

УДК 615.33

¹А.А. Сапарбекова*, ²Н.Я. Спивак, ¹З.К. Конарбаева,
¹Т.Б. Ногаев, ¹Л.А. Мамаева

¹Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова,
Республика Казахстан, г. Шымкент

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного, Украина, г. Киев

*E-mail: asaparbekova@mail.ru

Изучение бактериоцина, продуцируемого штаммом *Lbm. acidophilus* К-3, выделенного из кумыса

Кумыс продукт молочнокислого и спиртового брожения. Многие молочнокислые бактерии синтезируют антибиотические вещества белково-пептидной природы, имеющие широкий спектр антибактериального действия. Из кумыса селективно, как одного из высокоактивных штаммов по отношению к патогенным бактериям, выделен *Lbm.acidophilus* К-3. Для очистки пептидных антибиотиков, продуцируемый *Lbm.acidophilus* К-3, использовали обращенную фазу высокоэффективного жидкостного хроматографа (Varian Pro Star, Австралия). Подсчет числа аминокислотных остатков в антибактериальном веществе показал содержание 12 аминокислот. Максимальные ИК-спектры показали восемь пиков поглощения в области 998,72, 1132,12; 1674,31; 1794,67; 1851,76; 2832,69; 3257,7 и 3452,54 см⁻¹. Исследования по идентификации вещества, продуцируемого культурой *Lbm. acidophilus* К-3, доказали, что оно относится к антибиотику бактериоцину. Было установлено, что антибактериальное вещество, производимое *Lbm. acidophilus* К-3, стабильно при рН от 4 до 9, а также доказана термостойкость пептидного антибиотика.

Ключевые слова: кумыс, молочнокислые бактерии, антибиотические вещества, бактериоцин, аминокислоты, хроматография, ИК-спектроскопия.

A.A. Saparbekova, N. Spivak, Z.K. Konarbaeva, T.B. Nogaev, L.A. Mamaeva

Study bacteriocin produced by strain *Lbm.acidophilus* К-3 chosen from kumys

Kumis is a product of lactic acid and ethanol fermentations. Many lactic acid bacteria synthesize the antibiotic material of protein-peptide nature, having broad spectrum antibacterial actions. *Lbm.acidophilus* К-3 as high activity strain against pathogenic bacteria was selected from kumys. Reverse-phase high performance liquid chromatography (Varian Pro Star, Australia) was performed for purification peptide antibiotic. Count of the number of amino acids in antibacterial material has shown the contents 12 amino acids. Maximal IR spectra showed eight absorption peaks in the region 998,72, 1132,12; 1674,31; 1794,67; 1851,76; 2832,69; 3257,7 and 3452,54 sm⁻¹. Studies on identifications of the material produced from culture *Lbm acidophilus* К-3 have proved it belonged to bacteriocin antibiotic. Antibacterial material produced by *Lbm acidophilus* К-3 was stable in pH from 4 to 9 it has been determined also term stable of the peptide antibiotic is proved.

Key words: Kumis, lactic acid bacteria, antibiotic material, bacteriocin, amino acids, chromatography, IR spectroscopy.

А.А. Сапарбекова, Н.Я. Спивак, З.К. Конарбаева, Т.Б. Ногаев, Л.А. Мамаева

Қымыздан бөлінген *Lbm. acidophilus* К-3 штаммымен продуцирленетін бактериоцинді зерттеу

Қымыз сүт қышқылды және спирттік ашу өнімі. Көптеген сүт қышқылды бактериялар антибактериялық әсер етудің кең спектрі бар ақуызды пептидті табиғатты антибиотикалық заттарды синтездейді. Патогенді бактерияларға қатысы бойынша жоғарғы белсенді штаммдардың бірі *Lbm.*

acidophilus К-3 кумыздан селективті түрде бөлініп алынды. Пептидті антибиотиктерді тазарту үшін жоғарғы тиімді сұйықтық хроматографтың бағытталған фазасы қолданылды (Varian Pro Star, Австралия). Антибактериялық заттағы аминқышқылдық қалдықтардың санын есептеу көрсеткендей, онда 12 аминқышқылы кездеседі. Максималды ИК спектрлер көрсеткендей, онда сегіз жұтылу биіктігі 998,72; 1132,12; 1674,31; 1794,67; 1851,76; 2832,69; 3257,7 ; және 3452,54 см⁻¹ анықталған. *Lbm. acidophilus* К-3 культурасымен продуцирленетін заттарды анықтауды зерттеу көрсеткендей, олар бактерицин антибиотиктерінен тұрады. Анықталғандай, *Lbm. acidophilus* К-3 өндіретін антибактериялық зат рН 4-тен 9-ға дейінгі аралықта тұрақты, сонымен қатар пептидті антибиотиктің термотұрақтылығы дәлелденді.

