95% от исходного уровня и на весь процесс получения уходит не более 3 ч (см. табл. 4). При извлечении BLIS жидкофазным разделением супернатантов мы исходили из ранее полученных нами данных на других продуцентах о достаточно высокой эффективности данного метода [23]. Несмотря на то, что полученный указанным способом сухой концентрат BLIS содержал более 91% действующего начала (табл. 6), для изучения его природы все же требовалась его доочистка.

Таблица 5 [Table 5]

Выделение бактерицидного комплекса *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 из супернатанта с использованием органического растворителя
[The excretion of bactericidal complex *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 from supernatant using organic solvent]

Фракции супернатанта [Supernatant fractions]	Сухой остаток [Dry residue], %	Антилистериозная активность [Antilisterial activity], %
Верхняя [Upper]	86,5±2,4	7,7±0,3
Промежуточная [Intermediate]	11,8±0,5	91,2±3,3
Нижняя [Lower]	1,7±0,06	1,1±0,02
Супернатант до обработки [Supernatant before treatment]	100	100

Таблица 6 [Table 6]

Влияние протеолитических ферментов, pH и высоких температур на активность BLIS PPHS-5/13
[The influence of proteolytic enzymes, pH and high temperatures on the activity of BLIS PPHS-5/13]

Ферменты, температура и pH [Enzymes, temperature and pH]	Антимикробная активность [Antimicrobial activity]
BLIS без обработки [BLIS without treatment], pH = 6,1	+
BLIS + химотрипсин [BLIS + chymotrypsin], pH = 6,3	—
BLIS + протеиназа К [BLIS + proteinase K], pH = 6,2	—
BLIS при 100°C, 20 мин [BLIS at 100°C, 20 min], pH = 2*	+
BLIS при 121°C, 20 мин [BLIS at 121°C, 20 min], pH = 6,2	+
BLIS при 121°C, 20 мин [BLIS at 121°C, 20 min], pH = 10*	—

Примечания. Концентрации ферментов 10 мг/мл; «+» — наличие, «—» — отсутствие активности; * перед определением активности pH образцов доводили до 6,0–6,3 ед.
[Note: the concentration of enzymes - 10mg/ml; “+” available activity, “—” lack of activity; * before the determination of the activity pH of the samples was brought to 6,0-6,3 units].

Следующий и завершающий этап работы – изучение природы бактериоцидной субстанции *E. mundtii* PPHS-5/13. Для выбора подходящего метода очистки BLIS проводили тремя способами: переводом осадка вещества с одного растворителя в другой (этанол, изопропанол, вода) с последующим их выпариванием, с применением С-18 колонки (Varian, Harbor City, CA), эквивилиброванной метанолом и водой, и гель-фильтрацией. Для проведения гель-фильтрации пробы растворяли в фосфатном буфере и пропускали через колонку Luna 5u C18(2) 100A 250×4,6 mm (Phenomenex) жидкостного хроматографа Acta Purifier 10 (GE HealthCare, США). Для дальнейшей работы выбран метод гель-фильтрации как более производительный и воспроизводимый. Далее очищенные образцы BLIS исследовали на устойчивость к действию ферментов, pH, температуре с последующим тестированием проб на антимикробную активность.

Доказательствами пептидной природы BLIS *E. mundtii* PPHS-5/13 послужили экспериментальные данные по ее разрушению протеолитическими ферментами, что проявилось в потере антимикробного действия, а также наличие индивидуальной полосы активного пептида с молекулярным весом 5–6 кДа при электрофорезе в системе трицин–SDS–PAG (табл. 6, рис. 2).

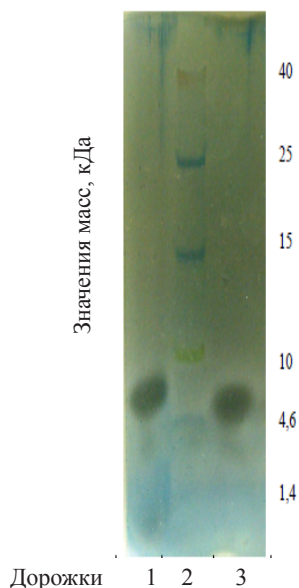


Рис. 2. Электрофорез образцов BLIS *Enterococcus mundtii* 5/13.

Дорожки: 1 и 3 – образцы BLIS, 2 – белковые маркеры молекулярных весов

[Fig. 2. Electrophoresis of BLIS *Enterococcus mundtii* 5/13 samples.

