

УДК 663.15:579.222:579.24:579.864.1

Биосинтез антимикробных бактериоциноподобных соединений штаммом *Lactobacillus reuteri* LR1: оптимизация условий культивирования

© 2019 А.В. БЕГУНОВА¹, И.В. РОЖКОВА¹, Т.И. ШИРШОВА,¹ О.А. ГЛАЗУНОВА², Т.В. ФЕДОРОВА^{2,*}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва 115093

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва 119071

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 12.09.2019 г.

После доработки 04.10.2019 г.

Принята к публикации 12.10.2019 г.

В работе представлены результаты исследований по оптимизации условий культивирования *Lactobacillus reuteri* LR1 для наибольшей продукции бактериоциноподобных соединений (в том числе предположительно реутерина). Для определения антимикробной активности был выбран из условно-патогенных микроорганизмов индикаторный штамм *Escherichia coli* ATCC 25922, содержание которого нормируется в продуктах питания на законодательном уровне. Была усовершенствована питательная среда для культивирования *Lb. reuteri* с целью наибольшего накопления бактериоциноподобных соединений, а также были установлены параметры поэтапного культивирования *Lb. reuteri*: 1-й этап культивирования на питательной среде для накопления клеточной биомассы; 2-й этап культивирования в водно-глицериновой среде для биоконверсии глицерина в антимикробные соединения (предположительно реутерин). Культивирование проводилось при температуре (37±1) °С в течение 18 ч на питательной среде следующего состава: гидролизованное молоко – 250 мл/л; дрожжевой экстракт – 10 г/л; пептон – 5 г/л; глюкоза – 20 г/л; натрий уксуснокислый – 5,0 г/л; фосфат калия однозамещенный – 2,0 г/л; магний сернокислый – 0,2 г/л и марганец сернокислый – 0,5 г/л, при pH среды 6,4–6,6. Штамм-продуцент *Lb. reuteri* вносили в количестве 5%. Для биоконверсии глицерина наращенная биомасса помещалась в водно-глицериновую среду с содержанием глицерина 200 мМ и значением pH 6,6 при температуре 37 °С в течение 2 ч. Диаметр зоны ингибирования роста тест-штамма *E. coli* полученного раствора бактериоциноподобных соединений составил около 25 мм.

Ключевые слова: бактериоциноподобные соединения, *Lactobacillus reuteri*, антимикробная активность, реутерин, биоконверсия глицерина, оптимизация условий культивирования.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-58-69

Молочнокислые бактерии (МКБ), в частности рода *Lactobacillus*, играют важную роль в экологии желудочно-кишечного тракта, ряд микроорганизмов оказывает пробиотическое воздействие на организм человека и с/х животных.

Стоит отметить, что кроме общего оздоровительного действия на организм человека и жи-

вотных, оказываемого продуктами метаболизма молочнокислых и пробиотических микроорганизмов в составе функциональных продуктов и кормов, данные вещества и сами по себе представляют большой интерес, так как часто являются высокоактивными агентами, подавляющими различного рода патогенную микробиоту [1].

Сокращения: МКБ – молочнокислые бактерии; СПА – сухой питательный агар.

Многие виды МКБ продуцируют антимикробный компонент широкого спектра действия – реутерин. Так, реутерин продуцируется некоторыми штаммами *Lactobacillus reuteri* во время анаэробной ферментации глицерина. Биосинтез реутерина осуществляется путем превращения глицерина в 3-гидроксипропиональдегид (3-НРА) с участием В12-зависимой глицеролдегидратазы [2]. В водном растворе реутерин представляет собой динамическую систему, состоящую из 3-НРА, его гидрата 1,1,3-пропантриола, его димера 2-(2-гидроксиэтил)-4-гидрокси-1,3-диоксана и акролеина [2, 3]. Недавно было показано, что акролеин является основным компонентом данной динамической системы, который отвечает за антимикробную активность реутерина [3]. Взаимопревращения 3-НРА и акролеина не происходит при температуре 4 °С и рН 4, тогда как при более высоких температурах равновесие смещено в сторону акролеина [3]. 3-НРА может далее превращаться в 1,3-пропандиол (1,3-PD) в присутствии глюкозы с участием никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺)-зависимой оксидоредуктазы [4].

Хотя первоначально продукция реутерина была обнаружена у вида *Lb. reuteri*, который является частью эндогенной бактериальной микробиоты как у людей, так и у животных, позднее было показано, что такие виды лактобацилл, как *Lactobacillus brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. collinoides* и *Lb. coryniformis* также способны синтезировать данное соединение [5]. Помимо лактобацилл синтезировать реутерин могут также бактерии рода *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter* и *Klebsiella*, однако, у всех остальных видов бактерий промежуточный продукт метаболизма глицерина – реутерин – распадается до 1,3-пропандиола и далее до воды и углекислого газа. И только у *Lb. reuteri* эффективность оксидоредуктазы, разрушающей реутерин, в анаэробных условиях, достаточно низкая, что способствует накоплению реутерина в концентрациях, токсичных для других бактериальных клеток.

Реутерин водорастворим, эффективен в широком диапазоне рН, устойчив к протеолитическим и липолитическим ферментам, и поэтому изучен как пищевой консервант или вспомогательное терапевтическое средство [6–8]. Реутерин синтезируется *in vitro* при рН, температуре и анаэробных условиях, близких к условиям желудочно-кишечного тракта [9]. *In vivo* биосинтез активного реутерина может происходить в толстой кишке в про-

цессе метаболизма кишечной микробиоты, в том числе *Lb. reuteri*, при наличии достаточного количества глицерина, который является продуктом микробиологического брожения и переваривания жиров в просвете кишечника [9, 10].

Lb. reuteri представляет собой облигатную гетероферментативную молочнокислую палочку, обитающую в желудочно-кишечном тракте людей и животных [11, 12]. Поиск штаммов способных эффективно синтезировать антимикробные бактериоциноподобные соединения (в том числе реутерин) представляет большой практический интерес, поскольку, с одной стороны, *Lb. reuteri* является доминирующим видом лактобактерий кишечника у многих видов млекопитающих и птиц [13, 14], а с другой стороны, благодаря биохимическим свойствам и широкому спектру антимикробного и фунгицидного действия, реутерин и другие подобные соединения обладают высоким потенциалом в качестве пищевого консерванта [1, 15, 16] и антимикробного терапевтического средства [7, 8].

Существенное значение для увеличения выхода бактериоциноподобных соединений, продуцируемых МКБ, имеет состав питательной среды и параметры культивирования штамма-продуцента. Изменяя параметры культивирования, удастся регулировать выход бактериоциноподобных соединений [17, 18]. Так, например, показано, что продукция низин-подобного бактериоцина штаммом *Lactococcus lactis* происходит эффективно на средах MRS и M17 [19, 20].

