DOI: 10.26693/jmbs05.04.240

УДК 615.372:[579.864.1+579.873.13]:577.112

Ісаєнко О. Ю.¹, Бабич Є. М.¹, Горбач Т. В.²,
Семенченко О. Ю.³, Коцар О. В.²

ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФІЧНЕ ФРАКЦІОНУВАННЯ МЕТАБОЛІТНИХ КОМПЛЕКСІВ *L. RHAMNOSUS* GG І *S. BOULARDII* ТА ЇХ ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ

¹Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

²Харківський національний медичний університет, Україна

³Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України,
Харків, Україна

el_isaenko@ukr.net

Метою роботи стало вивчення складу метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* за допомогою хроматографічного фракціонування та протимікробної активності відносно антибіотикорезистентних збудників для створення протимікробних поліфункціональних кандидат-препаратів нового покоління.

Дезінтеграції, що являють собою структурні компоненти, одержані низькочастотною ультразвуковою обробкою пробіотичних клітин *L. rhamnosus* GG або *S. boulardii*. Метаболітні комплекси отримано за авторським способом культивуванням лактобактерій та сахароміцетів у власних дезінтегратах, сахароміцетів та комбінації сахароміцетів з лактобактеріями – в дезінтегратах лактобактерій. Фракціонування речовин *L. rhamnosus* і *S. boulardii* здійснювали за допомогою гелі-проникаючої хроматографії. Протимікробну активність відносно антибіотикорезистентних штамів *Staphylococcus epidermidis* PR, *Enterobacter cloacae* PR, *Enterococcus faecalis* PR вивчали якісним методом.

Встановлено багатокомпонентність всіх дослідних зразків з переважним вмістом пептидних компонентів (~ 87 % – ~ 98 %) та меншою питомою вагою фракцій з молекулярними масами ≥ 12 кДа (~ 2 % – ~ 13 %). При однакових умовах отримано метаболітні комплекси *L. rhamnosus* GG та *S. boulardii* з різними складовими, що доводить залежність кінцевого продукту від штаму продуцента. Найбільш ефективними за протимікробною дією відносно збудників захворювань є речовини лактобактерій. Вони містять в переважній кількості фракції з молекулярними масами ~ 4,2 – 5,7 кДа. Зразки сахароміцетів відрізняються меншою антибактеріальною активністю та домінуючими складовими з масами ~ 1,1 кДа.

Представлений в роботі фракційний склад метаболітних комплексів *L. rhamnosus* LGG і *S. boulardii* стане в нагоді при конструюванні на їхній основі протимікробних поліфункціональних кандидат-препаратів.

Ключові слова: гелі-проникаюча хроматографія, бактеріоцини, протимікробна активність, полірезистентні мікроорганізми, лактобактерії, сахароміцети.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження є розділом НДР лабораторії профілактики краплинних інфекцій Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітних комплексів лакто– та біфідопробіотиків» (НАМН 146/2019), № держ. реєстрації 0119U100686.

Вступ. Швидке збільшення антибіотикостійких мікроорганізмів спонукає до розробки альтернативних протимікробних препаратів, зокрема на основі антимікробних пептидів (бактеріоцинів). Це невеликі молекули з широким спектром протимікробної дії, цитотоксичною активністю, проти запального і імуномодуючим ефектом [1]. Привертає увагу універсальний механізм їхньої протимікробної дії: активність спрямована не тільки проти грампозитивних мікроорганізмів, а і ефективно пригнічує ріст, розвиток, утворення біоплівки грамотрибуальних бактерій [2]. Деякі антимікробні пептиди вже успішно застосовуються в практичній медицині: граміцидин, виділений з *Bacillus brevis*, широко використовується в офтальмології у вигляді розчинів і крапель для боротьби з грампозитивними мікроорганізмами; поліміксин Е, отриманий з *Paenibacillus polymyxa*

(*Bacillus nolytymxa*), у вигляді крапель ефективно діє проти *Pseudomonas* і *Acinetobacter* spp.; даптоміцин із *Streptomyces roseosporus*, лікує інфекції шкіри, ускладнені грампозитивними бактеріями [3]. Відомо більш ефективне комбіноване застосування пептидних бактеріоцинів щодо впливу на антибіотикорезистентні бактерії, а також успішне керування біоплівками, незважаючи на несприйнятливості останніх до антибіотиків [3, 4].