Түйін сөздер: қымыз, сүт қышқылды бактериялар, антибиотикалық заттар, бактериоцин, аминқышқылдар, хроматография, ИК-спектроскопия.

Введение

В Казахстане, по оценке медиков, от 75 до 90% граждан в той или иной степени подвержены дисбактериозу – нарушению нормальной кишечной микрофлоры [1]. В связи с этим актуальной становится разработка технологии продуктов питания, способных нормализовать кишечную микрофлору человека и оказывающих регулирующее влияние на организм в целом и его отдельные органы. При этом особое внимание уделяется производству казахских национальных молочных продуктов, имеющих многовековую историю, на базовой основе которых разработаны различные молочные продукты нового поколения с использованием бактериальных заквасок с пробиотическими свойствами. Кумыс – кисломолочный продукт, изготавливаемый из сырого кобыльего молока. Как известно, он имеет высокое диетическое и лечебное значение и рекомендуется для повышения обмена веществ при туберкулезе, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, почек и печени и т.д. В кобыльем молоке содержатся биологически активные белки, обладающие антиканцерогенными, антивирусными, антибактериальными, иммуностимулирующими свойствами [2].

Многие бактерии синтезируют антибиотические вещества белково-пептидной природы, убивающие родственные виды или штаммы или тормозящие их рост, или имеющие более широкий спектр антибактериального действия. Эти вещества с весьма специфическим действием получили название бактериоцинов, биосинтез которых кодируется особыми плазмидами и происходит в большинстве случаев на рибосомах. Бактериоцины – это наиболее высокомолекулярные антибиотики [3]. Считают, что с практической точки зрения эти антибактериальные вещества, действующие на микрофлору избира-

тельно, могут использоваться для нормализации микробного ценоза при некоторых патологиях у человека и животных [4].

Изучение условий образования бактериоцинов представителями некоторых молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides* показало, что на биосинтез бактериоцинов, как и у других биологически активных веществ, оказывают влияние условия культивирования продуцента: состав питательной среды, рН, температура, а также время инкубации продуцента [5-7].

Перспективно применение ряда бактериоцинов, продуцируемых группой молочнокислых бактерий, в пищевой промышленности [8]. Продуценты этих бактериоцинов используются в качестве заквасочной культуры при различных пищевых производствах. Образующийся бактериоцин обеспечивает доминирование нужной микрофлоры и подавление посторонней микрофлоры, что обеспечивает безопасное протекание микробиологических процессов. Например, при производстве сухой колбасы в качестве заквасочной культуры используется *Lactobacillus curvatus*, образующий курвацин, который ингибирует рост близкородственных лактобактерий и условно-патогенных бактерий и обеспечивает этим безопасное протекание биохимических процессов при созревании сухой колбасы [9].

Для получения закваски при изготовлении йогурта с новыми характеристиками использовали *Streptococcus salivarius*, образующий бактериоцин. Описан процесс получения закваски на основе указанной бактерии в сочетании *Lactobacillus delbrueckii*. Отмечено, что при хранении и перевозке продукт не портится. Для предотвращения образования гистамина при производстве сыра в закваску добавляли *Lactococcus lactis* и *E.faecalis*, которые образовывали бактериоцины, подавляющие рост штаммов, выде-

ляющих гистамины. Последние оказались чувствительными к низину и пяти бактериоцинам энтерококкового происхождения [10].

Бактериоцины, полученные из бацилл, могут использоваться для консервации пищевых продуктов [11]. Например, бациллоцин (bacillocin 490) подавляет рост близкородственных *Bacillus* spp. как в аэробных, так и в анаэробных условиях и его бактерицидная активность сохранялась в широком диапазоне pH и, а также в различных пищевых субстратах, включая молоко и сыр. Бактериоцин цереин (cerein 8A) из *B. cereus* 8A подавлял развитие *L.monocytogenes* в молочных продуктах (молоко и мягкий сыр). Добавление 160 АЕ/мл цереина в перегретое молоко приводило к уменьшению на 3 log количества листерий за 14 дней хранения при 4°C [12-15].

Анализ литературных источников показал потенциал использования бактериоцинов в качестве биологических консервантов в технологии пищевых продуктов. Опыт применения бактериоцинпродуцирующих микроорганизмов доказывает необходимость дальнейших исследований культур, способных продуцировать пептидные антибиотики.

