

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М. В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

СУЛЬТИМОВА
Татьяна Доржиевна

ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИВНЫХ БАКТЕРИОЦИНОБРАЗУЮЩИХ ЛАКТОКОККОВ И
ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Специальность 03.00.07 – Микробиология
03.00.23 - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2006.

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор **Александр Иванович Нетрусов** (03.00.23 – биотехнология)

кандидат биологических наук **Лидия Григорьевна Стоянова** (03.00.07 – микробиология)

Официальные оппоненты:

доктор технических наук **Нина Васильевна Нефедова**

кандидат биологических наук **Наталья Алексеевна Загустина**

Ведущее учреждение: **ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (ВНИМИ РАСХН).**

Защита диссертации состоится 19 декабря 2006 г. в 15 ч 30 мин на заседании диссертационного совета Д 501.001.21 при Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, корп. 12, биологический факультет, аудитория 3А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Автореферат разослан «16»ноября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н. Ф. Пискункова

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

В последние годы наблюдается возросший интерес к бактериоцинообразующим лактококкам *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, которые вследствие своей безвредности, высокой ферментативной и антимикробной активности являются объектом фундаментальных исследований по созданию новых активных пробиотиков и биологических консервантов. Одним из главных аспектов этого интереса является возросший спрос потребителей к качеству продуктов питания и их безопасности для здоровья, поскольку широко используемые химические консерванты, увеличивающие срок хранения продуктов питания, вызывают опасения (Ross et al., 1999; Konings et al., 2000; O'Sullivan, 2002). С точки зрения специалистов, молочнокислые бактерии, называемые пробиотиками, участвуют во всех физиологических процессах организма. Сегодня использование пробиотических продуктов, способных восстанавливать микробиоту желудочно-кишечного тракта, может вытеснить потребление огромного количества химических лекарственных препаратов (Шаблин, 2001; Temmgeman, 2003; Киркман, 2004; Бондаренко и др., 2006).

В настоящее время молочнокислые стрептококки по систематическому положению выделены из группы микроорганизмов рода *Streptococcus*, включающего и патогенные формы, и под новым названием *Lactococcus* отнесены к категории «GRAS», куда относятся микроорганизмы, не вызывающие инфекционных заболеваний человека и животных. Наряду с молочной кислотой установлена роль других метаболитов молочнокислых бактерий (МКБ), ингибирующих развитие бактерий: перекиси водорода, уксусной и бензойной кислот, ацетоина, диацетила. Однако ведущее место в объяснении явления антагонизма МКБ отводится специфическим антибиотическим веществам белковой природы – бактериоцинам (Jack et al., 1995; Parente, Ricciardi, 1999). Синтез бактериоцинов штаммоспецифичен и зависит от активности продуцента и условий его культивирования (Biswas et al., 1991; De Vuyst, Vandamme, 1993; Leroy et al., 2001).

Бактериоцины, синтезируемые лактококками, отличаются по молекулярной массе, аминокислотному составу, биологическому действию на ряд микроорганизмов, включая патогенные формы: листерии, бациллы и стафилококки, развивающиеся в продуктах питания в процессе хранения и выделяющие токсины, что является причиной ряда заболеваний. Наиболее изученным и широко используемым в качестве биологического консерванта является бактериоцин низин, известный как полипептидный антибиотик низин «*Nisaplin*»

(фирма “*Aplin & Barrett, Ltd*”, Англия). Его используют при приготовлении консервов и пресервов, поскольку при этом снижается длительность термообработки и, следовательно, сохраняются биологическая и пищевая ценности продуктов (Chang et al., 1989; Nes et al., 1996; Ross et al., 2002). Бактериоцинообразующие культуры также находят широкое применение при изготовлении молочных продуктов, колбасных изделий и мясных консервов (O'Sullivan, 2002; Krockel, 2002).

Цель и задачи исследования.

Целью исследования являлось выделение и идентификация бактериоцинообразующих штаммов лактококков из молока и молочных продуктов, и их использование в качестве биоконсервантов.

Для выполнения поставленной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выделение бактериоцинообразующих штаммов из коровьего молока территориальных зон и национального кисломолочного продукта курунга, их идентификация.
2. Изучение физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов.
3. Регуляция синтеза бактериоцина составом компонентов ферментационной среды и рН-статированием.
4. Выделение бактериоцина из наиболее перспективного штамма лактококка и изучение его физико-химических свойств.
5. Применение бактериоцинообразующего лактококка в качестве биологического консерванта.

Научная новизна работы

1. Из молока разных территориальных зон России и кисломолочного продукта выделены новые бактериоцинообразующие штаммы с активностью, значительно превышающей активность природных штаммов.
2. Штаммы идентифицированы с использованием классических микробиологических методов и генотипического метода, основанного на анализе сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, как *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК новых штаммов депонированы в базу данных GenBank под следующими номерами: DQ255951 - DQ255954.
3. Выделен активный штамм 194, синтезирующий комплекс антибиотических веществ широкого спектра действия, в том числе и фунгицидного действия, что является

неизвестным свойством для вида *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

4. Оптимизирована ферментационная среда, позволяющая при сниженном содержании фосфатов повысить уровень образования бактериоцина за счет замены углеводного компонента, а стабилизация уровня pH среды в процессе культивирования позволила повысить уровень активности на 58,5% (6500 МЕ/мл).

5. Проведены исследования по выделению антибиотического комплекса и изучению его компонентного состава. Установлено, что выделенные компоненты не имеют аналогов в компьютерной базе данных биологически-активных веществ.

6. Проведены исследования по использованию штамма 194 для обеззараживания поверхности сырокопченых колбас.

7. Проведена идентификация гриба *Aspergillus repens*, выделенного с поверхности зараженных сырокопченых колбас.

Практическая значимость

Выделенные штаммы дополнили коллекцию активных бактериоцинообразующих культур. Изучена диссоциация продуцента, что облегчает его селекцию при использовании в промышленном производстве. Оптимизирован процесс биосинтеза бактериоцина. Разработан лабораторный регламент на синтез бактериоцина *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамм 194.

Проведены исследования по использованию активного бактериоцинообразующего штамма 194 для увеличения сроков хранения сырокопченых колбас (Акт испытания бактериоцинпродуцирующего штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 от 16.06.2006 г.). Проведена идентификация плесневого гриба, вызывающего порчу сырокопченых колбас при хранении.

Апробация результатов

Результаты диссертационной работы были представлены и доложены на различных конференциях: на Международном конгрессе “Poverty Food & Health in Welfare” (Lisbon, 2003), XI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2004” (Москва, 2004), 19-ом Международном симпозиуме ICFMH – FOOD MICRO 2004 (Slovenia, 2004), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Биотехнология микробов» (Москва, 2004), Молодежной школе-конференции «Актуальные проблемы современной микробиологии» (Москва, 2005), Всероссийском симпозиуме с международным участием “Автотрофные микроорганизмы” памяти академика РАН Е. Н. Кондратьевой (Москва, 2005), 10-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2006).

Положения, выносимые на защиту

1. Выделение и идентификация новых штаммов бактериоцинообразующих лактококков из разных территориальных зон России.
2. Оптимизация синтеза бактериоцина компонентным составом ферментационной среды и рН-статированием.
3. Выделение и изучение компонентного состава нового бактериоцина.
4. Использование нового перспективного штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 в качестве биологического консерванта при хранении колбасных изделий.
5. Идентификация грибной микрофлоры с поверхности зараженных колбасных изделий.

Публикации

По материалу диссертации было опубликовано 10 печатных работ.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, их обсуждения, выводов, списка литературы (212 наименований), приложений, которые включают лабораторный регламент на процесс синтеза бактериоцина *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамм 194 и акт испытания бактериоцинообразующего штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 от 16.06.2006 г. Работа изложена на 168 страницах машинописного текста, включает 17 таблиц и 22 рисунка.

Содержание работы

Материалы и методы исследования

Для выполнения поставленных цели и задач использовали следующие материалы: молоко из разных территориальных зон России (городов Москвы, Клина, Улан-Удэ) и бурятский национальный кисломолочный лечебно-профилактический напиток курунга.