На сьогодні їхнє отримання відбувається із застосуванням традиційних живильних середовищ, а технологічні етапи передбачають очистку від компонентів середовища. Авторський спосіб одержання біологічно активних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* завдяки культивуванню мікробної суспензії культури мікроорганізму у живильному середовищі, що є ультразвуковим дезінтегратором пробіотичних клітин, дозволяє отримати кінцевий продукт, який не потребує додаткової очистки від компонентів живильних середовищ [4]. Технологія відзначається простотою виконання та легкістю стандартизування, дозволяє раціонально використовувати виробничі ресурси за рахунок поєднання послідовних етапів отримання структурних компонентів та продуктів метаболізму пробіотичних мікроорганізмів. Це поєднання також дозволяє підвищити протимікробну активність кінцевого продукту щодо широкого спектру полірезистентних умовно-патогенних та патогенних збудників [5, 6]. Для встановлення механізмів дії метаболітичних комплексів та обґрунтування їхніх властивостей необхідне всебічне вивчення біохімічного складу, зокрема встановлення білкових і пептидних складових.

Мета роботи – вивчення складу метаболітичних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* за допомогою хроматографічного фракціонування та протимікробної активності відносно антибіотикорезистентних збудників для створення протимікробних поліфункціональних кандидат-препаратів нового покоління.

Матеріал та методи дослідження. Штамами продуцентами біологічно активних комплексів були бактерії пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG з симбіотика PREEMA® («Schonen», Швейцарія) та гриби *Saccharomyces boulardii* з пробіотичного препарату BULARDI® («Schonen», Швейцарія). Одержання структурних компонентів лактобактерій (L) та сахароміцетів (S) досягалося обробкою мікробних клітин ультразвуковим чинником (генератор ГЗ-109). Отримання метаболітичних сполук *L. rhamnosus* GG (ML) і *S. boulardii* (MS) здійснювалося культивуванням мікробних клітин у власних дезінтегратах [4]. Продукти життєдіяльності пробіотичних грибів *S. boulardii* (LS) та спільних культур

лактобактерій і сахароміцетів (MLS) отримували вирощуванням їхніх клітин у дезінтеграті *L. rhamnosus*. Всі дослідні проби центрифугували при 1000 g 30 хв, супернатант фільтрували за допомогою мембранних фільтрів «Владіпор» МФАС-Б № 4 (діаметр пор 0,2 мкм) [4].

Визначення молекулярних мас одержаних фракцій структурних компонентів і метаболітичних сполук *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* здійснювали за допомогою гелепроникаючої хроматографії на обладнанні LKB (Швеція). Очистку та фракціонування отриманих речовин проводили на колонці, заповненій гелем TSK-GEL TOYOPEARL HW-60 Fine. В якості елюенту використовували фосфатно-сольовий буфер (Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 – 30 ммоль / л, NaCl – 100 ммоль / л (pH 7,4)). Швидкість рухливої фази становила 1,7 мл/хв. Буфер до колонки подавався перистальтичним насосом (LKB-2132 Microperpex) через петельний інжектор зі зйомними петлями. Реєстрацію оптичної щільності елюатів проводили за допомогою ультрафіолетового монітору при довжині хвилі 254 нм. Для визначення молекулярних мас фракцій використовували колонку попередньо калібровану стандартними речовинами.

Тест-культурами для досліджень були антибіотикорезистентні штами *Staphylococcus epidermidis* PR, *Enterobacter cloacae* PR та *Enterococcus faecalis* PR (до гентаміцину, цефтріаксону, офлоксацину тощо), отримані із колекції музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН», м. Харкова. Суспензії мікроорганізмів готували за допомогою 0,9 % розчину натрію хлориду. Оптична щільність зразків відповідала 0,5 одиниць за шкалою McFarland (прилад Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія)).