При использовании тех или иных сред для культивирования микроорганизмов с целью выяснения их антибиотических свойств большое значение имеет качественная характеристика отдельных компонентов [21]. Источники азота оказывают важное влияние на образование антибиотических веществ микроорганизмами. Обычно в средах для культивирования микроорганизмов источниками азота служат соли азотной или реже соли азотистой кислоты, аммонийные соли органических или неорганических кислот, или аминокислоты, белки и продукты их гидролиза (пептоны, гидролизаты). В качестве источника углерода используются дисахариды, полисахариды, спирты и кислоты. На одних источниках углерода развитие организма и биосинтез бактериоцина происходит хорошо, на других – организм или не развивается, или не синтезирует бактериоцин. [21]. При биосинтезе большинства продуктов обмена веществ микроорганизмов в состав сред входят неорганические фосфорсодержащие соединения

в виде фосфат-ионов. Они необходимы для роста микроорганизмов и синтеза многих жизненно важных соединений.

Активная кислотность (рН) питательной среды, как и ее состав, существенно влияют на развитие микроорганизмов, на характер их обмена и, следовательно, на процесс образования бактериоциноподобных соединений [22].

Цель настоящей работы – оптимизация состава питательной среды и условий культивирования для эффективного биосинтеза штаммом *Lb. reuteri* LR1 бактериоциноподобных соединений, в частности, предположительно реутерина.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Культуры

В работе использовался штамм лактобацилл *Lb. reuteri* LR1 из фонда Коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ, Москва, Россия). Инокулят *L. reuteri* LR1 получали культивированием в MRS-бульоне («Биокомпас-С», Россия) при температуре (37±1) °С.

В качестве тест-штаммов были использованы грамотрицательные *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 и грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Штаммы *E. coli* ATCC 25922 и *St. aureus* ATCC 6538 были получены из ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, штамм *S. typhimurium* был предоставлен ФГБУ ГИСК им. Л. А. Тарасевича Минздравсоцразвития России.

Тестируемые штаммы *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028 и *St. aureus* ATCC 6538 выращивали на скошенном питательном агаре при температуре (37±1) °С.

Антагонистическая активность

Антагонистическую активность штамма *Lb. reuteri* LR1 определяли методом смешанных популяций в сравнении с ростом тест-штаммов в монокультурах [23]. Совместное культивирование проводили в 20 мл питательной среды MRS-бульон при температуре (37±1) °С, куда вносили по 1 мл инокулятов *Lb. reuteri* LR1 и тестируемого штамма. Подсчет количества клеток тест-штамма, выросших в монокультуре на среде СПА («Биокомпас-С») (приняты за 100%) и в со-культуре, проводили через 24 и 48 ч культивирования.

Определение биосинтеза бактериоциноподобных соединений

Биосинтез бактериоциноподобных соединений, в том числе предположительно реутерина, продуцируемых штаммом *Lb. reuteri* LR1, определяли по изменению антимикробной активности против выбранного индикаторного тест-штамма методом диффузии в агар с использованием лунок в толще агара [24]. Для этого индикаторный штамм *E. coli* ATCC 25922 культивировали при температуре (37±1) °С в течение 24 ч на скошенном питательном агаре, затем готовили суспензию клеток, которую в количестве 1% вносили в регенерированную питательную среду СПА с добавлением Твин 80 (Sigma, США) при температуре (45±2) °С, тщательно перемешивали и разливали в стерильные чашки Петри так, чтобы толщина слоя питательной среды составляла 5 мм. После застывания питательной среды стеклянной трубкой делали лунки диаметром 5 мм, в которые вносили тестируемые образцы. Чашки выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч, затем инкубировали при температуре (37±1) °С. Измерение диаметра зоны ингибирования роста индикаторного штамма проводили через 24 ч.

Оптимизация условий культивирования

Для определения оптимального содержания глицерина в ростовой среде MRS-бульон, в среду вносили 1% инокулята *Lb. reuteri* LR1 и культивировали при температуре (37±1) °С в течение 24 ч. Затем наращенную культуру вносили в 50 мл среды MRS-бульон и культивировали 3 ч при температуре (37±1) °С, после чего по 5% культуры вносили в питательную среду MRS-бульон с различным количеством глицерина (0 мМ, 50, 100, 150, 200, 250, 350, 450 мМ) и культивировали 18 ч при температуре (37±1) °С. По окончании культивирования образцы центрифугировали при 14000 g. в течение 10 мин, надосадочную жидкость пропускали через фильтр с размером пор 0,22 мкм (Sartorius, США). После этого в образцах определяли антимикробную активность методом диффузии в агар с использованием лунок в толще агара, как описано выше.

Для определения оптимального содержания глицерина в водно-глицериновой среде для биоконверсии в антимикробные бактериоциноподобные соединения (предположительно реутерин) накопленные в питательной среде клетки *Lb. reuteri* LR1 отделяли центрифугированием, проводили промывку полученной биомассы и вносили ее в водно-глицериновую среду с содержанием

глицерина 150 мМ, 200 и 250 мМ, термостагировали 2 ч при температуре 37 ± 1 °С. После термостагирования (биоконверсии) водно-глицериновую среду с *Lb. reuteri* LR1 центрифугировали при 14000 g 10 мин., полученный супернатант фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм, затем тестировали антимикробную активность методом луночной диффузии в агар, как описано выше.

Для изучения влияния активной кислотности питательной среды на продукцию антимикробных бактериоциноподобных соединений (предположительно реутерина) были выбраны следующие значения pH: 5,8; 6,0; 6,2; 6,4; 6,6. Культивирование *Lb. reuteri* LR1 проводили в биореакторах фирмы DAS GIP (Германия) в условиях периодического культивирования при постоянной нейтрализации питательной среды 20%-ным водным раствором NaOH для поддержания значений активной кислотности на заданном уровне (указано выше), при постоянном перемешивании со скоростью вращения мешалки 60 об./мин.

Для исследования влияния различных источников азота на рост биомассы *Lb. reuteri* и накопление антимикробных соединений (предположительно реутерина) был составлен центральный композиционный план для 3-факторного эксперимента (табл. 1).

Таблица 1

Центральный композиционный план для поверхности отклика (%)

Design of experiment for carbon source and carbon content in nutrient medium optimization (%)

Номер п/п	Пептон	Дрожжевой экстракт	Гидролизованное молоко
1	1,0	0,5	0,0
2	0,5	0,5	25,0
3	0,0	1,0	25,0
4	0,0	0,5	0,0
5	0,5	1,0	0,0
6	0,5	1,0	50,0
7	0,0	0,5	50,0
8	0,5	1,0	25,0
9	0,0	1,5	50,0
10	0,0	1,5	0,0
11	1,0	1,5	0,0
12	1,0	1,0	25,0
13	0,5	1,0	25,0
14	0,5	1,5	25,0
15	1,0	0,5	50,0
16	1,0	1,5	50,0

В качестве независимых факторов были выбраны такие источники азота как пептон с уровнями фактора 0, 0,5 и 1%, дрожжевой экстракт с уровнями фактора 0,5, 1 и 1,5% и гидролизованное молоко с уровнями фактора 0, 25 и 50%. Влияние эффектов каждого фактора, а также их взаимодействий были оценены с использованием метода ANOVA. Разница в значениях для каждого фактора была проанализирована в тестах парного сравнения, различия принимались за статистически значимые на уровне значимости $p \leq 0.05$.

