

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАТИОННООБМЕННЫХ СМОЛ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ И ОЧИСТКИ БАКТЕРИОЦИНОВ II-а КЛАССА.

USE OF CATION EXCHANGE RESINS IN THE CULTIVATION AND PURIFICATION OF CLASS II-A BACTERIOCINS.

Авторы: Коваленко И.М. /Kovalenko I.M. Kovalenko I.M.

Теймуразов М.Г., Хохлова О.Е., Абаимова А.А., Тазина О.И./ Teymurazov M.G., Khokhlova O.E., Abaimova A.A., Tazina O.I.

ФБУН ГНЦ ПМБ / FBUN SRCAMB

Введение

Бактериоцины II-а класса – низкомолекулярные (≤ 8 кДа), гидрофобные, катионные пептиды ($pI \geq 8$), обладающие антимикробными свойствами с узким спектром действия. Использование ионообменных сорбентов с карбоксиметил- и сульфопропил- группами для их очистки широко распространено, но без учета свойств смол (модифицированных агароз, декстрана и полимерных смол). Применение катионообменных смол с известным размером пор – ниже 30 кДа на основе декстрана, например, SP-sephadex C25 позволяет уменьшить сорбцию балластных белков. Кроме того, введение сорбента непосредственно в КЖ при культивировании штамма-продуцента способствует увеличению продукции бактериоцинов, т.к. сорбированные бактериоцины не участвуют в метаболизме в качестве сигнальных молекул, что заставляет бактерии индуцировать новые молекулы бактериоцинов.

Цель

Оценить возможность увеличения продукции бактериоцинов II-а класса (энтероцина А, В и мундтицина, микроцина L) при внесении SP-sephadex C25 непосредственно при культивировании и оценить выходы и степени очистки, полученных бактериоцинов.

Материалы и методы

Enterococcus faecium B-9764 (продуцент энтероцинов А и В) и *Enterococcus mundtii* B-10312 (мундтицина Р436) культивировали в LB-бульоне с добавлением лактозы и SP-sephadex C25 (10% к объему среды). *E.coli* B-9909 (продуцент микроцина L) выращивали на среде М-63 с лактозой и SP-sephadex C25 (10% к объему среды). В качестве контроля культивировали штаммы-продуценты в тех же условиях, но без добавления сорбента. По окончании культивирования сорбент переносили на колонку (200×20), отмывали 0,1 М ацетатным буфером и элюировали 0,5 М NaCl, pH 8,5. Белок определяли методом ВСА. Чистоту определяли в ВЭЖХ (UHPLC EX1800), колонка C18 150×4,6 (Phenomenex).