Визначення чутливості полірезистентних збудників до метаболітичних комплексів здійснювали якісним методом [6]. Суспензію тест-культур вносили в метаболітичні комплекси (співвідношення 1:9) – дослідні проби, в 1%-й цукровий м'ясо-пептонний бульйон та в 0,9 % розчин натрію хлориду – контрольні проби. Експозиція становила 2, 24 та 48 годин при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Після чого із рідкого середовища здійснювали висів на щільне живильне середовище (агар Мюллер – Хінтона). Відсутність росту свідчило про протимікробну активність дослідних проб по відношенню до обраних збудників.

Досліди проводили тричі. Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали з використанням програмного пакету Microsoft Excel 2010 та «Statistica 10.0» (StatSoft Inc., США). Розподіл на нормальність виконували за допомогою критерію Пірсона. При відповідності нормальному розподілу достовірність різниці між отриманими показниками різних груп визначали за критерієм t-Стюдента.

Результати представлено у вигляді середнього значення (x) та стандартного відхилення (SD). Відмінності між групами вважалися достовірними, коли значення були $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Вивчення складових дезінтеграту, отриманого в результаті опромінення низькочастотним ультразвуком з низькою потужністю мікробних клітин *Lactobacillus rhamnosus* LGG показало, що він містить дванадцять фракцій з різною молекулярною масою (табл. 1). Серед них домінували компоненти з масами ~ 4 кДа (~ 42 %) та ~ 5,5 кДа (~ 20) %, тоді як найбільша за масою (≥ 12 кДа) – тільки ~ 8 % (табл. 1).

Схожі результати були одержані при визначенні молекулярних мас компонентів ML (табл. 1). Незважаючи на зменшення питомої ваги (до ~ 35 %, $P=0,001$), домінуючою залишається фракція з молекулярною масою ~ 4 кДа. Наступний компонент з масою ~ 5,6 кДа також зменшився (до ~ 18 %, $P=0,003$), а фракція з найбільшою молекулярною масою понад ≥ 12 кДа збільшилася (до ~ 13 %, $P=0,002$) у порівнянні з L. Загальний кількісний

вміст фракцій з масами понад 4 кДа відносно інших компонентів залишився незмінним (в межах ~73%), як і речовини з масами від ~ 2,7 кДа та нижче, які займають майже четверту частину всіх фракцій.

У пробі MLS домінували фракції з молекулярними масами ~ 4,4 кДа і ~ 5,7 кДа (питома вага ~ 26 % і ~ 23 % відповідно) (табл. 1). Кількість компоненту з масою 1,6 кДа перебільшувала (~ 11 %, $P=0,004$) аналогічну фракцію в ML (~ 8 %). Сумарна питома вага низькомолекулярних фракцій з молекулярною масою ~ 2,8 кДа та менші в MLS складала ~ 45 % на відміну від ML – ~ 27 %, $P=0,009$. Достовірних змін кількості фракцій з молекулярною масою > 4 кДа та < 12 кДа в MLS (~ 49 %) відносно ML (~ 59 %) не спостерігалось ($P=0,4$).

Відмінності складу свідчать, що в процесі культивування клітин в ультразвукових дезінтегратах відбувається продукування метаболітів, яке супроводжується змінами компонентів MLS, ML порівняно з L. Також різниця молекулярних мас та питомої ваги фракцій між пробами MLS та ML доводить:

Таблиця 1 – Характеристика фракцій структурних компонентів і метаболітичних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii*, розподілених за допомогою гель-проникаючої хроматографії