Все экспериментальные работы проводились в 3-, 5-кратной повторности.

Математическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью методов статистики и регрессионного анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Office и Statistica 10. Для эффективной постановки опытов и выбора рациональных параметров использовали метод математического планирования эксперимента. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента, полученные регрессионные зависимости проверяли на адекватность экспериментальным данным по критерию Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Антагонистическая активность штамма *Lactobacillus reuteri* в отношении индикаторных тест-культур

Ранее было показано, что штамм *Lb. reuteri* LR1, выделенный в 2014 г. из фекал здорового человека, оказывает пробиотический эффект *in vivo* [25] и обладает выраженной антагонистической активностью в отношении клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, характеризующихся множественной устойчивостью к антибиотикам [23].

Как и другие пробиотические микроорганизмы, *Lb. reuteri* может синтезировать различные антимикробные соединения, в том числе реутерин, обладающий широким спектром антимикробного действия и образующийся во время анаэробного метаболизма глицерина. Реутерин обладает мощным антимикробным действием против бактерий, дрожжей, грибов и простейших [26–28]. Хорошо известно, что способность синтезировать различные антимикробные бактериоциноподобные соединения, включая биосинтез реутерина, является штамм-специфичной характеристикой. Так, разные штаммы *Lb. reuteri* могут синтезировать различные количества данных соединений или не продуцировать вовсе.

Для изучения способности штамма *Lb. reuteri* синтезировать антимикробные соединения, необходимо было выбрать условно-патогенный индикаторный штамм, подходящий для определения активности бактериоциноподобных соединений, продуцируемых *Lb. reuteri*. В качестве тест-штаммов в данной работе были использованы три условно-патогенных микроорганизма – *E. coli*, *S. typhimurium* и *St. aureus*, количество которых нормируется в продуктах питания на законодательном уровне. Антимикробная активность *Lb. reuteri* по отношению к выбранным тест-штаммам показана на рис. 1.

Наибольшую активность *Lb. reuteri* проявлял по отношению к штамму *E. coli*, количество жизнеспособных клеток после со-культивирования с *Lb. reuteri* снизилось на 2,741 lg(KOE/мл) и 5,24 lg(KOE/мл) через 24 ч и 48 ч соответственно. Действительно, недавно было показано, что грамположительные микроорганизмы, такие как *St. aureus*, могут быть более устойчивы к действию антимикробных соединений, например реутерина, нежели грамотрицательные, причем среди последних наиболее чувствительной к реутерину оказалась *E. coli* DH5 α . [29]. Таким образом, как наиболее подходящий индикаторный штамм был выбран *E. coli*, чья выживаемость в процессе совместного культивирования с *Lb. reuteri* была значительно ниже, чем у остальных тестируемых штаммов бактерий.

Оптимизация состава питательной и водно-глицериновой сред

Поскольку известно, что продукция такого бактериоциноподобного соединения, как реуте-

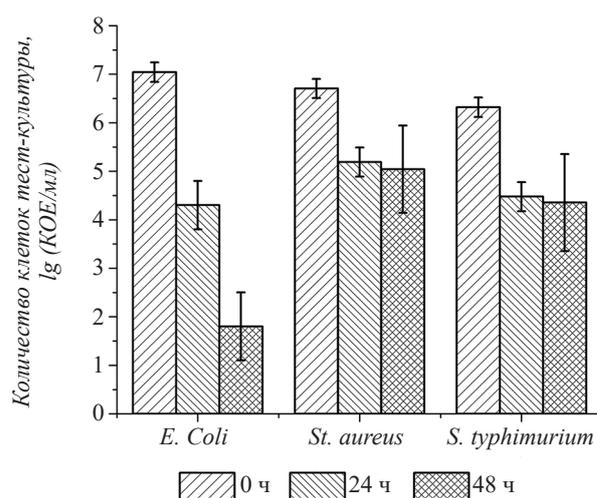


Рис. 1. Антагонистическая активность *Lactobacillus reuteri* по отношению к индикаторным тест-штаммам условно-патогенных микроорганизмов *E. coli*, *S. typhimurium* и *St. aureus*.

Fig. 1 Antagonistic activity of *Lactobacillus reuteri* towards test strains of opportunistic pathogens *E. coli*, *S. typhimurium* and *St. aureus*.

рин, культурой *Lb. reuteri* увеличивается в питательной среде в присутствии глицерина, было исследовано влияние различного количества глицерина в питательной среде культивирования на накопление антимикробных соединений (предположительно реутерина) штаммом *Lb. reuteri*. Как видно на рис. 2а, активность культуральных жидкостей штамма *Lb. reuteri* против индикаторной культуры *E. coli* имела наибольшие значения при концентрации глицерина в культуральной среде 150 мМ и 200 мМ. При этом статистически

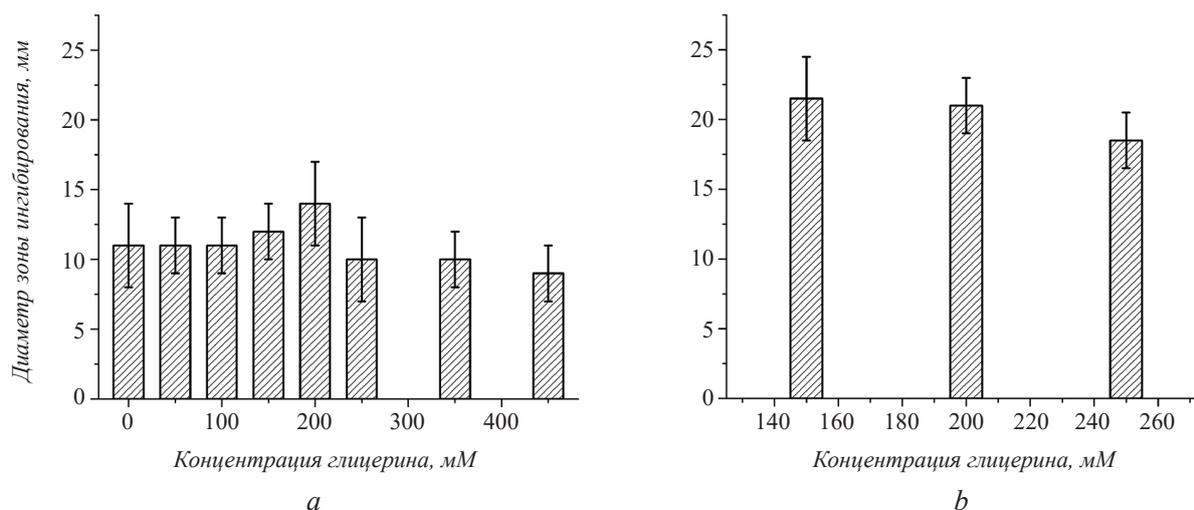


Рис. 2. Антимикробная активность *Lactobacillus reuteri* в отношении индикаторного тест-штамма *E. coli*. а – культивирование в среде MRS-бульон с глицерином; б – супернатант после биоконверсии глицерина в водно-глицериновой среде при поэтапном способе культивирования