On the ordinate axis - molecular weight (in kiloDaltons); on the abscissa axis - lanes: 1 and 3 samples BLIS, 2 - protein molecular weight markers]

Масс-спектрометрический анализ образца BLIS PPHS-5/13 по результатам MALDI-TOF показал преимущественное содержание в нем вещества с молекулярной массой 5,762 кДа (рис. 3).

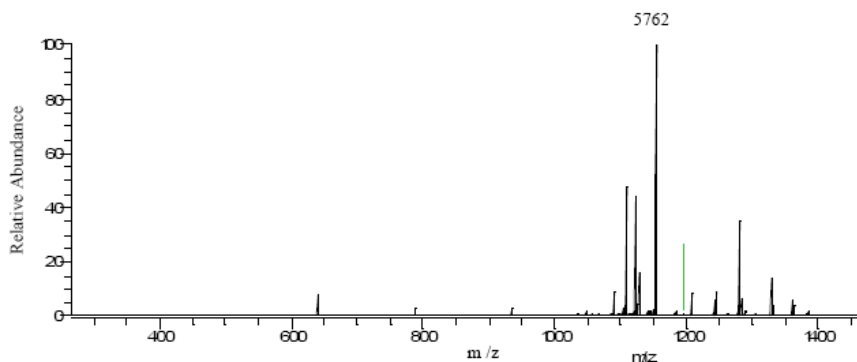


Рис. 3. Определение молекулярного веса образца BLIS *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 по MALDI-TOF Bruker Daltonics. MALDI (лазерная десорбция и ионизация из матрицы) – TOF (времяпролетный масс-спектрометр).

Анализ выполнен в отделе иммунобиохимии ГНЦ ПМБ к.ф.-м.н. А.К. Суриным

[Fig. 3. Determination of molecular weight of BLIS *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 sample by MALDI-TOF Bruker Daltonics. The analysis was carried out by AK Surin (State Research Center for Applied Microbiology& Biotechnology)]

В завершении работы проведена оценка возможности практического использования BLIS *E. mundtii* PPHS-5/13. Мясо животных является чрезвычайно благоприятной средой для размножения различных групп микроорганизмов, становясь источником инфекционного заражения человека. В нашем исследовании объектом изучения степени деконтаминирующего действия BLIS PPHS-5/13 куриная кожа, снятая с охлажденного окорочка бройлера.

Как показали результаты проведенных испытаний, обработка кожи бройлеров жидким препаратом BLIS *E. mundtii* PPHS-5/13 в дозе 100 мкл/пробу приводила к трехкратному снижению показателя обсемененности ее поверхности сальмонеллами и листериями (табл. 7).

Таким образом, в результате выполненных исследований подобрана питательная среда и условия культивирования штамма *E. mundtii* PPHS-5/13 для выработки практически значимых количеств бактериоциноподобной ингибирующей субстанции, определена кинетика накопления, выбран способ выделения из культуральной жидкости и показан практический пример ее возможного использования, а также получены доказательства пептидной природы активного начала.

Таблица 7 [Table 7]

**Действие BLIS *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 на уровень
обсемененности кожи бройлера сальмонеллами и листериями**
[Action of BLIS *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 on the broiler
skin contamination level by *Salmonella* and *Listeria*]

Образцы исследуемой кожи бройлерной птицы [Investigated skin samples]	Содержание бактерий в смывах, КОЕ/мл [Bacterial content in wash-offs, CFU/ml]	Уровень обсемененности [Level of contamination]
Нативный (негативный контроль) [Native (negative control)]	349±117×10 ³	Принят за 0%
Инфицированная без обработки BLIS (позитивный контроль) [Artificially contaminated with no treatment by BLIS (positive control)]	2 330±768×10 ³	100%
Инфицированная, обработанная BLIS (опыт) [Artificially contaminated after treatment by BLIS (experiment)]	690±214×10 ³	29,6%

[Note. The level of microbial contamination of sample skin after treatment of the BLIS, expressed as a percentage relative to the untreated skin0.

В частности, показано, что культивирование штамма для получения бактериоцидного комплекса следует проводить в бульоне, содержащем (г/л): гидролизат казеина – 9; сахарозу – 20; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 3; MgSO₄ – 0,5 при pH = 6,0±0,2 и температуре 33...34°C в течение 12–14 ч. Такие условия выращивания обеспечивают накопление в культуральной жидкости BLIS с активностью не менее 12800 AU/мл, что делает исследуемый микроорганизм технологически перспективным в качестве продуцента нового антибактериального средства из группы бактериоцинов.