Выделение активных бактериоцинообразующих штаммов из молока проводили поэтапно: сначала были выделены кислотообразующие мезофильные, а затем бактериоцинообразующие лактококки (Стоянова и др., 2006). При выделении лактококков из курунги проводили дифференциацию молочнокислых бактерий и дрожжей, составляющих микробиоту курунги: 5% испытуемого материала высевали в жидкую среду МРС следующего состава (%): гидролизат казеина – 1,0; глюкоза – 2,0; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 0,2; дрожжевый экстракт – 0,5; ацетат Na – 0,5; $MgSO_4 \cdot H_2O$ – 0,02; $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 0,005 с добавлением 2,5 мл 0,7% раствора цистеина, 0,1 мл 0,1% сорбиновой кислоты, 0,1 мл Твин-80

и параллельно на среду Сабуро для выращивания дрожжей, содержащую (%): глюкоза – 4,0; пептон – 1,0; агар – 1,8 и 0,01 левомецетина.

Экстракцию бактериоцина из культуральной жидкости проводили смесью ацетон:уксусная кислота:вода в соотношении 5:1:4.

Антибиотическую активность определяли методом диффузии в агар с измерением зоны подавления роста тест-культуры *Bacillus coagulans* в мм (Егоров, 2004).

Определение молочной кислоты в культуральной жидкости проводили методом титрования (Степаненко, 2005).

Идентификацию молочнокислых микроорганизмов осуществляли на основании морфологических, культуральных, физиолого-биохимических признаков в соответствии с определителем Bergy (2002) и с помощью генотипического метода, основанного на анализе сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК.

Молекулярно-биологические методы.

Осаждение и промывание биомассы, а также выделение нативной хромосомной ДНК проводили, как описано ранее (Лысенко и др., 2001). Для экспериментов по гибридизации ДНК экстрагировали и очищали по методу Мармура (Marmur, 1961). Плазмидную ДНК выделяли по щелочной методике (Anderson, McKay, 1983). Нуклеотидный состав ДНК определяли методом термической денатурации (Owen et al., 1969). Уровень ДНК-ДНК гибридизации определяли методом оптической реассоциации (De Leu et al., 1970). Рестрикцию плазмидной и геномной ДНК проводили по общепринятым методикам (Маниатис и др., 1984) с использованием эндонуклеаз рестрикции *SmaI*, *PstI*, *Hind* фирмы «Fermentas», согласно рекомендациям производителя. Электрофорез плазмидной ДНК проводили в агарозном геле в ТБЕ-буфере с использованием агарозы фирмы «Sigma» и «Хеликон» (Маниатис и др., 1984), при напряжении электрического поля 15 В/см, с использованием маркеров ДНК фирмы «Fermentas». Пульс-гель электрофорез геномной ДНК проводили в 1% агарозном геле «Sigma», при напряжении поля 6 В/см в 0,5 x TBE при 14° С в аппарате CHEF-DRIII фирмы «BioRad». Выделение тотальной ДНК для полимеразно-цепной реакции проводили с помощью набора для выделения ДНК Wizard Genomic DNA Purification Kit фирмы «Promega», согласно рекомендациям производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием реактивов фирмы «Fermentas», праймеров, специально подобранных нами и синтезированных фирмой «Синтол», с использованием амплификатора «Perkin Elmer». Компьютерный анализ подбора праймеров проводили с

использованием компьютерных программ: NSBI Blast2 – определение гомологии при изучении сиквенсов с соответствующих праймеров, Oligo 6.31 – основной расчёт характеристик ПЦР, возможности образования праймерами дуплексов и вторичных структур, определение мест неспецифического праймирования на матрице, Oligonucleotide Properties Calculator – определение температуры отжига праймеров и их % GC состава. Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК проводили в агарозном геле в ТБЕ–буфере с использованием агарозы фирмы “Sigma”, при напряжении электрического поля 15 В/см, с использованием маркеров ДНК фирмы «Fermentas». Выделение и очистку ДНК из агарозного геля проводили с использованием набора для очистки амплифицированной ДНК фирмы «Sigma» (США), согласно рекомендациям фирмы-производителя. Секвенирование очищенных фрагментов генов 16S рРНК проводили по методу Сэнгера (Sanger et al., 1977), используя автоматический секвенатор Beckman Coulter. Для определения частичной нуклеотидной последовательности гена проводилось с использованием праймера 1F.

Филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК проводили, исходя из анализа результатов секвенирования с помощью компьютерных программ Vector NTI: ContigExpress, AlignX. Сравнительный анализ и поиск гомологичных последовательностей проводили по базе NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Фенотипическое сходство нуклеотидных последовательностей (400 п.н.) генов 16S рРНК изучаемых штаммов лактококков: 115, 229, 194, МГУ устанавливали в сравнении с референтными штаммами: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* AB118035, AB118037, AB118033, AB118034, AB100798, AB100795, AY675242, *L. lactis* subsp. *cremoris* AB100792, полученных из базы данных NCBI (Stevens et al., 1991).

Ферментативную активность в отношении потребления ряда углеводов, проводили по методу «пестрого ряда».

Потребность выделенных штаммов в ростовых компонентах определяли по методу Ладерберга. Изучали влияние 20 аминокислот, 5 витаминов, пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в разных сочетаниях в среды культивирования, а методом дробного исключения определяли потребность в отдельных ростовых компонентах, способных включаться в метаболизм лактококков и синтез бактериоцина (Стоянова, Егоров, 2000).

Антимикробный спектр действия определяли на разные группы микроорганизмов и грибов, используя в качестве стандартов низин, левомицетин и нистатин. В качестве тест-культур использовали микроорганизмы музея кафедры микробиологии МГУ.

Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом с использованием дисков, пропитанных антибиотиком в концентрациях 10 - 30 мкг. (Галкина, 1990; Стоянова, Егоров, 1999).

Изучали диссоциацию штамма 194 на агаровой среде, приготовленной на основе ферментационной среды следующего состава (%): NaCl- 0,2; K_2HPO_4 – 2,0; MgSO_4 – 0,02; глюкоза - 1,0; дрожжевой автолизат, содержащий 35-40 мг% азота аммония (Баранова, 1974). Для этого проводили рассев бактериальной суспензии с последующим отбором колоний разной морфологии (Милько, 1991). Выделенные колонии подращивали в ферментационной среде и определяли их антибиотическую активность методом диффузии в агар с последующим пересчетом по стандартным растворам низина, левомецетина, нистатина. В качестве тест-культур использовали: для низина - *Bacillus coagulans*, левомецетина - *Escherichia coli*, для нистатина – *Aspergillus niger*.

Регуляцию синтеза бактериоцина изучали по влиянию компонентов ферментационной среды на биосинтез бактериоцина. Эксперимент проводили по схеме методом изменения количества или дробного исключения составных компонентов среды: уменьшения содержания фосфатов в виде K_2HPO_4 от 2,0 до 0,5%, увеличение содержания или замена углеводного компонента, исключения дрожжевого автолизата, являющегося источником аминного азота, витаминов и нуклеотидных оснований. Динамику роста выделенных штаммов и синтеза бактериоцинов в среде оптимизированного состава изучали в стационарных условиях в течение 30 ч. Биомассу определяли нефелометрически на приборе ФЭК-56 при длине волны 560 нм, рН - потенциометрически.

Влияние рН-статирования на синтез бактериоцина проводили в ферментере фирмы ЛКВ объемом 5 л. Контроль процесса ферментации проводили по измерению оптической плотности культуры и антибиотической активности (Грушина, 1984).

Изучали влияние левомецетина как ингибитора синтеза белка на рост культуры, образование бактериоцина и синтез белка (Hirst, 1981). Левомецетин добавляли в среду культивирования в количестве 100 мг/мл.

Определение белка проводили методом Лоури с помощью спектрофотометра или ФЭК при длине волны максимума поглощения 750 нм (Lowry et al., 1951).