Материалы и методы

Исследуемую бактериальную культуру выращивали на среде МРС – среда Мозера-Рогоза-Шарпа (MRS). 10 мл инокулировали бактериальной культуры в течение 48 ч в статическом инкубаторе при 30°C. Бесклеточный фильтрат получали центрифугированием (10000 оборотов в минуту в течение 20 мин при 4°C), с последующим фильтрованием через поры фильтра размером в 0,2 мкм из ацетата целлюлозы. Для очистки антимикробных веществ бактериальную суспензию обрабатывали органическими растворителями, включая изо-амиловый спирт, хлороформ, n-пропанол, гексан, диэтиловый эфир, петролейный эфир, которые были добавлены в соотношении 1:1, затем органическую фазу досушивали под вакуумом, используя роторный испаритель.

Для осаждения пептидного антибиотика использовали сульфат аммония. Пептид антибиотика, продуцируемый исследуемой культурой, обрабатывали сульфатом аммония 60% насыщения. Смеси перемешивали в течение 2 часов при 4°C, а затем центрифугировали при 10000 оборотов в минуту в течение 50 мин при 4°C. Осадок обрабатывали в 25 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера, pH 7,0.

Для очистки пептидных антибиотиков использовали обращенную фазу высокоэффективного жидкостного хроматографа (ОФ-ВЭЖХ) Varian Pro Star, Австралия.

Для правильного выбора подвижной фазы обязательно учитывают pH, состав и концентрацию органического растворителя. Подвижная фаза состояла из буферного раствора, содержащего воду, 0,1% трифторуксусной кислоты и ацетонитрила. Основным ионным модификатором в ОФ ВЭЖХ является трифторуксусная кислота, которая легко удаляется из элюатов выпариванием, хорошо растворяет пептиды, а также УФ-прозрачна. В качестве органического компонента подвижной фазы использовали ацетонитрил, т.к. он прозрачен в УФ-области до 200 нм, обладает низкой вязкостью, высокой летучестью, следовательно, позволяет легко удалить его из собранной фракции элюата, а также характеризуется хорошей селективностью.

Образцы наносили на колонку C18 (Hypersil ODS), разделенных линейным двухфазным градиентом от 20 до 80% ацетонитрила в течение 30 мин при скорости потока 1,0 мл/мин.

Разделение пептидных соединений проводили посредством градиентного элюирования, где концентрация органического растворителя увеличивается с течением времени. Исследуемые вещества элюируются в порядке увеличения гидрофобности [16].

Идентификацию и количественное определение анализируемых аминокислот проводили с помощью установленного программного обеспечения «МультиХром для Windows».

Для определения качественного и количественного состава пептидного антибиотика использовали метод инфракрасной спектроскопии. В работе использовали ИК-спектрометр Specord 75-JR.

Результаты и их обсуждение

Экспериментальная работа по выделению и анализу пептидного антибиотика проведена в Испытательной региональной лаборатории инженерного профиля (ИРЛИП) при Южно-Казахстанском государственном университете имени М. Ауэзова, г. Шымкент.

Lbm.acidophilus К-3 селективно как одного из высокоактивных штаммов выделен из кумыса, производимого в крестьянском хозяйстве «Сапа», Южно-Казахстанской области. Это грамположительные палочки со слегка закругленными концами, расположенные одиночно,

парами или короткими цепочками из 3-5 сегментов, длиной 10-15 мкм, шириной 1,2-1,5 мкм.

На плотных питательных средах *Lbm. acidophilus* обычно образуют матовые выпуклые колонии с цельным, ровным краем, поверхностных пленок на колониях не образует. Усваивает мальтозу, фруктозу, сахарозу, лактозу, глюкозу, галактозу, не усваивает арабинозу и сорбит, а также не ферментирует целлобиозу, рибозу и крахмал. Проявляет высокую кислотоустойчивость, предельное кислотообразование в молоке составляет 180°Т, устойчивость к низким рН близким к 3, способен к росту в среде содержащей 0,5% желчных солей. Оптимальный рост наблюдается при 28-34°С, возможен рост в интервале температур 10-45°С.

Наиболее высокую антагонистическую активность проявляет по отношению к *B. mycooides*, *S. aureus* и *B. subtilis*. Данная же культура обладает способностью подавлять и родственную ей культуру *Lbm. acidophilus* КК-31, что указывает на способность данного штамма к образованию бактериоцина (таблица 1).