На основе сравнительных исследований по выбору способа выделения BLIS отдано предпочтение методу межфазного разделения бесклеточного ферментата при использовании дихлорметана в качестве неполярного растворителя. Применение дихлорметана предоставляло возможность многократного его использования в связи с низкой температурой кипения (40°C), минимальной токсичностью и весьма высоким выходом (до 91%) целевой фракции. Теоретической предпосылкой выбора метода межфазного разделения для жидкостной преципитации BLIS и бактериоцинов явились их амфифильные свойства [24].

Доказательствами пептидной природы BLIS *E. mundtii* PPHS-5/13 послужили экспериментальные данные по ее разрушению протеолитическими ферментами, выявление при помощи Tricine-SDS-PAGE индивидуальной полосы с молекулярным весом около 5–6 кДа, близкому к энтероцинам группы А [17], выделение активной фракции, имеющей по данным MALDI-TOF преимущественно вещество с молекулярной массой 5,762 кДа. Сделан вывод о том, что антимикробный комплекс пептидной природы *E. mundtii*

PPHS-5/13 близок к бактериоцинам подкласса Па, которым свойственна высокая активность против микроорганизмов группы *Listeria* sp. [25, 26].

Заключение

Обнаружена способность штамма *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 производить BLIS на простых по составу средах при обычных условиях аэробного роста, а также определены основные условия ее извлечения из ферментата и очистки малозатратными методами. Установлено, что выходы антимикробного вещества из бесклеточного супернатанта PPHS-5/13 с использованием метода межфазного разделения с дихлорметаном в 2–8 раза выше, чем методов солевой преципитации сульфатом аммония или адсорбции на твердых носителях, при одновременном сокращении времени выделения с 24 до 3 ч. Показано, что антимикробный комплекс *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 имеет пептидную природу, состоит преимущественно из вещества с молекулярной массой 5,762 кДа и по своим основным свойствам близок к бактериоцинам подкласса Па. На примере обработки кожи бройлерной птицы продемонстрирована возможность практического применения BLIS *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 как средства для контроля уровня микробной обсемененности некоторых продуктов питания.

Литература

1. Marshall S., Arenas G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology // Electronic Journal of Biotechnology. 2003. Vol. 6, № 2. P. 271–284.
2. Gillor O., Etzion A., Riley M.A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics // Applied Microbiology and Biotechnology. 2008. Vol. 81, № 4. P. 591–606.
3. Abenavoli L., Scarpellini E., Rouabhia S., Balsano C., Luzzi F. Probiotics in non-alcoholic fatty liver disease: which and when // Annals of Hepatology. 2013. Vol. 12, № 3. P. 357–363.
4. Joerger R.D. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages // Poultry Science. 2003. Vol. 82. P. 640–647.
5. Riley M.A., Wertz J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application // Annual Review of Microbiology. 2002. Vol. 56. P. 117–137.
6. Kirkup B.C. Bacteriocins as Oral and Gastrointestinal Antibiotics: Theoretical Considerations, Applied Research, and Practical Applications // Current Medicinal Chemistry. 2006. Vol. 13, № 27. P. 3335–3350.
7. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Бактериоцины, их биологическая роль и тенденции применения // Исследовано в России. 2011. № 016. С. 164–198. URL: <http://zhurnal.apelarn.ru/articles/2011/016.pdf>
8. Gordon D.M., O'Brien C.L. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli* // Microbiology. 2006. Vol. 152. P. 3239–3244.
9. Giri S., Singh J. New Face in the Row of Human Therapeutics: Bacteriocins // Journal of Microbiology Research. 2013. Vol. 3, № 2. P. 71–78.
10. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Дефензины – мультифункциональные катионные пептиды человека // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008. № 2. С. 31–40.
11. Pálffy R., Gardlik R., Behuliak M., Kadasi L., Turna J., Celec P. On the Physiology and Pathophysiology of Antimicrobial Peptides // Molecular Medicine. 2009. Vol. 15, № 1–2. P. 51–59.