Біологічно активні комплекси <i>L. rhamnosus</i> GG і <i>S. boulardii</i> (x±SD)											
Структурні компоненти лактобактерій (L)		Метаболіти лактобактерій, отримані культивуванням продуцентів у власних дезінтегратах (ML)		Метаболіти лактобактерій і сахароміцетів, отримані спільним культивуванням мікроорганізмів (MLS)		Структурні компоненти сахароміцетів (S)		Метаболіти сахароміцетів, отримані культивуванням грибів у власних дезінтегратах (MS)		Метаболіти сахароміцетів, отримані культивуванням грибів у дезінтегратах лактобактерій (LS)	
молекулярна маса фракцій, кДа	питома вага фракцій, %	молекулярна маса фракцій, кДа	питома вага фракцій, %	молекулярна маса фракцій, кДа	питома вага фракцій, %	молекулярна маса фракцій, кДа	питома вага фракцій, %	молекулярна маса фракцій, кДа	питома вага фракцій, %	молекулярна маса фракцій, кДа	питома вага фракцій, %
≥ 12	~ 8±0,4	≥ 12	~ 13±0,9	≥ 12	~ 4±0,4	≥ 12	~ 5±0,6	≥ 12	~ 2±0,09	≥ 12	~ 3±0,4
~ 7,7	~ 5±0,4	~ 0,8	~ 6±0,5	-	-	~ 6,1	~ 25±1,4	~ 6,2	~ 19±0,4	~ 6,4	сліди
~ 5,5	~ 20±0,8	~ 5,6	~ 18±0,9	~ 5,7	~ 23±0,5	-	-	-	-	~ 6,3	сліди
~ 4,2	~ 42±0,03	~ 4,3	~ 35±0,6	~ 4,4	~ 26±0,05	-	-	-	-	~ 6,2	~ 1±0,06
~ 2,7	сліди	~ 2,8	сліди	~ 2,8	~ 1±0,3	~ 4,2	~ 12±0,9	-	-	~ 6,1	~ 17±0,5
-	-	-	-	~ 2,4	~ 2±0,3	~ 2,8	~ 1±0,4	-	-	~ 2,9	сліди
~ 1,9	~ 1±0,4	-	-	~ 1,9	~ 7±0,7	~ 2,3	~ 3±0,1	~ 2,3	~ 2±0,2	-	-
~ 1,6	~ 7±0,3	~ 1,6	~ 8±0,02	~ 1,6	~ 11±0,5	~ 1,9	~ 5±0,09	~ 1,9	~ 8±0,3	~ 1,9	~ 2±0,5
~ 1,3	~ 3	~ 1,3	~ 4±0,6	-	-	~ 1,6	~ 9±0,1	~ 1,6	~ 5±0,3	~ 1,5	~ 8±0,4
~ 1,1	~ 5±0,5	~ 1,1	~ 5±0,5	~ 1,1	~ 8±0,9	~ 1,1	~ 13±0,007	~ 1,1	~ 37±0,9	~ 1,1	~ 5±0,5
-	-	-	-	~ 1	сліди	~ 0,9	~ 3±0,5	~ 0,9	~ 1±0,2	~ 0,9	~ 35±0,8
~ 0,8	~ 2±0,2	~ 0,8	~ 4±0,2	~ 0,8	~ 6±0,4	~ 0,8	~ 2±0,2	~ 0,8	~ 11±0,6	~ 0,8	~ 13±0,6
~ 0,7	~ 2±0,9	~ 0,7	~ 3±0,6	~ 0,7	~ 5±0,6	~ 0,7	~ 5±1,3	-	-	~ 0,7	~ 2±0,4
~ 0,6	~ 3±0,4	~ 0,6	~ 3±0,6	~ 0,5	сліди	~ 0,5	~ 13±1,4	~ 0,5	~ 9±0,3	~ 0,5	~ 9±1,0
-	-	-	-	≤ 0,2	~ 5±0,4	≤ 0,2	~ 3±0,3	≤ 0,2	~ 4±0,3	≤ 0,2	~ 3±0,3

додавання до лактобактерій сахароміцетів дозволяє отримувати відмінні метаболітні комплекси з власним складом.