Таблица 1 – Средний диаметр зоны ингибирования (мм), вызванного соответствующими тестируемыми организмами

Тестируемый организм	Зоны ингибирования, мм
<i>Escherichia coli</i>	23,8±0,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	20,5±0,5
<i>Bacillus mycooides</i>	29,8±0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,4±0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	27,9±0,5
<i>Bacillus subtilis</i>	29,4±0,5

Для выбора растворителя и извлечения пептида антибиотика, продуцируемого *Lbm. acidophilus* К-3, были испытаны различные органические растворители. Было установлено, что экстракция с полярными растворителями, такими, как гексан, диэтиловый эфир и петролейный эфир, не приводят к выделению антибактериального вещества, полученного на водной фазе к органической фазе, в то время как экстракция хлороформа полностью разрушила активность антибактериального вещества. Однако при использовании различных спиртов, таких, как п-пропанол и изоамиловый спирт, в процессе экстракции, антибактериальное веще-

ство из водной фазы перешло в органическую фазу (таблица 2).

Таблица 2 – Экстракция антибактериального вещества органическими растворителями

Органический растворитель	Средний диаметр зоны ингибирования (мм)	
	органическая фаза, мм	водная фаза, мм
хлороформ гексан	-	0,0
петролейный эфир	-	0,0
диэтиловый эфир	-	0,0
п-пропанол изоамиловый спирт	0,0	13,0
хлороформ гексан	10,0	10,0
петролейный эфир	21,0	21,0

Для осаждения пептидного антибиотика, продуцируемого *Lbm. acidophilus* К-3, его обрабатывали сульфатом аммония 60% насыщения. Смеси перемешивали в течение 2 часов при 4°С, а затем центрифугировали при 10000 оборотов в минуту в течение 50 мин при 4°С. Осадок обрабатывали в 25 мл 0,05М калий-фосфатного буфера, рН 7,0. Количественное определение антибактериальной активности привело к увеличению антибактериальной активности по сравнению с культурой супернатанта. С другой стороны, оценка общего белка по методу Лоури привела к снижению общего содержания белка.

Во время процедуры очистки каждый этап приводит к значительной потере концентрации белка, в то время как антибактериальная активность увеличивается. Фракции были отобраны из обращенной фазы (ОФ) ВЭЖХ для определения антибактериальной активности, затем обрабатывали активную фракцию и оценивали общую концентрацию белка. Активную фракцию очищали с помощью последующей хроматографии с обращенной фазой, после чего была определена его аминокислотная последовательность. Стадии частичной очистки пептидного антибиотика представлены в таблице 3.

Определение аминокислотного состава пептида проводили после полного гидролиза вещества, в ходе которого все пептидные связи разрушились, и пептид превратился в смесь аминокислот. Полученный гидролизат подвергали количественному анализу с помощью ионообменной хроматографии и таким образом устано-

вили, какие аминокислоты и в каких соотношениях входят в исследуемый пептид.

Таблица 3 – Осаждение и очистка пептидного антибиотика, продуцируемый *Lbm.acidophilus* К-3

Стадии очистки	Объем (мл)	Зона ингибирования, мм	Концентрация белка, мг/мл*
Культура супернатанта	1000	23,8	4.6
Сульфат аммония	20	35	2.5
ВЭЖХ	1.0	50	0.13

Примечание: Концентрацию белка определялась по методу Лоури

Для очистки пептидных антибиотиков использовали обращенную фазу высокоэффективного жидкостного хроматографа (ОФ-ВЭЖХ). Метод показал себя чрезвычайно ценным для анализа пептидного антибиотика, так как пептидные антибиотики, как правило, хорошо растворимы в водных подвижных фазах и ограниченно растворимы в большинстве неполярных растворителей [16-18]. Использованные хроматографические смолы (в основе которых лежит кремний) имели форму мельчайших сфер от 3 до 10 мкм в диаметре, которые были упакованы в специальный чехол и образовывали гомогенную колонку. Такие колонки для ВЭЖХ обеспечивают высокий уровень разрешения. Поскольку частицы носителя в колонках для ВЭЖХ упакованы очень плотно, в отсутствие высокого давления скорость потока через них незначительна. По этой причине такие колонки обычно помещают в стальные цилиндры, соединенные со сложной системой насосов и шлангов, которые обеспечивают необходимое для высокой скорости протока давление.

ОФ ВЭЖХ является важнейшим методом разделения пептидов, характеризующимся высокой скоростью разделения, воспроизводимостью результатов, возможностью дифференцировать пептиды с разницей в одну аминокислоту, а также и использованием малого объема растворителей.

Селективность и качество анализа пептидов в обращено-фазовой ВЭЖХ зависит от правильного выбора подвижной и неподвижной фаз. В качестве неподвижной фазы использовали мелкие частицы силикагеля диаметром 5 мкм с привитыми углеводородными цепями.