12. Егоров Н.С., Баранова И.П. Бактериоцины. Образование, свойства, применение // Антибиотики и химиотерапия. 1999. Т. 44, № 6. С. 33–40.
13. Стоянова Л.Г. Новые бактериоцины лактококков и их практическое использование: дис. ... д-ра биол. наук. М. : Московский государственный университет, 2008. 368 с.
14. Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R.J., Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin // Antonie Van Leeuwenhoek. 1996. Vol. 69, № 2. P. 193–202.
15. Thomas L.V., Clarkson M.R., Delves-Broughton J. Nisin // In: Natural Food Antimicrobial Systems. Ed. A.S. Naidu. © CRC Press LLC. Boca Raton ; London ; New York ; Washington, D.C., 2000. P. 467–528.
16. Червинец Ю.В. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта : дис. ... д-ра мед. наук. М. : ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», 2012. 263 с.
17. Ермоленко Е.И. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы использования (обзор литературы) // Вестник С.-Петербургского университета. 2009. Сер. 11, вып. 3. С. 78–93.
18. Гармашева И.Л., Коваленко Н.К. Идентификация и таксономия энтерококков // Мікробіологічний журнал. 2010. Т. 72, № 5. С. 49–58.
19. Todorov S.D., Dicks L.M.T. Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii* // Anaerobe. 2009. Vol. 15, № 3. P. 65–73.
20. Пат. 2532227. Российская Федерация, МПК C12N 1/20, C07K 14/315, C12R 1/01. Штамм *Enterococcus mundtii*, продуцирующий субстанцию пептидной природы с антилистериозной активностью / В.М. Храмов, В.Д. Похиленко, В.В. Перельгин, Г.Т. Садикова, Т.А. Калмантаев, И.А. Чукина, Э.А. Светоч; заявитель и патентообладатель ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. № 2013147136/10; 23.10.2013; опубликовано: 27.10.2014. Бюл. № 30. 12 с.
21. Schagger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // Analytical Biochemistry. 1987. Vol. 166. P. 368–379.
22. Gobom J., Schuerenberg M., Mueller M., Theiss D., Lehrach H., Nordhoff E. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics // Analytical Chemistry. 2001. Vol. 73, № 3. P. 434–438.
23. Калмантаев Т.А., Садикова Г.Т., Перельгин В.В., Похиленко В.Д. Бактериоциноподобное вещество *Bacillus circulans* и способ его получения // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2012. № 2 (18). С. 52–65.
24. Burianek L.L., Yousef A.E. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures // Let. Appl. Microbiol. 2000. Vol. 30. P. 193–197.
25. Ennahar S., Sashichara T., Sonomoto K., Ishizaki A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure // FEMS Microbiology Review. 2000. Vol. 24. P. 86–106.
26. Eijsink V.G.H., Skeie M., Middelhoven P.H., Brurberg M.B., Nes I.F. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria // Applied and Environmental Microbiology. 1998. Vol. 64. P. 3275–3281.

Поступила в редакцию 26.02.2014 г.; повторно 24.06.2014 г.; 21.11.2014 г.; принята 27.12.2014 г.

Авторский коллектив:

Храмов Владимир Михайлович – м.н.с. отдела биологических технологий ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск, Серпуховский р-н, Московская обл., Россия).

E-mail: Khramov-vladimir@yandex.ru

Калмантаев Тимур Ахмерович – канд. биол. наук, м.н.с. отдела биологических технологий ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск, Серпуховский р-н, Московская обл., Россия).

E-mail: kalmantaev@yandex.ru

Садикова Гульнур Тахавиевна – н.с. отдела биологических технологий ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск, Серпуховский р-н, Московская обл., Россия).

E-mail: Vpokhil003@yandex.ru

Перельгин Владимир Владимирович – с.н.с., канд. биол. наук, зав. отделом биологических технологий ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск, Серпуховский р-н, Московская обл., Россия).

E-mail: perelygin@obolensk.org

Похиленко Виктор Данилович – с.н.с., д-р техн. наук, в.н.с. отдела биологических технологий ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск, Серпуховский р-н, Московская обл., Россия).

E-mail: Vpokhil003@yandex.ru

Khramov VM, Kalmantaev TA, Sadikova GT, Perelygin VV, Pokhilenko VD. Antimicrobial complex *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 of peptide nature. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2015;1(29):37-55. doi: 10.17223/19988591/29/4. In Russian, English summary

**Vladimir M. Khramov, Timur A. Kalmantaev,
Gulnur T. Sadikova, Vladimir V. Perelygin, Viktor D. Pokhilenko**

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Oblast, Russian Federation

Antimicrobial complex *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 of peptide nature

An irregular application of antibiotics in medicine, veterinary and agriculture is known to result in a wide spread of drug-resistant microorganisms worldwide. Today new natural antimicrobials that would differ from antibiotics are urgently needed to control such microorganisms. Probiotic bacteria, bacteriophages and bacteriocins are often considered as candidates to play the role. In this respect nonhemolytic *Enterococcus* species, such as *E. faecium* and *E. mundtii*, as well as their poorly investigated species producing Class IIa bacteriocins are especially attractive. The aim of our research was to determine the most significant factors that may influence the ability of our *E. mundtii* PPHS-5/13 strain to produce bacteriocidal substance during submerged cultivation, to elaborate a method of purification of the substance and to study its nature and the main properties.