Лиофилизация штаммов. Культуры молочнокислых бактерий, выращенные на жидкой среде до стационарной стадии роста, центрифугировали с целью отделения клеток,

ресуспендировали в защитной среде, содержащий (в г/л): желатины – 10, сахарозы – 100, как криопротекторы. и лиофилизировали на установке фирмы «Кристал» марки Бетта А (Германия) под вакуумом при температуре 30°C до остаточной влажности 2,5 - 4,0%. Леофильно высушенные штаммы хранили в ампулах в условиях бытового холодильника при - 18°C. После лиофилизации и в процессе длительного культуры восстанавливали в обезжиренном стерильном молоке (Стоянова Л. Г., Егоров Н. С., 1999; Стоянова и др., 2004).

Для выделения и очистки бактериоцина, образуемого штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* применен ряд растворителей, такие как: ацетон, н.-бутанол, метанол в различных сочетаниях и концентрациях в сравнении с известной смесью для выделения низина, содержащую ацетон:уксусная кислота в соотношении 4:1 на 5 частей культуральной жидкости. Для разделения антибиотического комплекса на фракции и получения хроматографически чистых компонентов водный концентрат экстрагировали органическими растворителями, не смешивающимися с водой, экстракты объединяли, растворитель отгоняли в вакууме на ротонном испарителе до получения маслянистого остатка и таким образом получали одну из фракций (А) антибиотического комплекса, образуемого штаммом *L. lactis* subsp. *lactis* 194. Для получения фракции В к водному маточнику от экстракции добавляли 3 объема метанола. Выпавший осадок отделяли на стеклянном фильтре и сушили в вакуум-эксикаторе в течение суток (Cotter et al., 2006; Breukink, 2006).

Хроматографический анализ антибиотиков проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) (Parente, Ricciardi, 1999) на пластинках “Silufol” (Чехия) в системе метанол:вода (96:4) (Воейков, 1992) и колоночной хроматографии. В этих же условиях проводили и препаративную ТСХ, используемую для очистки индивидуальных компонентов фракций.

Аналитический и полупрепаративный электрофорез на бумаге Filtrak F-14 проводили на V-образном приборе Durrum в электролите: 2 н. АсОН (рН 2,4), 550В в течение 2 ч.

Биоавтографию проводили по методике, предложенной Хасе и Келлером (Saavedra et al., 2004) с использованием в качестве тест-организмов *Bac. coagulans* 429, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

UV-VIS-спектры снимали на спектрофотометрах Shimadzu 1601С и Hitachi U-2000 (Japan);

Масс-спектры выделенных антибиотиков регистрировали на приборе VISION

методом MALDI-TOF в режиме положительных ионов на матрице DHB (2,5-дигидроксибензойная кислота).

Для **изучения возможности применения** бактериоцинообразующего штамма 194 в качестве биоконсерванта были проведены испытания по увеличению сроков хранения сырокопченых колбасных изделий: сервелат сырокопченный «Зернистый» ТУ 9213038-510-323-26-03, колбаса сырокопченая «Свиная» ГОСТ 16131-86. Опытные образцы были обработаны культуральной жидкостью с активностью бактериоцина 4000 МЕ/мл, pH 4,2. Контрольные образцы (без обработки) вышеуказанных колбасных изделий и опытные были заложены на хранение при температуре 10⁰С на 2 месяца. Проведена идентификация грибной плесени с поверхности зараженных колбас с использованием классических микробиологических методов (Raper et al., 1965; Саттон и др, 2001).

Результаты исследования были статистически обработаны по общепринятой методике с использованием критерия Стьюдента ($P < 0,05$) в программе SigmaPlot 3.02 (Jandel Corporation, США).

Результаты исследования.

Выделение и идентификация мезофильных бактериоцинообразующих лактококков. Из молока разных территориальных зон России и национального бурятского кисломолочного напитка курунга были отобраны наиболее активные бактериоцинообразующие штаммы. Из отобранных 62 колонии из разных продуктов - 4 штамма, обладали наибольшей антибиотической активностью по отношению к тест – культуре *B. coagulans*. Из молока молочных комбинатов г. Москвы выделен штамм 115 с активностью 2700 МЕ/мл, г. Клина - штамм 229 с активностью 2500 МЕ/мл, г. Улан-Удэ - штамм 194 с активностью 3600 МЕ/мл и из напитка курунга выделен штамм К-205 с активностью 2900 МЕ/мл. В качестве контроля был использован ранее изученный на кафедре микробиологии низинообразующий штамм МГУ с активностью 2000 МЕ/мл (Баранова, 1990).

Исследованы морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства новых штаммов (табл. 1). Изучение морфологии выделенных штаммов в фазово-контрастном микроскопе показало, что культура представлена кокками, собранными в пары и короткие цепочки разной длины (от 4-х до 7-ми кокков). Бактерии неподвижные, грамположительные. По морфологии и культуральным свойствам выделенные бактерии близки к мезофильным гомоферментативным лактококкам *L. lactis* subsp. *lactis*. На плотных агаровых средах с гидролизатом молока и синтетической среде с фосфатом и дрожжевым автолизатом колонии

были круглые блестящие с ровными краями диаметром от 1,5 мм до 3 мм: мелкие колонии у штаммов 115 и 194, а наиболее крупные у 229 и К-205. При глубинном инкубировании лактококки образовывали колонии лодочкообразной формы.

Таблица 1.

Дифференцирующие признаки штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*

Признаки	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	штамм МГУ	штамм 194	штамм 115	штамм 229	штамм К-205
Преимущественное расположение клеток наиболее типичное указано первым	короткие цепочки	диплококки	короткие цепочки	цепочки до 7 кокков	диплококки	цепочки до 7 кокков
Подвижность	-	-	-	-	-	-
Рост при 10°C	+	+	+	+	+	+
Рост при 45°C	-	-	-	-	-	-
pH 9.6	-	-	-	-	-	-
Рост в присутствии 4%NaCl	+	+	+	+	+	+
Рост в присутствии 6,5%NaCl	-	-	-	-	-	-
Образование молочной кислоты из глюкозы, %:	90-98%	93%	95%	96%	91%	97%
Способность к потреблению углеводов						
Фруктоза	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	+
Маннитол	-	-	-	-	-	+
Сахароза	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+	+	+
Рафиноза	-	-	-	-	-	-
Отношение к кислороду.	факультативные анаэробы					

* Определитель бактерий Берджи, 2002.

Примечание: знак «+» – обозначает способность к потреблению углеводного субстрата, «-» – отсутствие способности к потреблению.

Свойство потреблять различные углеводы, включая сахара, спирты и органические кислоты лежит в основе отличительных признаков при идентификации молочнокислых бактерий. В результате исследований было установлено, что все выделенные штаммы и штамм МГУ утилизировали глюкозу, лактозу, фруктозу, сахарозу, маннозу, но не утилизировали манитол за исключением штамма К-205 (табл. 1).

Результаты генотипирования по 16S рРНК показали, что все штаммы обнаруживали высокую степень гомологии ДНК (на уровне 98,9 – 100,0%) по отношению к референтным штаммам *L. lactis* subsp. *lactis*. Уровень гомологии (в %) между штаммами лактококков по результатам сравнительного анализа последовательностей участка гена 16S рРНК представлен на рис. 1 и подтверждает принадлежность изучаемых бактерий к виду *L. lactis* subsp. *lactis*.