При хроматографировании пептидов выбор обращенной фазы определяется размерами и гидрофобностью пептидов: для пептидов с короткой цепью, гидрофильных пептидов используют фазы С8 (н-октил) и С18 (н-октадецил), для крупных и гидрофобных – фазы С3 (триметил- или диметилпропил), С4 (н-бутил), С6 (фенил). В данном анализе использовали колонки на основе диоксида кремния С4 (н-бутил)-С18 (н-октадецил) ODS как наиболее часто применяемые [19].

Для правильного выбора подвижной фазы обязательно учитывают рН, состав и концентрацию органического растворителя. Подвижная фаза состояла из буферного раствора, содержащего воду, 0,1% трифторуксусной кислоты и ацетонитрила. Основным ионным модификатором в ОФ ВЭЖХ является трифторуксусная кислота, которая легко удаляется из элюатов выпариванием, хорошо растворяет пептиды, а также УФ-прозрачна. В качестве органического компонента подвижной фазы использовали ацетонитрил, т.к. он прозрачен в УФ-области до 200 нм, обладает низкой вязкостью, высокой летучестью, следовательно, позволяет легко удалить его из собранной фракции элюата, а также характеризуется хорошей селективностью.

Образцы наносили на колонку С18 (Hypersil ODS), разделенными линейным двухфазным градиентом от 20 до 80% ацетонитрила в течение 30 мин при скорости потока 1,0 мл / мин.

Разделение пептидных соединений проводили посредством градиентного элюирования, где концентрация органического растворителя увеличивается с течением времени. Исследуемые вещества элюируются в порядке увеличения гидрофобности [16] (рисунок 1).

Анализ хроматограммы пептидного антибиотика, продуцируемого *Lactobacterium acidophilus* К-3, показал наличие 12 пиков, соответствующих различным аминокислотам (таблица 4), а также восьми неидентифицированных пиков, два из которых, по нашему предположению, являются остатками аминокислот, поврежденных в процессе их извлечения, шесть указывают на возможное наличие примесей. Из 12 идентифицированных аминокислот наибольшее содержание гистидина (процентное соотношение 32) и глицина (процентное соотношение – 22,75), наименьшее содержание треонина (процентное соотношение – 1,88) и лейцина (процентное соотношение – 1,84).

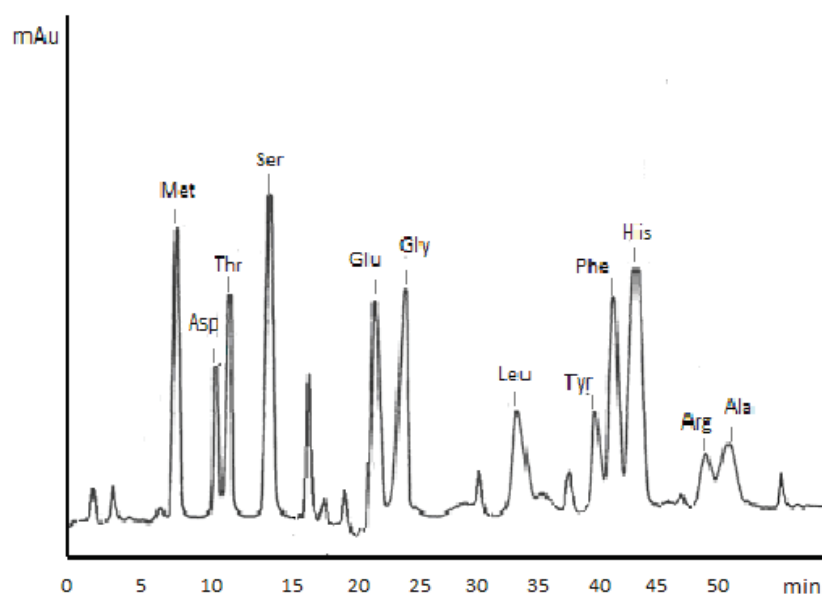


Рисунок 1 – Хроматограмма пептидного антибиотика, продуцируемого *Lactobacterium acidophilus* K-3

Таблица 4 – Аминокислотный состав пептидного антибиотика, продуцируемого *Lbm. acidophilus* K-3

№	Время удерживания, мин	Аминокислоты	Процентное соотношение
1	7,57	Метионин	2,64
2	10,25	Аспарагиновая кислота	2,68
3	11,44	Треонин	1,88
4	13,59	Серин	2,44
5	22,20	Глутаминовая кислота	11,73
6	24,12	Глицин	22,75
7	34,32	Лейцин	1,84
8	40,02	Тирозин	2,94
9	42,25	Фенилаланин	4,59
10	43,20	Гистидин	31,95
11	49,53	Аргинин	6,89
12	51,22	Аланин	7,67