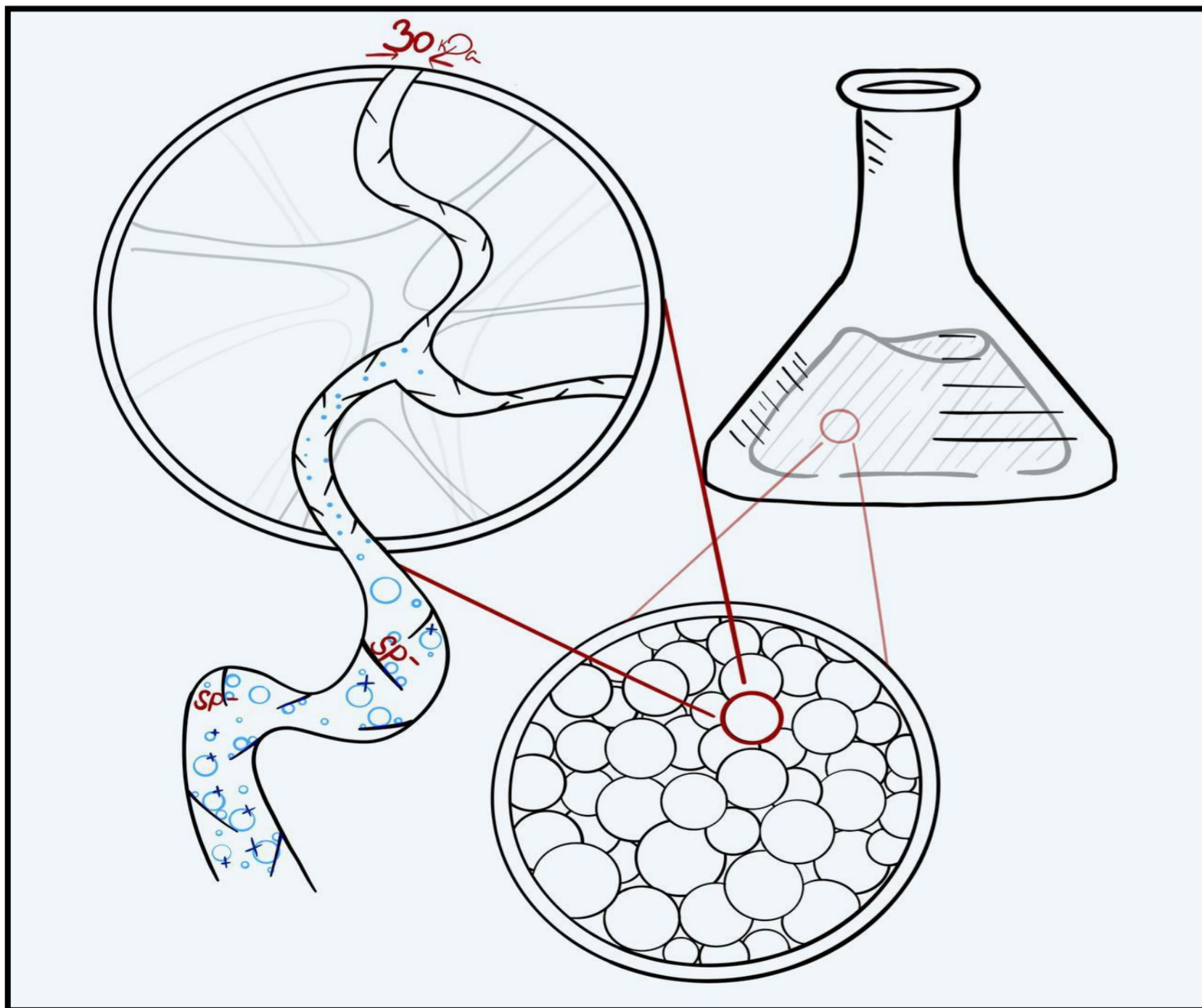


Рис 1. Графическое изложение принципа применения сорбента одновременно с культивированием штаммов-продуцентов бактериоцинов

Результаты

По сравнению с контрольными культивированиями отмечено увеличение выхода энтероцинов А и В (суммы) на 270 % при культивировании с сорбентом; для мундтицина Р436 – на 320 %; для микроцина L – на 160%. Чистота полученных бактериоцинов составила ~ 75% для суммы энтероцинов А и В; ~ 68 % для мундтицина Р436; ~ 35 % для микроцина L.