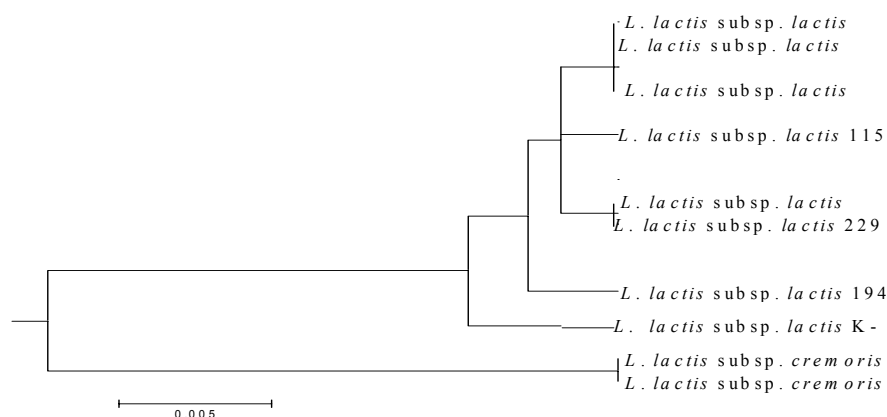


Рисунок 1. Дендрограмма генотипического сходства нуклеотидных последовательностей (400 п.н.) генов 16S рРНК изучаемых штаммов лактококков: 115, 229, 194, МГУ в сравнении с референтными штаммами *L. lactis* subsp. *lactis* и *L. lactis* subsp. *cremoris*.

Высокий уровень гомологии выявлен между штаммами, выделенными из продуктов Бурятии - 99,6%, а сходство их со штаммами, выделенными из молока московского региона, составило 98,9%. Уровень генетического родства всех изучаемых штаммов по отношению к близкородственному штамму *L. lactis* subsp. *cremoris* составил 95,4 – 96,6 %.

Изучение физиолого-биохимических свойств штаммов.

Определены потребности штаммов в отдельных факторах роста (табл. 3). Показано, что все изучаемые штаммы потребляли аргинин, что является таксономическим признаком для гомоферментативных лактококков *L. lactis* subsp. *lactis*, а также требовали для своего роста наличия в среде аспарагиновой кислоты и урацила. Тимин, как и аланин были необходимы для роста штаммов 194, 229 и К-205. Штамм МГУ также нуждался в глицине и

пролине. Отсутствие глицина не оказывало влияния на рост штаммов, кроме штаммов 194 и МГУ. Штамм 115 отличался весьма ограниченной потребностью в ростовых компонентах, но пролин, аспарагин и урацил стимулировали его рост. В контроле (без ростовых компонентов) рост штаммов не обнаружен, что свидетельствовало об ауксотрофности выделенных штаммов.

Таблица 2

Потребность в отдельных ростовых компонентах *L. lactis* subsp. *lactis* штаммов 115, 194, 229 и МГУ.

Ростовые компоненты	штамм 115	штамм 194	штамм 229	штамм К-205	штамм МГУ
Аланин	-	+	+	+	-
Аргинин	+	+	+	+	+
Аспарагин	+	+	-	+	-
Аспарагиновая кислота	+	+	+	+	+
Валин	-	-	+	-	+
Глицин	-	+	-	-	+
Глутамин	-	+	-	+	+
Пролин	+	-	-	-	+
Тимин	-	+	+	+	-
Урацил	+	+	+	+	+

Примечание: знак «+» обозначает потребность в ростовом компоненте (отсутствие роста), «-» - отсутствие потребности в ростовом компоненте.

Изучен спектр антибиотического действия (табл. 3) выделенных лактококков. Установлено, что выделенные активные бактериоцинообразующие штаммы подавляли рост грамположительных бактерий, включая спорообразующие бациллы *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. mycoides*, микрококки *Micrococcus luteus*, *Micrococcus flavum* и *Staphylococcus aureus*, что характерно для низина А (*Nisaplin*) и низинообразующего лактококка штамм МГУ. Штамм 115 проявлял незначительную антибиотическую активность на грамотрицательные микроорганизмы, а штамм 229 – только на *Alcaligenes faecalis*. Однако, штаммы 194 и К-205, выделенные из молока г. Улан-Удэ и лечебно-профилактического продукта курунга, обладали широким спектром антибактериального действия: эффективно подавляли рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий: *Alcaligenes faecalis*, *Proteus*

vulgaris, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*. Эти штаммы проявляли также фунгицидное действие: подавляли рост: *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Candida guilliermondii*, что является редким малоизвестным биологическим свойством бактериоцинов, синтезируемым бактериями *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Таблица 3

Антимикробный спектр действия штаммов лактококков разного происхождения и кисломолочного напитка курунга.

Тесткультура	115	229	194	К-205	МГУ	Nisa-plin	Курунга
	Диаметр зон подавления роста, мм						
<i>Bacillus mycoides</i>	20,0	16,0	19,5	19,5	16,0	17,0	21,0
<i>Bacillus subtilis</i>	12,0	19,0	22,0	22,0	19,0	19,0	20,0
<i>Bacillus coagulans</i>	21,0	15,0	23,0	22,0	14,0	21,0	18,5
<i>Bacillus cereus</i>	18,5	20,0	21,0	21,0	16,0	18,0	17,0
<i>Micrococcus luteus</i>	21,5	22,0	22,5	19,5	19,0	21,5	21,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	16,0	16,0	20,0	20,0	12,0	15,0	20,0
<i>Alcaligenes faecalis</i>	9,0	10,0	12,5	12,5	0,0	0,0	18,5
<i>Escherichia coli</i>	12,0	0,0	15,0	14,0	0,0	0,0	15,0
<i>Proteus vulgaris</i>	9,0	0,0	16,5	16,0	0,0	0,0	16,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,0	0,0	16,5	15,5	0,0	0,0	17,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9,0	0,0	18,0	16,0	0,0	0,0	14,0
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,0	0,0	16,5	10,0	0,0	0,0	15,0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,0	0,0	17,5	10,5	0,0	0,0	15,0
<i>Aspergillus niger</i>	0,0	0,0	21,0	10,0	0,0	0,0	16,0
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	0,0	0,0	19,5	10,0	0,0	0,0	13,0
<i>Candida guilliermondii</i>	0,0	0,0	21,0	12,0	0,0	0,0	10,0

Следовательно, имеет место и штаммовая специфичность лактококков по синтезу бактериоцинов, отличающихся биологическим действием. Этим объясняется актуальность данной работы по выделению природных штаммов - продуцентов бактериоцинов.

По результатам изучения чувствительности изучаемых штаммов к антибиотикам (табл. 4), выявлено, что штаммы чувствительны к антибактериальным антибиотикам широкого спектра действия, ингибирующим синтез белка: тетрациклину, доксициклину и левомицетину, в меньшей степени к аминогликозидным антибиотикам: канамицину, неомицину, сизомицину и стрептомицину. Все штаммы чувствительны к антибиотикам, ингибирующим синтез клеточной стенки грамположительных бактерий: пенициллинам и цефалоспорином, но штамм 194 устойчив к бензилпенициллину. Эти данные подтверждают принадлежность изучаемых бактерий к группе грамположительных бактерий.

Таблица 4.

Чувствительность выделенных штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* к антибиотикам.

Антибиотик	Концентрация в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм				
		115	229	194	К-205	МГУ
Тетрациклин	30	36,5	33,6	28,5	30,4	35,5
Доксициклин	10	32,0	34,0	27,5	29,8	34,0
Левомецетин	30	25,2	32,0	25,5	23,6	26,0
Рифампицин	10	12,0	0,0	15,0	12,2	0,0
Олеандомицин	15	21,0	27,0	17,5	18,3	28,5
Неомицин	30	0,0	0,0	14,0	0,0	0,0
Стрептомицин	30	12,0	13,3	12,0	0,0	14,0
Канамицин А	30	14,5	14,0	0,0	11,3	15,0
Ристомидин А	30	19,5	17,6	13,8	14,4	19,5
Бензилпенициллин	10	22,6	27,0	0,0	18,5	26,5
Карбинициллин	10	32,0	29,5	12,0	21,1	30,5
Оксациллин	10	21,0	18,5	10,0	13,6	17,5
Цефалотин	30	30,5	30,5	27,0	26,8	31,0
Цефалексин	30	18,0	28,0	13,0	15,7	28,0
Сизомицин	10	19,0	16,5	10,0	14,2	17,5
Метициллин	10	22,0	28,5	0,0	0,0	16,0
Ампициллин	10	29,0	32,6	20,0	23,4	26,5

Чувствительность к антибиотическим препаратам может быть следствием их применения в сельскохозяйственной практике. В связи с этим, контроль по данному показателю является необходимым, так как при использовании культур, резистентных к лекарственным препаратам в пищевой и медицинской практике, могут передаваться в макроорганизм плазмиды, несущие гены лекарственной устойчивости, что затрудняет лечение (Таммерман, 2003; Зигангирова и др., 2006).