Для определения качественного и количественного состава пептидного антибиотика использовали метод инфракрасной спектроскопии. Этот метод анализа основан на записи инфракрасных спектров поглощения вещества. Поглощение веществом в области инфракрасного излучения происходит за счёт колебаний атомов в молекулах. Колебания подразделяются на валентные (когда в ходе колебания изменяются расстояния между атомами) и колебательные (когда в ходе колебания изменяются углы меж-

ду связями). Переходы между различными колебательными состояниями в молекулах квантованы, благодаря чему поглощение в ИК-области имеет форму спектра, где каждому колебанию соответствует своя длина волны. Понятно, что длина волны для каждого колебания зависит от того, какие атомы в нём участвуют, и кроме того, она мало зависит от их окружения. То есть для каждой функциональной группы (C=O, O-H, CH₂ и пр) характерны колебания определённой длины волны, точнее говоря, даже для каждой группы характерен ряд колебаний (соответственно и полос в ИК-спектре). Именно на этих свойствах ИК-спектров основана идентификация соединений по спектральным данным [20].

Различные молекулы, содержащие одну и ту же атомную группировку, дают в ИК-спектре полосы поглощения в области одной и той же характеристической частоты. Характеристические частоты дают возможность по спектру установить конкретные группы атомов в молекуле и тем самым определить качественный состав вещества и строение молекул. Например, полосы в области 3000-3600 см⁻¹ могут быть приписаны только O-H- или N-H- связям, полосы в области 2800-3000 см⁻¹ – связям C-H, появление полосы в области 3300-3500 см⁻¹ характерно для NH₂ групп.

В работе использовали ИК-спектрометр Specord 75-JR. Возможности прибора позволяют проводить сканирование в широком

диапазоне ИК-спектра с малым шагом сканирования. Кроме того, в программном обеспечении прибора реализована возможность поиска и идентификации вещества по ИК-спектрам с помощью библиотек ИК-спектров. Идентификации в данном случае проводится программным обеспечением прибора и основана, по всей видимости, на количественном обсчёте и сравнении ИК-спектров.

Спектроскопические характеристики: спектральный анализ очищенного пептидного антибиотика, продуцируемый *Lbm. acidophilus* К-3,

максимальные ИК-спектры показали восемь пиков поглощения в области 998,72; 1132,12; 1674,31; 1794,67; 1851,76; 2832,69; 3257,7 и 3452,54 см⁻¹ (рисунок 2).

Чистый пептид с антибактериальным действием был проверен качественными реакциями на функциональные группы белков и аминокислот, биуретовой реакцией на пептидные группы (реакция Пиотровского); нингидриновой реакцией на аминогруппу, нитпруссидной реакцией на серосодержащую аминокислоту и т.д., давшие положительные результаты реакций.

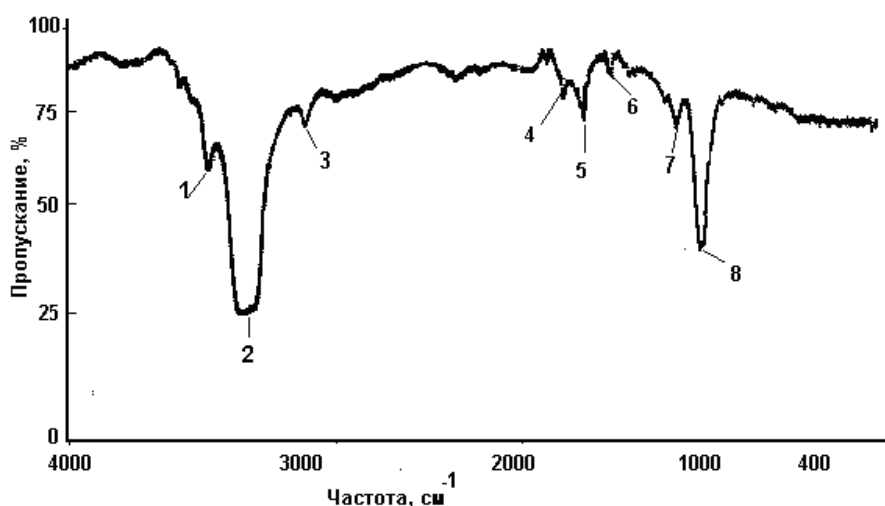


Рисунок 3 – ИК-спектр пептидного антибиотика, продуцируемый *Lactobacterium acidophilus* К-3

Устойчивость к рН: пептидного антибиотика определяли изменением кислотности-щелочности раствора, для чего очищенный пептид антибиотика доводили до рН 2,4,6,8,10 и 12 соляной кислотой и гидроксидом натрия, инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре. В результате было обнаружено, что антибактериальное вещество, производимое *Lbm. acidophilus* К-3, стабильно при рН от 4 до 9.