Fig. 2. Antagonistic activity of *Lactobacillus reuteri* towards test strain *E. coli*. (a), cultivation on MRS-medium supplemented with glycerol; (b), cultivation on water-glycerol medium after preliminary cultivation on MRS-medium

значимых различий в антимикробной активности при внесении глицерина (150 и 200 мМ) в среду культивирования не наблюдалось, однако, при увеличении концентрации глицерина в среде более 200 мМ антимикробная активность заметно падала (рис. 2а).

Также было установлено, что при культивировании на питательной среде MRS-бульон с добавлением 150 и 200 мМ глицерина через определенный промежуток времени происходит гибель клеток *Lb. reuteri* (рис. 3)

Действительно известно, что реутерин в концентрации от 15 до 30 мг/мл подавляет рост грамотрицательных и большинства грамположительных бактерий, дрожжей, грибов и простейших, в концентрациях 60–150 мг/мл реутерин токсичен для лактобактерий, включая собственно *Lb. reuteri* [30].

Поскольку биосинтез антимикробных соединений, в том числе реутерина, осуществляется только живыми бактериальными клетками и при их выделении также возникает необходимость очистки от питательной среды сложного состава, целесообразно было использовать поэтапное культивирование штамма *Lb. reuteri*: сначала на питательной среде для накопления клеточной биомассы, а затем в водно-глицериновой среде для биоконверсии глицерина в антимикробные соединения (предположительно реутерин).

Было показано, что в диапазоне концентраций глицерина 150–250 мМ зоны ингибирования роста индикаторного тест-штамма были заметно больше при двухэтапном способе культивирования – 19–23 мм против 12–14 мм при культивировании *Lb. reuteri* на MRS-бульоне с добавлением глицерина (рис. 2). Поскольку при содержании глицерина в водно-глицериновой среде в количестве 150 и 200 мМ антимикробная активность супернатантов статистически значимо не различалась, но при этом была несколько выше, чем при содержании глицерина 250 мМ (рис. 2b), все дальнейшие исследования проводили при внесении глицерина в водно-глицериновую среду в количестве 200 мМ.

Следующим шагом в исследовании была оптимизация состава питательной среды – первый этап культивирования *Lb. reuteri* при поэтапном способе. Было исследовано влияние различных источников азота, углеводов и солей на рост биомассы *Lb. reuteri* и накопление антимикробных соединений (предположительно реутерина).

В качестве азотсодержащего компонента среды для накопления антимикробных соединений, продуцируемых *Lb. reuteri*, использовали пептон, дрожжевой экстракт и гидролизованное молоко при фиксированных условиях культивирования в бутылочках емкостью 150 мл: начальное значение pH – 6,2, температура культивирования – (37±1) °С, количество глюкозы в среде – 2%.

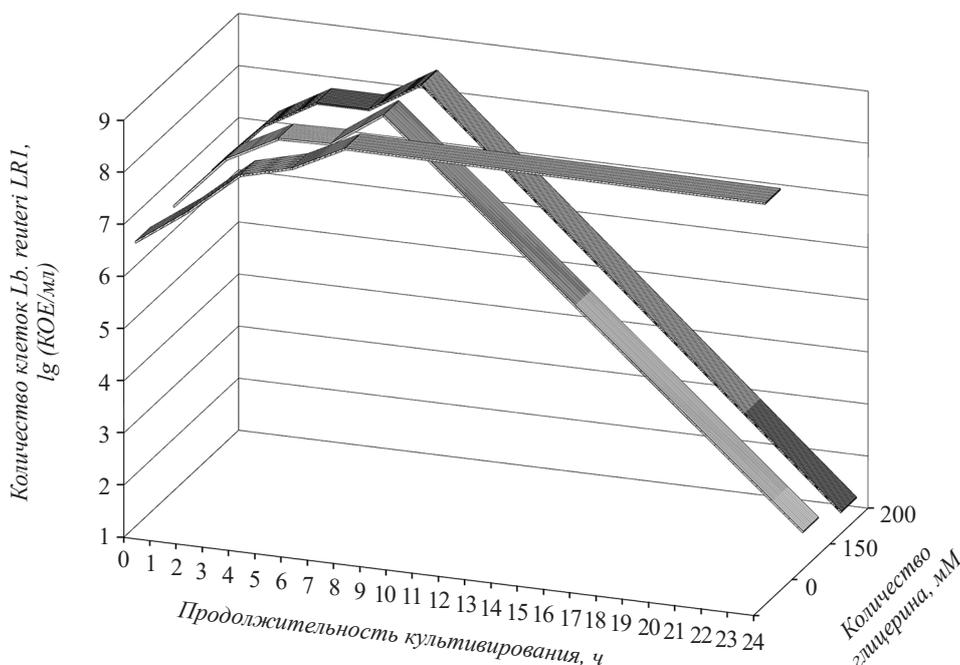


Рис. 3. Динамика изменения количества клеток *Lactobacillus reuteri* LR1 при культивировании на питательной среде MRS-бульон с добавлением различного количества глицерина

Fig. 3. *Lactobacillus reuteri* LR1 growth on nutrient media MRS-бульон containing various glycerol concentration

Результаты проведенных исследований показали, что такие факторы (компоненты) как гидролизованное молоко, дрожжевой экстракт, а также сочетание пептона и гидролизованного молока статистически значимо ($p \leq 0,05$) влияли на величину антимикробной активности *Lb. reuteri*, в то время как сочетания факторов пептон и дрожжевой экстракт, дрожжевой экстракт и гидролизованное молоко статистически значимого влияния на величину антимикробной активности не оказывали (рис. 4). На основании проведенных исследований в качестве источников азота для питательной среды были выбраны гидролизованное молоко в количестве 25%, дрожжевой экстракт – 1,0% и пептон – 0,5%.