Изучение диссоциации штамма 194.

В микробиологических производствах причиной снижения активности продуцентов часто является спонтанная изменчивость штаммов по морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам. Известно, что при множественных пассажах и неблагоприятных условиях культивирования производственные штаммы могут диссоциировать с преобладанием неактивных клонов. Установлено, что штамм 194 диссоциировал на G (мелкие, прозрачные колонии) и S (крупные, белые колонии) варианты (рис. 2). Вариант G составлял 88,1%, а вариант S - 11,9% от общего количества клеток популяции. По каждому типу колоний определены отличительные физиолого-биохимические свойства (табл. 5).

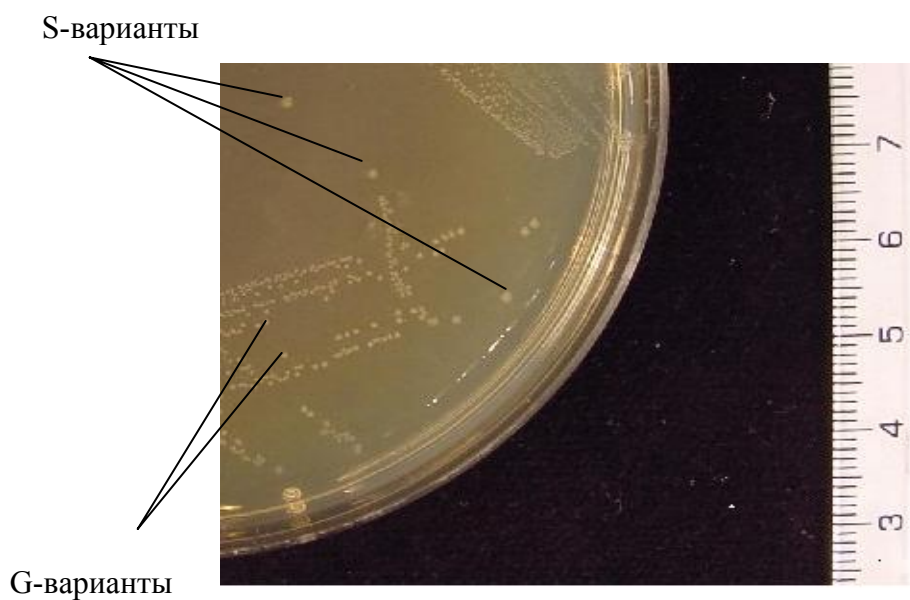


Рис. 2. Диссоциация штамма 194 на G и S варианты.

Показано, что наибольшей антимикробной и фунгицидной активностью обладает G-вариант. Активность его по низину составила 4500 МЕ/мл, по левомецетину – 3630 МЕ/мл, а фунгицидная активность, рассчитанная по нистатину – 2200 МЕ/мл, что на 5,4, 11,8 и 8,5% (соответственно) выше по сравнению с активностью S-вариантов.

Таблица 5.

Характеристика диссоциантов *L. lactis* subsp. *lactis* 194

Свойства	G вариант	S вариант
Морфология	мелкие, прозрачные колонии размером 1,5 – 1,8 мм	крупные, белые колонии размером 2,2 – 3,0 мм
Антибиотическая активность, рассчитанная по: (МЕ/мл)		
низину	4500	4260
левомицетину	3630	3200
нистатину	2200	2010

Полученные данные позволят проводить селекцию продуцента по целевому признаку.

Регуляция синтеза бактериоцина *L. lactis* subsp. *lactis* штаммом 194

На примере перспективного штамма 194, как имеющего наибольшую активность и широкий спектр антимикробного действия, изучали влияние основных компонентов ферментационной среды на рост культуры и синтез бактериоцина.

Как видно из таблицы 5, при уменьшении количества фосфата в среде от 2,0% до 0,5% рост культуры и синтез бактериоцина снижался, а при исключении из среды дрожжевого автолизата как источника аминного азота, рост культуры и синтез бактериоцина приостанавливался.

Таблица 5.

Влияние различных компонентов ферментационной среды на рост и синтез бактериоцина штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194

Состав среды	ОП ₅₄₀ (17ч.)	pH	Активность, МЕ/мл
Контроль (глюкоза + дрожжевой автолизат + 2% КН ₂ РО ₄)	1,45	4,2	3600
с 1% КН ₂ РО ₄	1,05	4,0	3150
с 0,5% КН ₂ РО ₄	0,80	3,9	3000
без КН ₂ РО ₄	0,32	5,4	1000
без дрожжевого автолизата	0,18	6,6	0

Существует прямая корреляция между концентрацией фосфора в среде с ассимиляцией углеводов из среды культивирования (Безбородов, 1991; De Vuyst, Vandamme, 1993; Chan et al., 2002).

Влияние разных углеводов на синтез бактериоцина штаммом *Lactococcus lactis subsp. lactis* 194 представлено на рис. 3. Показано, что на среде с сахарозой уровень антибиотической активности на 25% выше, с маннозой - на 15%, с галактозой, рибозой, фруктозой на 10% выше по сравнению со средой, содержащей глюкозу. Итак, дисахарид сахароза - наиболее благоприятный углевод для синтеза бактериоцина, что согласуется с исследованиями ряда авторов, утверждающих, что синтез бактериоцина низина и способность к утилизации сахарозы кодируется одним геном (De Vuyst et al., 1992; Klaenhammer, 1993).

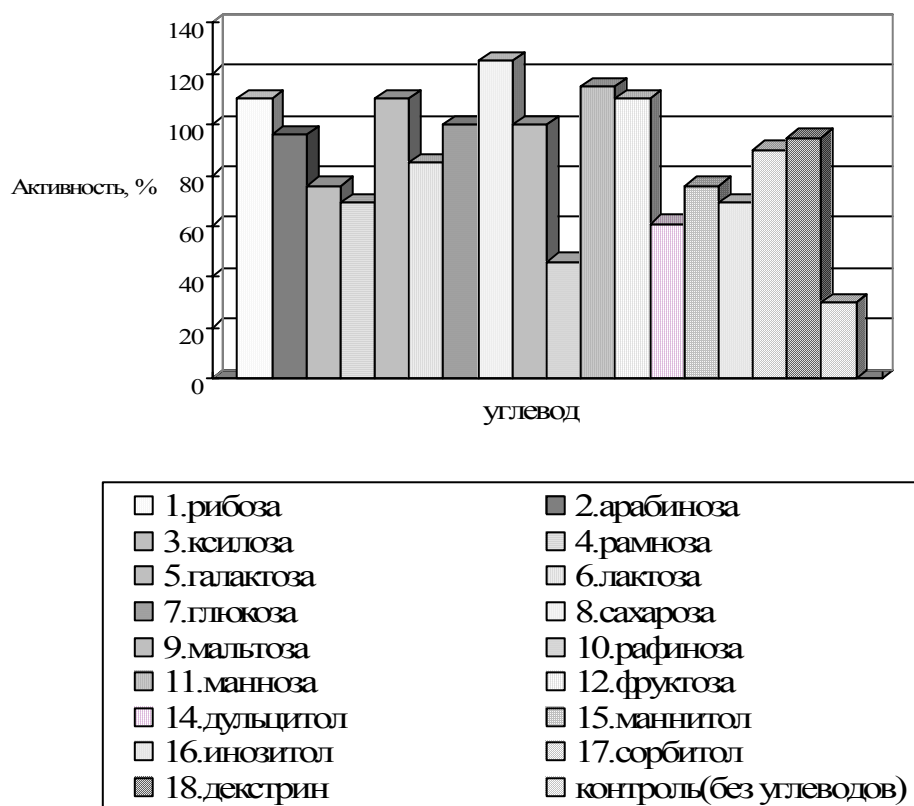


Рис. 3. Влияние углеводов на синтез бактериоцина штаммом *Lactococcus lactis subsp. lactis* 194.