Термостойкость пептидного антибиотика определяли с помощью кишечной палочки

как организм-индикатор. Активность антибактериального вещества, производимого *Lbm. acidophilus* К-3, осталась неизменной после нагревания при 121°C в течение 10 мин.

На основании проведенных исследований по идентификации антибиотика и ввиду сравнительного анализа свойств пептидного антибиотика можно констатировать, что антибактериальный агент, выделенный из культуры *Lbm. acidophilus* К-3, принадлежит к антибиотику бактериоцину.

Литература

- 1 Кушугулова А.Р., Рахимова С.Е., Бекболатова Ж.Т., Оралбаева С.С., Садуахасова С.А., Пернекулова А.Ж. Дифференциация пробиотических микроорганизмов на основе молекулярных методов // Материалы научно-практич. конф. молодых ученых Казахской государственной медицинской академии. – Алматы, 2006. – С. 38-39.

- 2 Сыман К.Ж., Сайдуддина А.А. Белки кобыльего и верблюжьего молока // Хабаршы Вестник КазНУ. – Алматы, 2003. – С. 119-123.
- 3 Егоров Н.С., Баранова И.П. Бактериоцины. Образование, свойства, применение // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – №6. – С. 33-40.
- 4 Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Бактериоцины: их биологическая роль и тенденции применения // «Исследовано в России». – М., 2011. – С. 164-198.
- 5 Yang R., Ray B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria // Food microbiology. – 1994. – Vol. 4. – P. 281-291.
- 6 Андреева-Ковалевская Ж.И., Солонин А.С., Синева Е.В., Терновский В.И. Пороформирующие белки и адаптация организмов к условиям окружающей среды // Успехи биологической химии. – 2008. – Т. 48. – С. 267–318.
- 7 Marshall S. H., Arenas G. Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and potential for applied biotechnology // Electronic Journal of Biotechnology. – 2003. – Vol. 6. – № 3. – P. 271–284.
- 8 Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin // Antonie Van Leeuwenhouk. – 1996. – Vol.69(2). – P. 193-202.
- 9 Sasaki M., Ishii S., Yamauchi Y. et al. Lactic acid bacteria, antibacterial substance, produced by the bacteria, fermented milk starter containing the bacteria and process for producing fermented milk by using the starter. Пат 5338682 США, МКИ5, с 12p/04 с 12P, 7/56 от 1994 г.
- 10 Joosten N., Nunes M. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria // Appl Environ Microbiol. – 1996. – 62: 4. – P. 1178-1181.
- 11 Sharma N, Attri A & Gautam N. Purification and Characterization of Bacteriocin Like Substance Produced from *Bacillus lentus* with Perspective of a New Biopreservative for Food Preservation // Pak J Sci Ind Res. – 2009. – Vol. 52. – P. 191–199.
- 12 Sharma, N., G. Kapoor, N. Gautam and B. Neopaney. Characterization of a partially purified bacteriocin of *Bacillus* sp. MTCC 43 isolated from Rhizosphere of radish (*Raphanus sativus*) & its application as a potential food biopreservative // J. Scient. Indust. Res. – 2009. – Vol.68. – P. 881-886.
- 13 Martirani L, Varcamonti M, Naclerio G and Maurilio De Felice. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis* // Microb. Cell Fact. – 2002. – Vol. 1. – P. 1-5.
- 14 Bizani D, Dominguez APM & Brandelli A. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A // Lett Appl Microbiol. – 2005. – Vol. 41. – P. 269–273.
- 15 Bizani D, Morrissy JAC, Domingue APM, Brandelli A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin – like peptide cerein 8A // Int J Food Microbiol. – 2008. – Vol. 121. – P. 229-233.
- 16 HPLC of peptides and proteins: methods and protocols / Edited by Marie-Isabel Aguilar. Humana Press Inc. – 2004.
- 17 Vydac G. The Handbook of analysis and purification of peptides and proteins by reversed-phase HPLC, third edition. – 2002. – 450 p.
- 18 Carr D. A guide to the analysis and purification of proteins and peptides by reversed-phase HPLC: www.ace-hplc.com
- 19 Лотшпайх, Ф., Хеншен, А. Аминокислоты, пептиды, белки. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии: пер. с англ. / под ред. А. Хеншен. – М.: Мир, 1988. – С. 216.
- 20 Larkin P. J. Infrared and raman spectroscopy: principles and spectral interpretation. – Elsevier. – 2011. – 230 p.