При выборе источников углеводов в составе оптимизированной по источнику азота питательной среды исследовали влияние глюкозы, лактозы и сахарозы отдельно и в смеси на накопление биомассы и биосинтез бактериоциноподобных соединений. Однако в результате проведенных исследований было установлено, что исследуемые углеводы на продукцию антимикробных соединений штаммом *Lb. reuteri* статистически значимого влияния не оказывали (табл. 2). Исходя

из совокупности полученных данных, в качестве углевода в состав питательной среды для культивирования на основе гидролизованного молока, дрожжевого экстракта и пептона была выбрана глюкоза в количестве 20 г/л.

В состав сред для культивирования *Lactobacillus*, как правило, входят следующие соли: фосфат калия однозамещенный, натрий уксуснокислый, аммоний цитрат 2-замещенный, магний сернокислый, марганец сернокислый [31]. В состав ранее разработанной среды для культивирования *Lb. reuteri* входили следующие соли: фосфат калия однозамещенный – 2 г/л, натрий уксуснокислый – 5 г/л, магний сернокислый – 2 г/л, марганец сернокислый – 0,05 г/л [31]. Для исследования влияния указанных солей на биосинтез антимикробных соединений (предположительно реутерина), продуцируемых *Lb. reuteri*, был составлен центральный композиционный план для 4-факторного эксперимента, в котором в качестве независимых факторов использовали фосфат калия однозамещенный с уровнями фактора 0 г/л, 2 и 4 г/л, натрий уксуснокислый с уровнями фактора 0 г/л, 2,5 и 5 г/л, магний сернокислый с уровнями фактора 0,2 г/л, 1,1 и 2 г/л и марганец

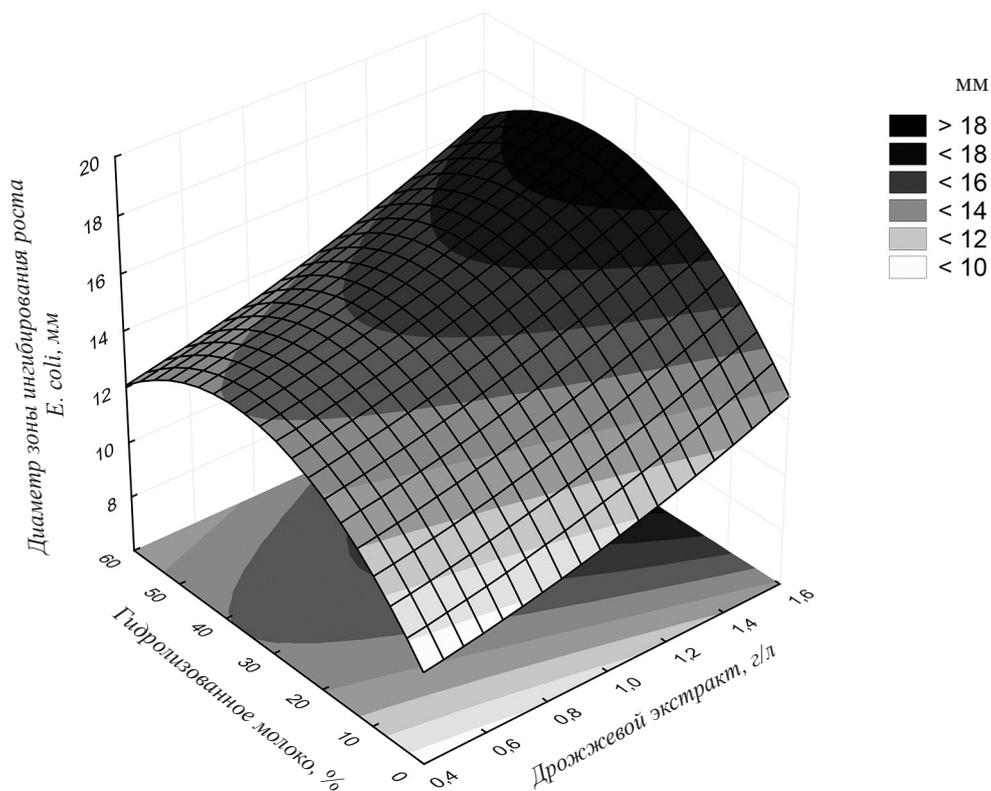


Рис. 4. Поверхность отклика для определения антимикробной активности реутерина при использовании различных источников азота в составе питательной среды культивирования *Lactobacillus reuteri*

Fig. 4. Effect of various nitrogen sources on antagonistic activity of *Lactobacillus reuteri* towards test strain *E. coli*

Таблица 2

Влияние различных источников углеводов в питательной среде культивирования *Lactobacillus reuteri* на продукцию бактериоциноподобных соединений (предположительно реутерина), выраженное диаметром зоны ингибирования роста индикаторного тест-штамма *E. coli*

The effect of various carbon sources on bacteriocin-like compounds production (presumably reuterin) by *Lactobacillus reuteri* (estimated by inhibition zone of *E. coli* test strain growth)

Варьируемый фактор, %			pH	Биомасса, г	Диаметр зоны ингибирования роста, мм
Глюкоза	Лактоза	Сахароза			
0,0	0,0	2,0	4,66	1,25	15,25±0,96
2,0	0,0	2,0	4,54	1,07	17,50±0,73
0,0	2,0	0,0	4,61	1,19	14,75±0,26
2,0	2,0	2,0	4,46	1,10	19,75±0,26
2,0	0,0	0,0	4,61	0,94	16,00±0,15
0,0	2,0	2,0	4,50	1,12	17,25±0,22
0,0	0,0	0,0	4,75	1,34	14,50±0,73
2,0	2,0	0,0	4,50	1,00	17,25±0,96

сернистый с уровнями фактора 0 г/л, 0,25 и 0,5 г/л (табл. 3). На основании плана эксперимента было составлено 18 питательных сред и проведены исследования по влиянию указанных солей на антимикробную активность *Lb. reuteri*. Наибольшая антимикробная активность, выраженная диаметром зоны ингибирования роста *E. coli* на-

блюдалась в питательных средах № 8, 10, 11, 13 и 17 (зона ингибирования роста *E. coli* составляла 20–22 мм) (табл. 3). Статистически значимого влияния на продукцию антимикробных соединений (предположительно реутерина) исследуемые соли не оказывали. Наибольшие зоны ингибирования роста *E. coli* – (21,75±1,5) мм – наблюдались

Таблица 3

Влияние различных солей на биосинтез антимикробных бактериоциноподобных соединений (предположительно реутерина)

The effect of various salts on antimicrobial bacteriocin-like compounds biosynthesis (presumably reuterin)