Следующим этапом работы являлось изучение роста и развития штамма 194 на средах, с низким содержанием фосфатов (0,5% K_2HPO_4) в сочетании с удвоенным количеством сахарозы или глюкозы. Результаты этого эксперимента показали, что за 9 часов инкубирования в среде с 2% глюкозы уровень активности увеличился на 13,9% по сравнению с основной ферментационной средой, содержащей 2% K_2HPO_4 и 1% глюкозы. При замене глюкозы на сахарозу уровень антибиотической активности увеличился на 24,6% (табл. 7).

Таблица 7.

Показатели роста культуры и активность бактериоцина штамма 194 *Lactococcus lactis subsp. lactis* на средах, содержащих 0,5% K_2HPO_4 и 2,0% глюкозы или 2,0% сахарозы

Время культивирова- ния, час	Показатели роста культуры и активность бактериоцина					
	глюкоза			сахароза		
	рН	ОП ₅₄₀	Активность, МЕ/мл	рН	ОП ₅₄₀	Активность, МЕ/мл
0	6,9	0,10	0	6,8	0,18	0
3	6,6	0,42	1700	6,6	0,80	2100
6	4,8	0,70	3200	4,8	1,60	3800
9	4,0	1,30	4100	4,2	1,82	5100
12	3,8	1,20	4100	4,0	1,80	5000

Как показали результаты изучения динамики роста в стационарных условиях и развития культуры на оптимизированной среде при периодическом культивировании (рис. 5) максимальное количество бактериоцина накапливалось в ферментационной среде за 9 ч инкубирования, что сопровождалось увеличением биомассы продуцента и снижением рН среды до значения 3,8.

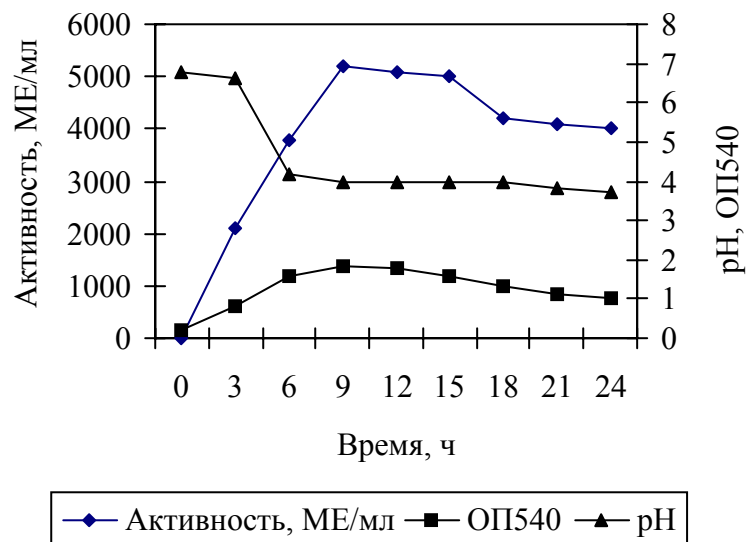


Рис .4. Динамика роста *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 на оптимизированной среде, содержащей 0,5% K_2HPO_4 и 2,0% сахарозы.

Таким образом, оптимальной является среда, содержащая (%): K_2HPO_4 – 0,5; MgSO_4 – 0,02; NaCl - 0,2; сахароза - 2,0; дрожжевой автолизат, содержащий 35 - 40 мг% азота аммония.

Влияние pH-статирования на рост культуры и синтез бактериоцина.

Активная кислотность (pH) среды существенно влияет на развитие микроорганизмов, на характер их обмена и, следовательно, на процесс образования антибиотических веществ. Изменение pH среды заметно сказывается на активности ферментов микроорганизмов, состоянии промежуточных продуктов, их диссоциации, растворимости. Таким образом, изменение активной кислотности среды значительно воздействует на выход конечных продуктов метаболизма микроорганизмов (Грушина, 1984; Matsusaki et al., 1996). Стабилизация уровня pH в процессе ферментации на оптимизированной среде позволило повысить уровень антибиотической активности на 27,5% (табл. 8).

Итак, при оптимизации технологического процесса ферментации бактериоцинообразующая активность штамма повысилась на 58,5% (6500 МЕ/мл).

Влияние рН-статирования ферментационной среды на рост культуры и синтез бактериоцина *Lactococcus lactis subsp. lactis* штамм 194.

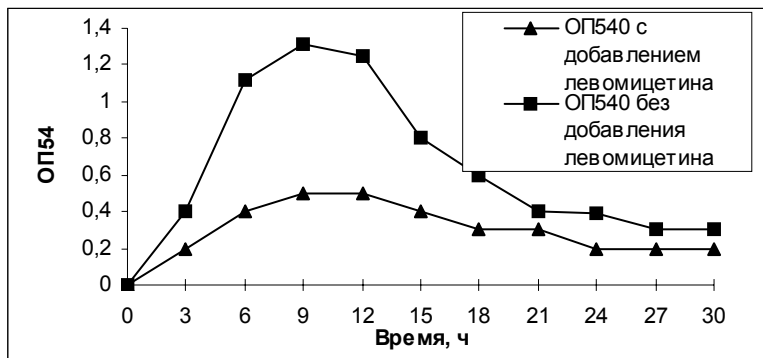
Время культивирования, час	Показатели роста культуры и активность бактериоцина		
	рН	ОП ₅₄₀	Активность, МЕ/мл
3	5,9	0,40	1700
4	5,6	0,52	2400
5	6,0	0,80	3200
6	6,0	1,30	4200
7	5,9	1,50	4800
8	5,9	1,60	5800
9	6,0	1,60	6500
10	6,0	1,60	6400

На основании экспериментальных данных, полученных при изучении регуляции синтеза бактериоцина новым перспективным штаммом *Lactococcus lactis subsp. lactis* 194 разработан лабораторный регламент на технологический процесс синтеза бактериоцина.

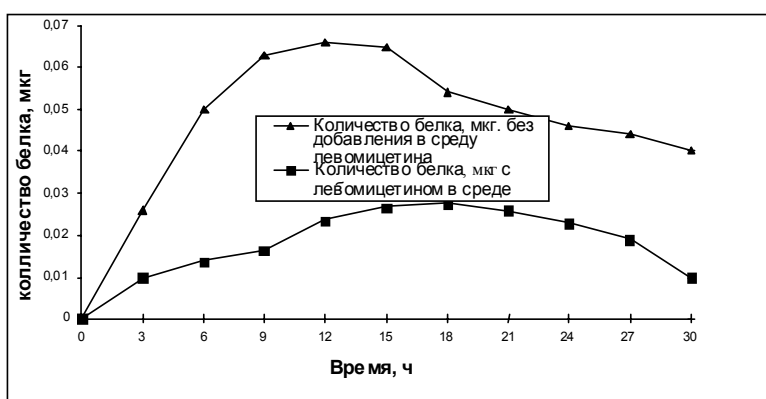
Изучение динамики роста и развития штамма 194 показало, что синтез бактериоцина идет параллельно росту продуцента, что согласуется с ранее полученными данными других исследователей (Hurst, 1983; Yother et al., 2002).