We showed that this strain can produce bacteriocidal substance in concentrations to 12.800 AU/ml on simple media and under conventional aerobic growth conditions. This allows microorganisms to be technologically applicable as a producer of a new antimicrobial remedy. Our research allowed us: to test a low-cost technology of isolation of the bacteriocidal complex from the culture fluid; to determine the peptide nature of the active agent; to determine what fraction inhibiting the growth of gram-positive bacteria; to evaluate tolerance of the peptide to pH, heat and proteolytic enzymes. The yield of the antimicrobial substance from the cell-free supernatant *E. mundtii* PPHS-5/13 strain with a phase separation method using dichloromethane 2-8 times higher than the salt precipitation method with ammonium sulfate or adsorption on solid media, while reducing the separation time from 24 to 3 hours. We found out that the antimicrobial complex *E. mundtii* PPHS-5/13 is of peptide nature, consists mainly of substances with molecular mass 5,762 kDa and its main properties, including and activity against *Listeria* spp., are similar to subclass IIA bacteriocins. By the example of broiler poultry skin we demonstrated the possibility of practical application of BLIS *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 as a means to control the level of microbial contamination of certain food stuff.

Acknowledgments: This work was carried out according to the Scientific Research No 045 on “Development and research of new disinfectants, antimicrobial and insecticidal preparations” in 2013 (Programme of the Russian Federation for 2011-2015).

The article contains 3 Figures, 7 Tables, 26 References.

Key words: *Enterococcus*; bacteriocins; BLIS; antimicrobial complex.

References

1. Marshall S, Arenas G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2003;6(2):271-284. Available at: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/2253/1/ej03030.pdf>
2. Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;81(4):591-606. doi: [10.1007/s00253-008-1726-5](https://doi.org/10.1007/s00253-008-1726-5)
3. Abenavoli L, Scarpellini E, Rouabhia S, Balsano C, Luzzo F. Probiotics in non-alcoholic fatty liver disease: which and when. *Annals of Hepatology*. 2013;12(3):357-363.
4. Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*. 2003;82:640-647. doi: [10.1093/ps/82.4.640](https://doi.org/10.1093/ps/82.4.640)
5. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*. 2002;56:117-137. doi: [10.1146/annurev.micro.56.012302.161024](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024)
6. Kirkup BC. Bacteriocins as Oral and Gastrointestinal Antibiotics: Theoretical Considerations, Applied Research, and Practical Applications. *Current Medicinal Chemistry*. 2006;13(27):3335-3350. doi: [10.2174/092986706778773068](https://doi.org/10.2174/092986706778773068)
7. Pokhilenko VD, Perelygin VV. Bakteriotsiny, ikh biologicheskaya rol' i tendentsii primeneniya [Bacteriocins: their biological role and potential application]. *Issledovano v Rossii*. 2011;016:164-198. [Electronic resource]. Available at: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/016.pdf>. In Russian
8. Gordon DM, O'Brien CL. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2006;152:3239-3244. doi: [10.1099/mic.0.28690-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.28690-0)
9. Giri S, Singh J. New Face in the Row of Human Therapeutics: Bacteriocins. *Journal of Microbiology Research*. 2013;3(2):71-78. doi: [10.5923/j.microbiology.20130302.02](https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20130302.02)
10. Budikhina AS, Pinegin BV. Defensins - multifunctional cation peptides of human. *Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2008;2:3-140. In Russian, English summary
11. Pálffy R, Gardlik R, Behuliak M, Kadasi L, Turna J, Celec P. On the Physiology and Pathophysiology of Antimicrobial Peptides. *Molecular Medicine*. 2009;15(1-2):51-59. doi: [10.2119/molmed.2008.00087](https://doi.org/10.2119/molmed.2008.00087)
12. Egorov NS, Baranova IP. Bakteriotsiny. Obrazovanie, svoystva, primeneniye [Bacteriocins. Formation, properties, application]. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 1999;44(6):33-40. In Russian
13. Stoyanova LG. Novye bakteriotsiny laktokokkov i ikh prakticheskoe ispol'zovanie [New bacteriocins of lactococci and their practical use. DrSci. Dissertation, Microbiology]. Moscow: Moscow State University; 2008. 368 p. In Russian
14. Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1996;69(2):193-202. doi: [10.1007/BF00399424](https://doi.org/10.1007/BF00399424)
15. Thomas LV, Clarkson MR, Delves-Broughton J. Nisin. In: *Natural Food Antimicrobial Systems*. Naidu AS, editor. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press LLC.; 2000. pp. 467-528.
16. Chervinets YuV. Simbioticheskie vzaimootnosheniya laktobacill i mikroorganizmov zheludочно-kishechnogo trakta [Symbiotic relationship of lactobacilli and microorganisms of the gastrointestinal tract. DrSci. Dissertation, Microbiology]. Moscow: First Moscow State Medical University named Sechenov; 2012. 263 p. In Russian
17. Ermolenko EI. Bakteriotsiny enterokokkov: problemy i perspektivy ispol'zovaniya [Bacteriocins of enterococci, problems and perspectives of using]. *Vestnik S.-Peterburgskogo universiteta*. 2009;11(3):78-93. In Russian