№ среды	Варьируемый фактор, г/л				pH	Диаметр зоны ингибирования роста <i>E. coli</i> , мм
	Натрий уксуснокислый	Фосфат калия однозамещенный	Магний серно-кислый	Марганец серно-кислый		
1	5,0	0,0	0,2	0,50	4,20	16,75±0,50
2	2,5	2,0	1,1	0,00	4,03	17,50±0,58
3	2,5	2,0	1,1	0,25	4,09	18,00±0,82
4	2,5	2,0	1,1	0,25	4,23	16,50±0,58
5	0,0	4,0	2,0	0,50	4,20	16,00±0,50
6	5,0	4,0	2,0	0,00	4,20	16,00±0,50
7	0,0	2,0	1,1	0,25	4,24	17,25±0,50
8	5,0	2,0	0,2	0,50	4,22	21,75±1,50
9	2,5	4,0	1,1	0,25	4,39	19,25±0,96
10	0,0	4,0	0,2	0,50	4,16	20,00±0,50
11	5,0	2,0	1,1	0,25	4,18	20,50±0,58
12	5,0	0,0	2,0	0,50	4,22	19,00±0,82
13	2,5	2,0	0,2	0,25	4,15	20,00±0,50
14	5,0	4,0	0,0	0,00	4,31	17,50±0,57
15	2,5	2,0	1,1	0,50	4,35	19,25±0,50
16	5,0	0,0	0,2	0,50	4,33	18,50±2,38
17	2,5	2,0	1,1	0,00	4,40	20,25±0,50
18	2,5	2,0	1,1	0,25	4,23	18,00±2,31

Влияние различных значений pH питательной среды на продукцию антимикробных бактерициноподобных соединений (предположительно реутерина) штаммом *Lactobacillus reuteri*

The pH effect of the nutrient medium on the antimicrobial bacteriocin-like compounds production (presumably reuterin) by the strain *Lactobacillus reuteri*

Показатель	pH				
	5,8	6,0	6,2	6,4	6,6
Количество клеток <i>Lb. reuteri</i> , lg (КОЕ/мл)	8,7±0,34	8,8±0,21	8,9±0,11	9,3±0,23	8,7±0,15
Диаметр зоны ингибирования роста тест-штамма <i>E. coli</i> , мм	17±1,41	19±1,41	22±1,41	23±1,41	21±1,06

при содержании в питательной среде натрия уксуснокислого – 5,0 г/л, фосфата калия однозамещенного – 2,0 г/л, магния сернокислого – 0,2 г/л и марганца сернокислого – 0,5 г/л.

Оптимизация условий культивирования штамма *Lactobacillus reuteri*

При определении закономерностей накопления антимикробных соединений (предположительно реутерина), продуцируемых *Lb. reuteri* были проведены исследования по влиянию значений pH питательной среды, оптимизированной на первом этапе работы, вносимого в питательную среду количества инокулята; различных значений начальной активной кислотности водно-глицериновой среды, температуры и продолжительности биоконверсии на накопление антимикробных соединений.

Наибольшая продукция антимикробных соединений (предположительно реутерина) наблюдалась при значении pH среды 6,2–6,4, при этом зона ингибирования роста тест-штамма *E. coli* составила 22–23 мм (табл. 4).

При проведении исследований по влиянию количества вносимого инокулята *Lb. reuteri* доза инокулята составляла 1%, 3, 5 и 10%. Культивирование проводили на оптимизированной питательной среде в течение 18 ч при температуре (37±1) °С, начальное значение pH среды составляло 6,2. Наибольшее накопление антимикробных соединений было отмечено при вносимой дозе инокулята 5 и 10%, диаметр зоны ингибирования роста *E. coli* при этом составлял 24,5–24,8 мм, что коррелировало с количеством биомассы и клеток *Lb. reuteri*.

При проведении исследований по определению оптимальной продолжительности биоконверсии глицерина в антимикробные соединения (предположительно реутерин) в водно-глицериновой среде варьировали время (от 1 до 4 ч) и температу-

ру (30 и 37 °С) биоконверсии. При этом клеточную биомассу *Lb. reuteri* культивировали в питательной среде также при двух показаниях температуры – 30 и 37 °С, поскольку по литературным данным оптимальная температура для накопления реутерина составляет 30 и 37 °С [32]. Показано, что температура культивирования *Lb. reuteri* и температура биоконверсии в водно-глицериновой среде статистически значимо влияют на выработку антимикробных соединений (предположительно реутерина) (рис. 5). Наибольшие зоны ингибирования роста *E. coli* (24,7±0,3 мм) были получены при температуре культивирования штамма-продуцента *Lb. reuteri* – 37 °С, при температуре и продолжительности биоконверсии 37 °С и 2 ч, соответственно (рис. 5а, 5с). При температуре биоконверсии 30 °С зоны ингибирования роста тест-штамма были меньше по сравнению с 37 °С, при этом наибольшие значения были отмечены через 4 ч инкубирования (рис. 5б).

Для исследования влияния начальных значений pH водно-глицериновой среды на биоконверсию глицерина в антимикробные соединения (предположительно реутерин) штаммом *Lactobacillus reuteri* начальные значения pH изменяли от 5,4 до 6,8 ед. с шагом 0,2, при этом значение активной кислотности по окончании биоконверсии во всех образцах составляло 4,2±0,2:

pH водно-глицериновой среды	Диаметр зоны ингибирования роста <i>E. coli</i> , мм
5,4	24,50±0,71
5,6	24,50±0,71
5,8	24,25±0,35
6,0	24,50±0,71
6,2	23,50±2,12
6,4	24,50±0,71
6,6	24,75±0,35
6,8	22,50±2,12

Показано, что антимикробная активность *Lb. reuteri*, выраженная диаметром зоны ингибирования роста тест-штамма *E. coli*, изменялась незначительно от $(22,50 \pm 2,12)$ до $(24,75 \pm 0,35)$ мм при всех выбранных начальных значениях pH среды. Наибольшая активность наблюдалась при начальном значении активной кислотности pH водно-глицериновой среды равной 6,6.

Таким образом, в работе показано, что пробиотический штамм *Lb. reuteri*, обладающий антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, синтезирует в присутствии глицерина бактериоциноподобное соединение – предположительно реутерин. Оптимальным способом для эффективного биосинтеза антимикробных соединений (предположительно реутерина) является двухэтапное культивирование: сначала в питательной среде для накопления клеточной биомассы, затем в водно-глицериновой среде для биоконверсии глицерина в предположительно реутерин.

При этом оптимальный состав питательной среды для наращивания клеточной биомассы *Lb. reuteri* следующий: гидролизованное молоко – 25%; дрожжевой экстракт – 1,0%; пептон – 0,5%; глюкоза – 20 г/л; натрий уксуснокислый – 5,0 г/л; фосфат калия однозамещенный – 2,0 г/л; магний сернокислый – 0,2 г/л; марганец сернокислый – 0,5 г/л. Штамм-продуцент *L. reuteri* вносят в количестве 5% при значениях pH среды 6,4–6,6, температуры 37 °С и продолжительности культивирования в течение 18 ч. После этого клетки отделяют центрифугированием, промывают полученную биомассу и вносят в водно-глицериновую среду для биоконверсии глицерина в бактериоциноподобное соединение – предположительно реутерин. При этом содержание глицерина в водно-глицериновой среде составило 200 мМ, исходное значение pH 6,6, температура и продолжительность биоконверсии – 37 °С и 2 ч, соответственно. Диаметр зоны ингибирования роста тест-штамма *E. coli* полученным раствором составил около 25 мм.