Для подтверждения белковой природы синтезируемого бактериоцина были проведены исследования по влиянию ингибитора синтеза белка - левомицетина на рост продуцента, синтез бактериоцина и белка. На рис. 5 показано, что внесение в среду культивирования левомицетина ингибировало рост и развитие культуры, о чем свидетельствовало снижение оптической плотности культуры, синтеза микробного белка и антибиотической активности культуральной жидкости продуцента. При уменьшении биомассы на 32,3%, синтез белка снизился на 45,2%, а антибиотическая активность культуральной жидкости на 88,5%. При

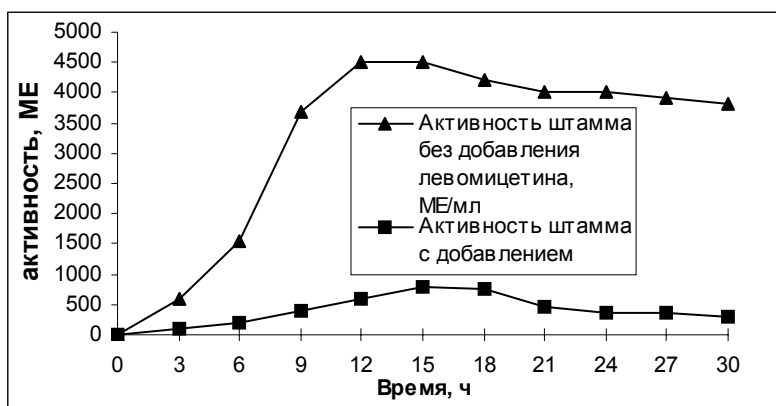
этом изменилась динамика синтеза белка и синтеза бактериоцина. Наблюдали отставание темпа синтеза бактериоцина и белка от роста культуры на 3 – 5 ч.



а



б



в

Рис. 5. Влияние левомецетина на рост *Lactococcus lactis subsp. lactis* штамм 194 (а), синтез белка (б), синтеза бактериоцина (в).

Лиофилизация штамма 194 в защитной среде с криопротекторами обеспечивала сохранность физиолого-биохимических свойств штаммов и стабильность в процессе их хранения (Стоянова и др., 2004).

Выделение и очистка бактериоцина из штамма 194.

Бактериоцины накапливаются в основном в культуральной жидкости, но часть их связана с клеточной стенкой продуцента (Hurst, Drag, 1968; Brotz et al., 1998). Одним из важнейших условий эффективного извлечения бактериоцина из культуральной жидкости является правильный выбор экстрактанта – органического растворителя, который бы избирательно и полно извлекал его из культуральной жидкости, так и из клеточной стенки.

Для этого проведены исследования по выделению и очистке антибиотического комплекса, продуцируемого *L. lactis* subsp. *lactis* штаммом 194.

Таблица 9

Физико-химические и биологические свойства компонентов антибиотического комплекса, образуемого штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 в сравнении с коммерческим препаратом низина.

Свойства	Компоненты			
	194-А	194-Б	194-В	Низин А
Мол. масса, (M+H) ⁺ , m/z, (MALDI-MS)	607,5	619,6	1995	3353**
UV-VIS спектр, λ _{max} , нм, (растворитель)	206,8 (C ₂ H ₅ OH)	224,8 (C ₂ H ₅ OH)	257,0 (C ₂ H ₅ OH)	215,0 (H ₂ O)
ТСХ (SiO ₂), R _f в системе: MeOH–H ₂ O (96:4)	0,6	0,42	0,0	0,0
Электрофорез на бумаге* в электролите: рН=2,4, 550 В, 2 час., см	0,0	0,0	7,6	9,5
Биологический спектр действия	на грамположительные, грамотрицательные бактерии и грибы	на грамположительные бактерии, включая термостойкую <i>Bacillus coagulans</i>	на грамположительные бактерии, включая термостойкую <i>Bacillus coagulans</i> .	на грамположительные бактерии, включая термостойкую <i>Bacillus coagulans</i> .

Примечания: */ - представлено расстояние, пройденное веществом от стартовой линии к катоду, в см: «0 см» (на линии старта) - электронейтральное вещество; «7,6 - 9,5 см» (миграция к катоду) – вещество основного характера.

Антибиотический комплекс был разделен на три основные биологически активные фракции, различающиеся между собой по величине R_f в ряде систем растворителей при ТСХ на силикагеле, а также по электрофоретической подвижности при электрофорезе на бумаге в различных электролитах. В системе метанол:вода (96:4), используя метод ТСХ, фракция 194-Б имела $R_f=0,42$. Гидрофобный компонент 194-В, совпадал по электрофоретической подвижности со стандартным образцом низина: мигрировал к катоду, обладал основными свойствами, был эффективен только против грамположительных бактерий. Компонент 194-А являлся низкомолекулярным гидрофильным соединением и обладал широким спектром антимикробного действия (табл. 9).

Интерес представляла низкомолекулярная фракция 194-А, которая обладала фунгицидным действием, что является редким свойством для бактерий этого вида. Анализ по изучению структуры всех фракции в компьютерной базе данных биологически активных веществ проф. Берди (Венгрия) показал, что данные вещества являются новыми не описанными ранее природными соединениями, не имеющие аналогов.

Использование активного бактериоцинообразующего штамма 194 как биологического консерванта.

Испытания по использованию активного бактериоцинообразующего штамма 194 для увеличения сроков хранения сырокопченых колбасных изделий: сервелат сырокопченный «Зернистый» ТУ 9213038-510-323-26-03, колбаса сырокопченая «Свиная» ГОСТ 16131-86. показали (рис. 8), что в опытных образцах, обработанных культуральной жидкостью рост плесени не обнаружен, колбаса по органолептическим показателям (внешний вид, запах, вкус) соответствовала требованиям вышеуказанных нормативных документов.

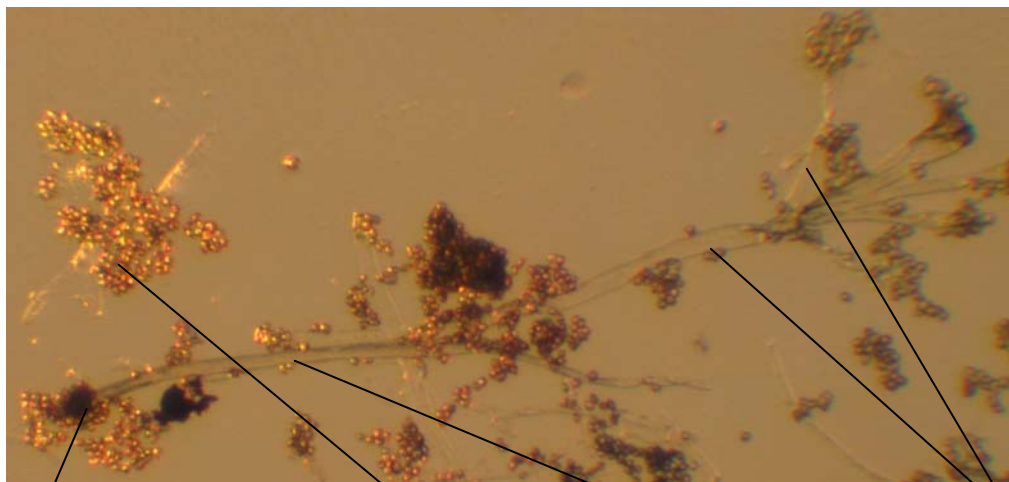
Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 продуцировал бактериоцин, обладающий фунгицидным действием и может быть рекомендован для хранения колбасных изделий.

Из обсемененных колбасных изделий выделен плесневый гриб. Идентификация его классическими микробиологическими методами показала, что данный гриб относится к сумчатым грибам аскомицетам рода *Aspergillus* (рис. 9).



Рис. 8. Влияние обработки культуральной жидкостью *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 на обсемененность колбасных изделий (1 - без обработки; 2 - с обработкой).

На плотном субстрате гриб *Aspergillus repens* образовывал характерные округлые, пушистые колонии с белым ободком и светло-зеленым центром. Колонии состоят из большого количества ветвящихся нитей, называемых гифами. На свободных концах плодоносящих гифов видны конидии, формирующиеся на поверхности конидиеносца, составляя иногда длинные цепочки наподобие бус.



Стеригма с конидиями споры конидиеносец вегетативные гифы

Рис. 9. Конидиеносец и споры плесневого гриба *Aspergillus repens*

Плесневые грибы распространены повсеместно. Особенно много их в почве и в местах с

повышенной влажностью. Это объясняет появление гриба на поверхности колбас в процессе хранения в промышленных холодильниках в условиях повышенной влажности и недостаточной циркуляции воздуха в камерах при созревании колбасных изделий.