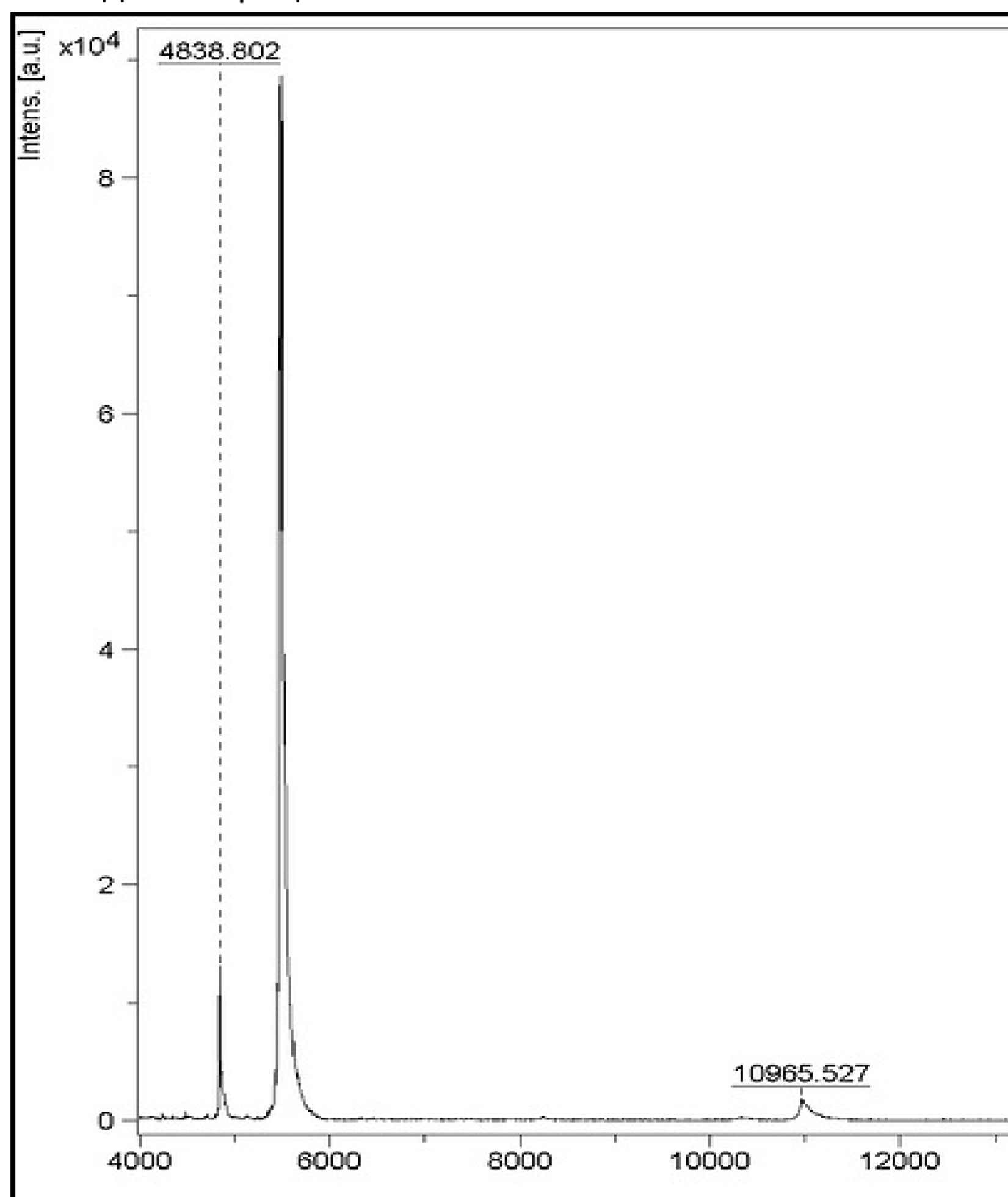


Рис 2. Масспектр очищенных энтероцина А (entA 4838.8) и энтероцина В (entB 5470)

Выводы

Полученные результаты указывают, что использование SP-sephadex C25 непосредственно на стадии культивирования штаммов-продуцентов бактериоцинов способствует увеличению их урожайности и высокой степени очистки при последующей одноэтапной элюции с сорбента.

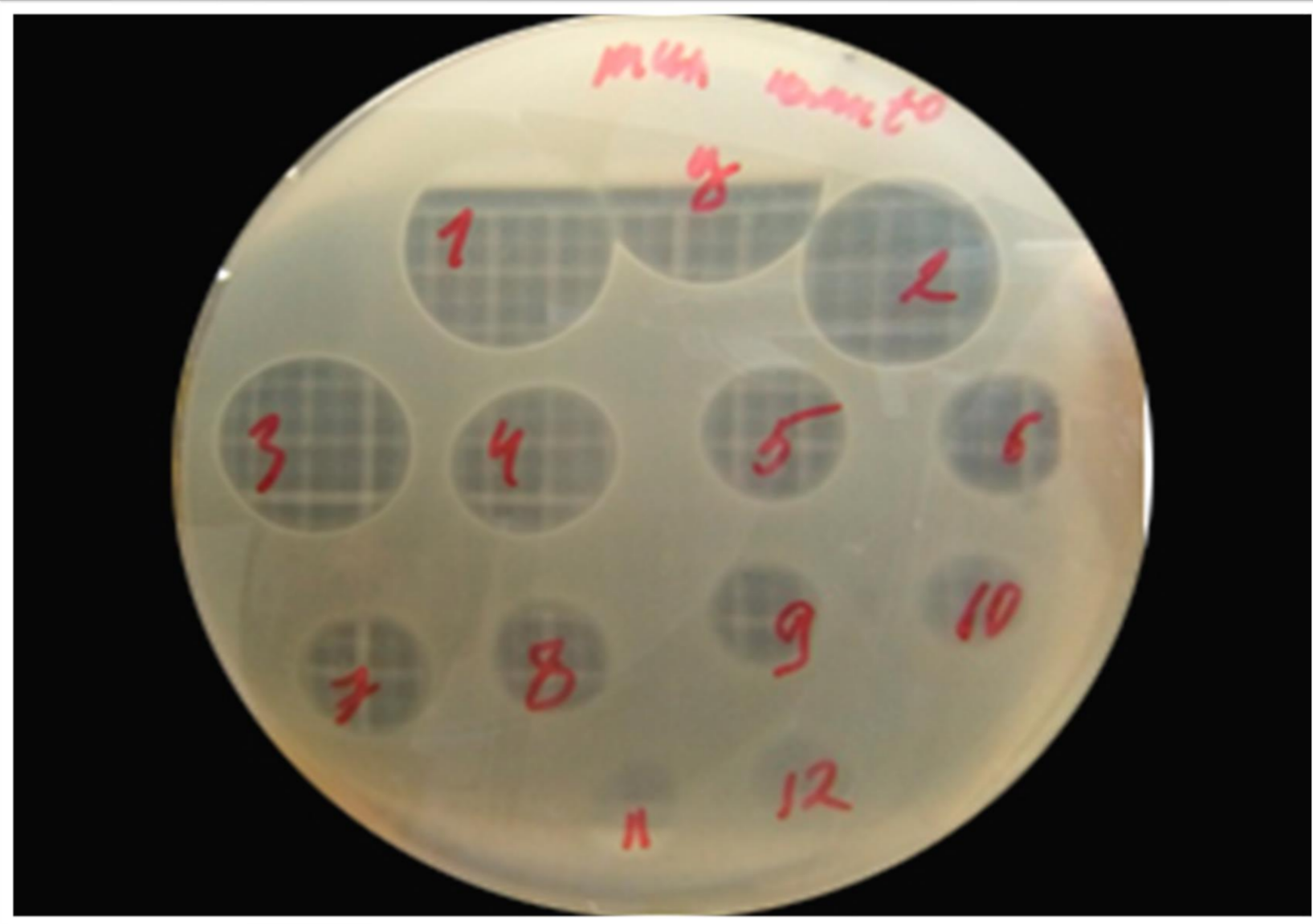


Рис 3. Активность в спот-методе очищенного мундтицина Р436 против тест-штамма listeria monocytogenes (ATCC 19111)