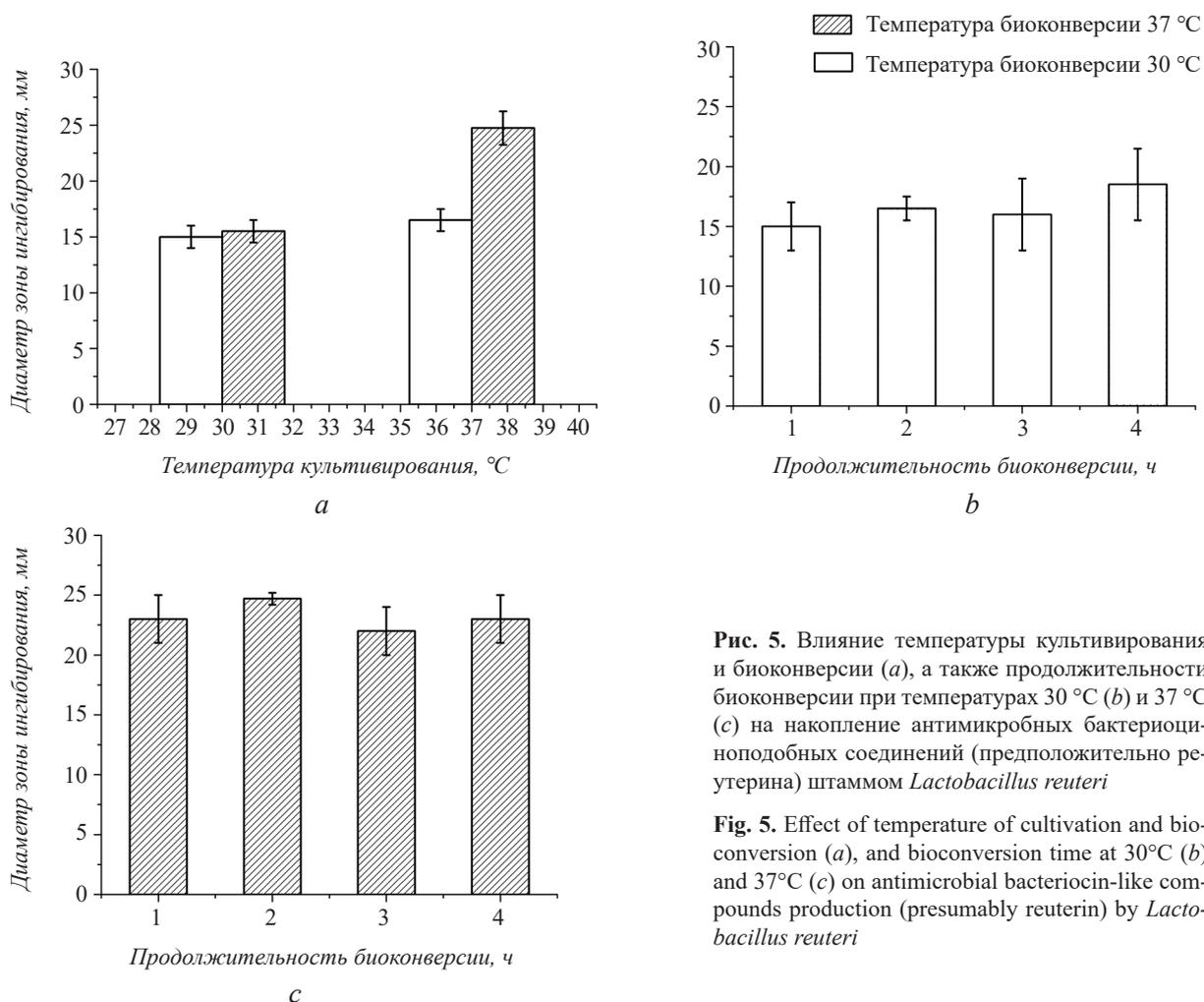


Рис. 5. Влияние температуры культивирования и биоконверсии (а), а также продолжительности биоконверсии при температурах 30 °С (b) и 37 °С (с) на накопление антимикробных бактериоциноподобных соединений (предположительно реутерина) штаммом *Lactobacillus reuteri*

Fig. 5. Effect of temperature of cultivation and bioconversion (a), and bioconversion time at 30°C (b) and 37°C (c) on antimicrobial bacteriocin-like compounds production (presumably reuterin) by *Lactobacillus reuteri*

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00094).