References

- 1 Kushugulova A.R., Rahimova S.E., Bekbolatova Zh.T., Oralbaeva S.S., Saduahasova S.A., Pernekulova A.Zh. Differenciacija probioticheskikh mikroorganizmov na osnove molekulyarnykh metodov // Materialy nauchno-praktich. konf. molodykh uchenykh Kazahskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii. – Алматы, 2006. – С. 38-39.
- 2 Syman K.Zh., Sajdulidina A.A. Belki kobyly'ego i verbljuzh'ego moloka // Habarshy Vestnik KazNU. – Алматы, 2003. – С. 119-123.
- 3 Egorov N.S., Baranova I.P. Bakteriociny. Obrazovanie, svojstva, primenenie // Antibiotiki i himioterapija. – 1999. – №6. – С. 33-40.
- 4 Pohilenko V.D., Perelygin V.V. Bakteriociny: ih biologicheskaja rol' i tendencii primenenija // «Issledovano v Rossii». – М., 2011. – С. 164-198.
- 5 Yang R., Ray B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria // Food microbiology. – 1994. – Vol. 4. – P. 281-291.
- 6 Andreeva-Kovalevskaja Zh.I., Solonin A.S., Sineva E.V., Ternovskij V.I. Poroformirujushhie belki i adaptacija organizmov k uslovijam okružhajushhej sredy // Uspėhi biologicheskoi himii. – 2008. – Т. 48. – С. 267–318.
- 7 Marshall S. H., Arenas G. Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and potential for applied biotechnology // Electronic Journal of Biotechnology. – 2003. – Vol. 6. – № 3. – P. 271–284.
- 8 Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin // Antonie Van Leeuwenhouk. – 1996. – Vol.69(2). – P. 193-202.
- 9 Sasaki M., Ishii S., Yamauchi Y. et al. Lactic acid bacteria, antibacterial substance, produced by the bacteria, fermented milk starter containing the bacteria and process for producing fermented milk by using the starter. Пат 5338682 SShA, МКИ5, с 12p/04 с 12P, 7/56 от 1994 г.
- 10 Joosten N., Nunes M. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria // Appl Environ Microbiol. – 1996. – 62: 4. – R. 1178-1181.

- 11 Sharma N, Attri A & Gautam N. Purification and Characterization of Bacteriocin Like Substance Produced from *Bacillus lentus* with Perspective of a New Biopreservative for Food Preservation // *Pak J Sci Ind Res.* – 2009. – Vol. 52. – P. 191–199.
- 12 Sharma, N., G. Kapoor, N. Gautam and B. Neopaney. Characterization of a partially purified bacteriocin of *Bacillus* sp. MTCC 43 isolated from Rhizosphere of radish (*Raphanus sativus*) & its application as a potential food biopreservative // *J. Scient. Indust. Res.* – 2009. – Vol.68. – P. 881-886.
- 13 Martirani L, Varcamonti M, Naclerio G and Maurilio De Felice. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis* // *Microb. Cell Fact.* – 2002. – Vol. 1. – P. 1-5.
- 14 Bizani D, Dominguez APM & Brandelli A. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A // *Lett Appl Microbiol.* – 2005. – Vol. 41. – P. 269–273.
- 15 Bizani D, Morrissy JAC, Domingue APM, Brandelli A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin – like peptide cerein 8A // *Int J Food Microbiol.* – 2008. – Vol. 121. – P. 229-233.
- 16 HPLC of peptides and proteins: methods and protocols / Edited by Marie-Isabel Aguilar. Humana Press Inc. – 2004.
- 17 Vydac G. The Handbook of analysis and purification of peptides and proteins by reversed-phase HPLC, third edition. – 2002. – 450 p.
- 18 Carr D. A guide to the analysis and purification of proteins and peptides by reversed-phase HPLC: www.ace-hplc.com
- 19 Lotshpajh, F., Henshen, A. Aminokisloty, peptidy, belki. Vysokoeffektivnaja zhidkostnaja hromatografija v biohimii: per. s angl. / pod red. A. Henshen. – M.: Mir, 1988. – S. 216.
- 20 Larkin P. J. Infrared and raman spectroscopy: principles and spectral interpretation. – Elsevier. – 2011. – 230 p.