На рис. 10 показаны зоны ингибирования роста гриба *Aspergillus repens* штаммами *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194, К-205, 115 и МГУ.

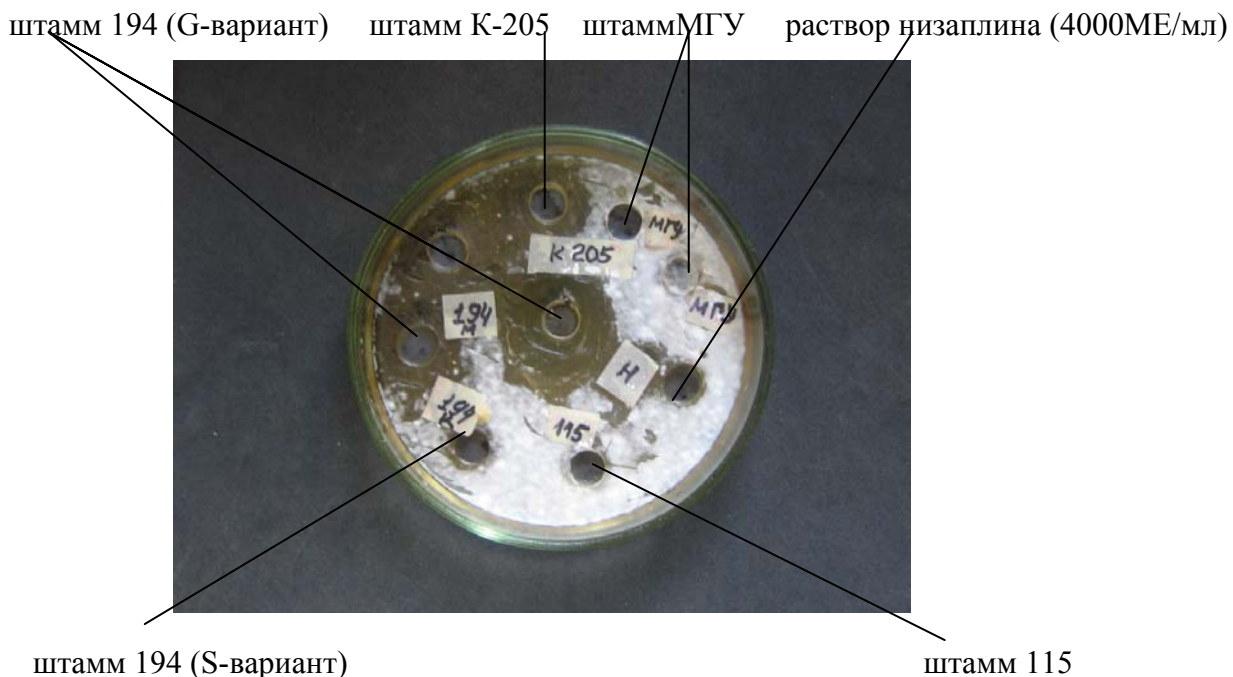


Рис. 10. Зоны ингибирования штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* 194, К-205, 115 и МГУ на чашке с тест-организмом *Aspergillus repens*, выделенный с поверхности зараженных колбасных изделий.

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать следующие выводы:

Выводы:

1. Из свежего коровьего молока разных территориальных зон и национального бурятского кисломолочного продукта курунги выделены четыре активных бактериоцинообразующих штамма мезофильных лактококков 115, 194, 229 и К-205 с уровнем активности от 2500 до 3600 МЕ/мл, что значительно превышало уровень активности прежде выделенных природных штаммов лактококков.

2. С использованием классических микробиологических методов и генотипического метода, основанного на анализе сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК, штаммы идентифицированы как *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Нуклеотидные

последовательности генов 16S рРНК новых штаммов депонированы в базу данных GenBank под следующими номерами: DQ255951 - DQ255954.

3. На примере активного бактериоцинообразующего штамма 194 изучена регуляция синтеза бактериоцина. Оптимизирована ферментационная среда по фосфору, азоту и углеводному компоненту, что позволило, наряду с рН-статированием, увеличить выход бактериоцина на 58,6% (до 6500 МЕ/мл).

4. Из активного штамма 194 выделен антибиотический комплекс, представляющий собой сложную смесь биологически активных компонентов. Основой антибиотического комплекса являлась водо-растворимая фракция В, близкая по R_f и биологическому действию к низину. Средний компонент Б – обладал действием только на грамположительные микроорганизмы. Фракция А - низкомолекулярное гидрофильное соединение, обладающее широким спектром антимикробного действия. Все выделенные компоненты комплекса являются новыми не описанными ранее природными соединениями, не имеющие аналогов в базе данных биологически активных веществ проф. Берди (Венгрия).

5. Показана возможность использования штамма 194, обладающего фунгицидным действием, в качестве консерванта для увеличения срока хранения сырокопченых колбас. Проведена идентификация плесневого гриба, вызывающего порчу сырокопченых колбас при хранении.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Нетрусов А.И. Влияние фосфата и углеводов на синтез низина *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамм 194 // Вестн. Моск. Ун-та, 2003, сер. 16, Биология, №4, С. 17-22.
2. Stoyanova L., Netrusov A., Egorov N., Sultimova T. New bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* for food safety. International Congress “Poverty Food & Health in Welfare”, July 1-4, Lisbon, Portugal, 2003, p. 121.
3. Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Нетрусов А.И. Создание банка лиофильных бактериоцинопродуцирующих молочнокислых бактерий. Материалы международной конференции «Сохранение генетических ресурсов» г. Санкт-Петербург, 19-22 октября, 2004 г. // Цитология, 2004, том 46, №10, с. 865-866.
4. Сульимова Т.Д. Синтез бактериоцина *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамм 194. Тезисы докладов XI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2004”, 12-15 апреля 2004, секция Биология // М., 2004, стр. 149.
5. Stoyanova L.G., Netrusov A.I., Sultimova T.D., Dibirasulaev M.A., Dibirasulaev D.M. New bacteriocin from fusant strain of *Lactococcus lactis* for meat preservation. 19th International ICFMH Symposium – FOOD MICRO 2004. September 12 –16, 2004, Slovenia, p.61.
6. Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д. Изучение физиолого-биохимических свойств бактериоцинопродуцирующего штамма 194 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Тезисы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биотехнология микробов» 20-23 октября 2004 г. // М., Изд-во Макс-Пресс, 2004 г., стр. 87.
7. Сульимова Т.Д., Стоянова Л.Г., Ботина С.Г. Скрининг бактериоцинопродуцирующих штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* // Тезисы Молодежной школы-конференции «Актуальные проблемы современной микробиологии», ИНМИ, 1-3 ноября 2005 г. // М., Изд-во Макс-Пресс, 2005 г. стр. 107.
8. Сульимова Т.Д., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Изучение антимикробного спектра действия национального молочнокислого напитка курунги // Тезисы из материалов Всероссийского симпозиума с международным участием “Автотрофные микроорганизмы” памяти академика РАН Е. Н. Кондратьевой, МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, 21-24 декабря 2005 г. // М., изд-во Макс-пресс, 2005 г. стр. 45.
9. Сульимова Т.Д., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Изучение бактериоцинопродуцирующей активности у диссоциантов нового штамма 194 *Lactococcus*

lactis subsp. *lactis*. // 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых 17-21 апреля 2006 г. // Пущино, 2006 г., стр. 398.

10. Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Ботина С.Г., Нетрусов А.И. Выделение и идентификация бактериоцинопродуцирующих штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* из свежего молока // Прикладная биохимия и микробиология, 2006, №5, С. 234-238.

Автор выражает благодарность к. б. н., ст. н. с. Федоровой Г. Б. ГНУ Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН за помощь в выделении и изучении физико-химических свойств компонентов антибиотического комплекса.