ЛИТЕРАТУРА

- Özogul F., Hamed I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Critical Rev. Food Sci. Nutrition*, 2018, 58(10), 1660–1670. doi: 10.1080/10408398.2016.1277972
- Vollenweider S., Lacroix C. 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 64, 16–27. doi: 10.1007/s00253-003-1497-y
- Engels C., Schwab C., Zhang J., Stevens M., et al. Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin. *Sci. Rep.*, 2016, 6:36246. doi: 10.1038/srep36246
- Stevens M.J.A., Vollenweider S., Mertes P., Lacroix C. Bisulfite as scavenger for enhanced biotechnological production of 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri*. *Biochem. Eng. J.*, 2013, 79, 239–245. doi: 10.1016/j.bej.2013.08.002
- Bianchini A., Bullerman L.B. Biological control of molds and mycotoxins in foods. In: *Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture*. Ed.(s): M. Appell, D. F. Kendra and M. W. Trucksess. Washington, DC: American Chemical Society, 2009, V. 1031. Ch. 1, 1–16. doi: 10.1021/bk-2009-1031.ch001
- Hossain Md.I., Sadekuzzaman M., Ha S.-D. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Res. Int.*, 2017, 100(1), 63–73. doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.077
- Urrutia-Baca V.H., Escamilla-García E., de la Garza-Ramos M.A., et al. In vitro antimicrobial activity and down-regulation of virulence gene expression on *Helicobacter pylori* by Reuterin. *Probiotics Antimicrobiol. Proteins*, 2018, 10(2), 168–175. doi: 10.1007/s12602-017-9342-2
- Mishra S.K., Malik R.K., Panwar H., Barui A.K. Microencapsulation of reuterin to enhance long-term efficacy against food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *3-Biotech.*, 2018, 8–23. doi: 10.1007/s13205-017-1035-8
- Zhang J., Sturla S., Lacroix C., Schwab C. Gut microbial glycerol metabolism as an endogenous acrolein source. *MBio*, 2018, 9, e01947-17. doi: 10.1128/mBio.01947-17
- Uchida K., Kanematsu M., Morimitsu Y., et al. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 16058–16066. doi: 10.1074/jbc.273.26.16058.
- Valeur N., Engel P., Carbajal N., et al. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70(2), 1176–1181.
- Urbańska M., Szajewska H. The efficacy of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infants and children: a review of the current evidence. *Eur. J. Pediatrics*, 2014, 173(10), 1327–1337. doi: 10.1007/s00431-014-2328-0
- Hou C., Zeng X., Yang F., Liu H., Qiao S. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *J. Animal Sci. Biotechnol.*, 2015, 6:14. doi: 10.1186/s40104-015-0014-3.
- Стоянова Л. Г., Устюгова Е. А., Нетрусов А. И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор). *Прикл. биохим. микробиол.*, 2012, 48(3), 259–259. doi: 10.1134/S0003683812030143
- Montiel R., Martín-Cabrejas I., Medina M. Reuterin, lactoperoxidase, lactoferrin and high hydrostatic pressure on the inactivation of food-borne pathogens in cooked ham. *Food Control*, 2015, 51, 122–128.
- Ghanbari M., Jami M., Domig K.J., Kneifel W. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review. *LWT - Food Sci. Technology*, 2013, 54(2), 315–324. doi: 10.1016/j.lwt.2013.05.039
- Abo-Amer A.E., El-Deep B.A., Altalhi A.D. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AA135. *Roumanian Arch. Microbiol. Immunol.*, 2007, 67, 36–40;
- Chandrapati S., O’Sullivan D.J. Nisin independent induction of the nis A promoter in *Lactococcus lactis* during growth in lactose or galactose. *FEMS Microbiol. Letts.*, 1999, 170, 191–198. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13374.x
- Cheigh C.I., Choi H.J., Park H., et al. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like production bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *J. Biotechnol.*, 2002, 95, 225–235. doi: 10.1016/S0168-1656(02)00010-X
- Устюгова Е.А., Тимофеева А.В., Стоянова Л.Г., и др. Характеристика и идентификация бактериоцинов, образуемых *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2012, 48(6), 618–618. doi: 10.1134/S0003683812060105
- Кудряшов В.Л., Сергеева И.Д., Стоянова Л.Г., и др. Синтез биоконсерванта низина на отходах и вторичном сырье ряда биотехнологических производств. *Биотехнология*, 1995, (2), 25–28.
- Mastsusaki H., Endo N., Sonomoto K., Ishizaki A. Lantibiotic nisin Z fermentative production of the *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, 45(1–2), 36–40. doi: 10.1007/s002530050645
- Фёдорова Т.В., Васина Д.В., Бегунова А.В. и др. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий *Lactobacillus* spp. в отношении клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2018, 54(3), 264–276. doi: 10.1134/S0003683818030043
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках, Наука, М., 2004, 528.

25. Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Бегунова А.В. и др. Разработка биотехнологии кисломолочного продукта с *Lactobacillus reuteri* LR1 и исследование его функциональных свойств в эксперименте *in vitro* и *in vivo*. *Вопросы питания*, 2018, 87(5), 52–62. doi: 10.24411/0042-8833-2018-10053
26. Stevens M., Vollenweider S., Lacroix C. The potential of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* as a broad spectrum preservative in food. In: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Ed. C. Lacroix. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., 2010, 129–160.
27. Asare P.T., Greppi A., Stettler M., et al. Decontamination of minimally-processed fresh lettuce using reuterin produced by *Lactobacillus reuteri*. *Front. Microbiol.*, 2018, 9:1421. doi: 10.3389/fmicb.2018.01421
28. Vimont A., Fernandez B., Ahmed G., et al. Quantitative antifungal activity of reuterin against food isolates of yeasts and moulds and its potential application in yogurt. *Int. J. Food Microbiol.*, 2019, 289, 182–188. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.005
29. Ortiz-Rivera Y., Sánchez-Vega R., Gutiérrez-Méndez N., et al. Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 2017, 100:4258–4268. doi: 10.3168/jds.2016-11534
30. Chung, T.C., Axelsson L., Lindgren S.E., Dobrogosz W.J. In vitro studies on Reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Hlth. Dis.*, 1989, (2), 137–144. doi: 10.3109/08910608909140211
31. Раскошная Т.А., Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Бегунова А.В. Культивирование пробиотического микроорганизма *Lactobacillus reuteri*: конструирование питательной среды. *Молочная пром-ть*, 2015, (4), 26–27.
32. Chen Guo, Yang Daomao, Xiao Yaqin, Chen Hongwen. Influence of conditions on reuterin accumulation by the resting cell biotransformation process. *Chinese J. Chemical Engineering*, 2011, 19(6), 1023–1027. doi: 10.1016/S1004-9541(11)60086-4

Optimization of Conditions for *Lactobacillus reuteri* LR1 Strain Cultivation to Improve the Biosynthesis of Bacteriocin-Like Substances

A.V. BEGUNOVA¹, I.V. ROZHKOVA¹, T.I. SHIRSHOVA¹, O.A. GLAZUNOVA², and T.V. FEDOROVA^{2,*}

¹All-Russian Research Institute of Dairy Industry, Moscow, 115093 Russia

²Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Received September 12, 2019

Revised October 4, 2019

Accepted October 12, 2019

Abstract—The article presents the results of the study on optimization of culturing conditions to increase the production of a bacteriocin-like compounds, (presumably including reuterin) by the *Lactobacillus reuteri* LR1 strain. A strain *Escherichia coli* ATCC 25922, an opportunistic microorganism, the content of which is standardized in foods by the Food Safety Legislation was selected as an indicator of the antimicrobial activity. The nutrient medium for the *L. reuteri* LR1 cultivation was optimized to increase the production of bacteriocin-like compounds, and parameters of the producer phased growing were established: (1), the cultivation on the initial medium for biomass accumulation; and (2), the growth on a water-glycerol medium to converse glycerol to antimicrobial compounds, presumably reuterin. The first stage was carried out as follows: the *L. reuteri* LR1 strain culture (5%) was inoculated into a medium of the following composition: hydrolyzed milk – 250 mL/L; yeast extract – 10 g/L; peptone – 5 g/L; glucose – 20 g/L; sodium acetate – 5.0 g/L; monosubstituted potassium phosphate – 2.0 g/L; magnesium sulfate – 0.2 g/L and manganese sulfate – 0.5 g/L, pH 6.4–6.6. The process was carried out for 18 h at (37±1) °C. The second stage included the cultivation of the obtained biomass in a 200 mM glycerol-containing aqueous solution, pH 6.6, for 2 h at 37 °C. The inhibition zone of the test *E. coli* strain caused by the produced bacteriocin-like compounds was 25 mm.

Key words: bacteriocin-like compounds, *Lactobacillus reuteri*, antimicrobial activity, reuterin, glycerol bioconversion, optimization of culturing conditions

Funding—This study was partially supported by the Russian Science Foundation (Project no. 16-16-00094).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-58-69