18. Garmasheva IL, Kovalenko NK. Identifikatsiya i taksonomiya enterokokkov [Identification and taxonomy of enterococci]. *Mikrobiologichnij zhurnal*. 2010;72(5):49-58. In Russian, English and Ukrainian summary
19. Todorov SD, Dicks LMT. Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. *Anaerobe*. 2009;15(3):65-73. doi: [10.1016/j.anaerobe.2008.11.002](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.11.002)
20. Patent 2532227. Rossiyskaya Federatsiya, MPK C12N 1/20, C07K 14/315, C12R 1/01. Shtamm *Enterococcus mundtii*, produtsiruyushhiy substantsiyu peptidnoy prirody s antilisterioznoy aktivnost'yu [Patent 2532227. Russian Federation. MPK C12N 1/20, C07K 14/315, C12R 1/01. Strain *Enterococcus mundtii* producing peptide substance with antilisterial activity]. Hramov VM, Pokhilenko VD, Pereygin VV, Sadikova GT, Kalmantaev TA, Chukina IA, Svetoch EA. Zayavitel' i patentoobladatel' FBUN Gosudarstvennyy nauchnyy tsentr prikladnoy mikrobiologii i biotekhnologii [State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology]. No 2013147136/10; 23.10.2013; opublikovano: 27.10.2014; Bjulleten' No 30, 12 p. In Russian, English summary
21. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 1987;166:368-379. Available at: <http://molbiol.ru/forums/index.php?act=Attach&type=post&id=92824>
22. Gobom J, Schuerenberg M, Mueller M, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Analytical Chemistry*. 2001;73(3):434-438.
23. Kalmantaev TA, Sadikova GT, Pereygin VV, Pokhilenko VD. Bacteriocin-like substance *Bacillus circulans* and way of its production. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2012;2(18):52-65. In Russian, English summary
24. Burianek LL, Yousef AE. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Letters in Applied Microbiology*. 2000;30:193-197. doi: [10.1046/j.1365-2672.2000.00802.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00802.x)
25. Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure. *FEMS Microbiology Review*. 2000;24:86-106. doi: [10.1111/j.1574-6976.2000.tb00534.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00534.x)
26. Eijsink VG, Skeie M, Middelhoven PH, Brurberg MB, Nes IF. Comparative studies of class II a bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64:3275-3281. PMCID: [PMC106721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC106721/)

Received 26 February 2014;

Revised 24 June 2014; 21 November 2014;

Accepted 27 December 2014

Authors info:

Khramov Vladimir M, junior researcher, Biological Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk 142279, Serpukhov distr., Moscow reg., Russian Federation.

E-mail: Khramov-vladimir@yandex.ru

Kalmantaev Timur A, Cand. Sci. (Biol.), junior researcher, Biological Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk 142279, Serpukhov distr., Moscow reg., Russian Federation.

E-mail: kalmantaev@yandex.ru

Sadikova Gulnur T, researcher, Biological Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk 142279, Serpukhov distr., Moscow reg., Russian Federation.

E-mail: Vpokhil003@yandex.ru

Pereygin Vladimir V, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Biological Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk 142279, Serpukhov distr., Moscow reg., Russian Federation.

E-mail: pereygin@obolensk.org

Pokhilenko Viktor D, Dr. Sci. (Tech.), leading researcher, Biological Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk 142279, Serpukhov distr., Moscow reg., Russian Federation.

E-mail: Vpokhil003@yandex.ru