Фракціонування дезінтегрованої низькочастотним ультразвуком мікробної маси сахароміцетів (S) дозволило виділити фракції з різними масами (табл. 1). Питома вага домінуючих компонентів складала ~ 6,1 кДа (~ 25 %), ~ 1,1 кДа (~ 13%), ~ 0,5 кДа (~ 13 %) і ~ 4,2 кДа (~ 12 %). Проба MS відрізнялася від S збільшенням фракцій з молекулярними масами ~ 1,1 кДа (до ~ 37 %, $P=0,0003$) і ~ 0,8 кДа (до ~ 11 %, $P=0,0005$) та зменшенням компонентів з масою ~ 6,1 кДа (до ~ 19 %, $P=0,01$) і з масою ~ 0,5 кДа (до ~ 9 %, $P=0,01$). На відміну від проб лактобактерій (L – ~ 8 %, ML – ~ 13 %, MLS – ~ 4 %), в зразках сахароміцетів фракція ≥ 12 кДа була в меншій кількості (S – ~ 5 %, MS – ~ 2 %). Співвідношення основних компонентів метаболітного комплексу LS показало перевагу фракцій з молекулярними масами ~ 0,9 кДа – 35 %, ~ 6,1 кДа – 17 % та ~ 0,8 кДа – 13 %.

Результати гель-хроматографічного розділення метаболітів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* (ML, MS), отриманих за однаковим способом одержання, а саме культивуванням мікробних клітин у власних дезінтегратах, але від різних мікроорганізмів, мають різний склад фракціонованих сполук (рис. 1). Це дозволяє зробити висновок, що відмінність складу фракціонованих компонентів залежить від штаму продуцента (лактобактерії або сахароміцети).

Слід відмітити, що всі дослідні речовини *Lactobacillus rhamnosus* LGG і *Saccharomyces boulardii* мають багатокомпонентний склад з переважним вмістом пептидних компонентів (~ 87 % – ~ 98 %) та меншою питомою вагою білків з молекулярними масами ≥ 12 кДа (~ 2 % – ~ 13 %) (рис. 1).

Вивчення протимікробної активності ультразвукових дезінтегратів та метаболітних комплексів пробіотичних мікроорганізмів щодо антибіотикорезистентних грампозитивних та грамнегативних збудників показали відмінні результати (табл. 2). Під

впливом L, ML, MLS спостерігався більш виражений антибактеріальний ефект відносно *S. epidermidis* PR (2 години інкубації), *E. faecalis* PR та *E. cloacae* PR (24 години інкубації) порівняно з S, MS, LS. Різний рівень їхньої протимікробної активності, ймовірно, можна пояснити відмінностями складу. В пробах L, ML домінують фракції з масою ~ 4,2 – 4,3 кДа та ~ 5,5 – 5,6 кДа, а в S, MS, LS переважають компоненти з масою ~ 1,1 кДа. Отже, можливо менш виражена дія щодо полірезистентних збудників речовин сахароміцетів обумовлена домінуючою кількістю фракцій з меншою молекулярною масою (табл. 2).

Результати проведеної роботи також дозволили встановити наступне: найбільша за молекулярною масою фракція ≥ 12 кДа в зразках MLS (~ 4 %), S (~ 5 %), MS (~ 2 %), LS (~ 3 %) міститься в близькій кількості. Проте за протимікробною активністю зазначені проби відрізняються, що свідчить про відсутність впливу даної складової на полірезистентні умовно-патогенні мікроорганізми.

Отримані результати щодо присутності різних за молекулярними масами фракцій в структурних компонентах і метаболітних комплексах *L. rhamnosus*, одержаних за авторським способом, узгоджуються з даними інших авторів [7-10]. Pithva зі співавт [7] представлено речовини, отримані із мікробних клітин *Lactobacillus*, з різними молекулярними масами, які проявляли протимікробну активність. За наступним повідомленням бактеріюцини антибактеріально діють починаючи з молекулярної маси > 1 кДа [8]. В роботі інших дослідників перевагу щодо впливу на широкий спектр мікроорганізмів (грампозитивні/грамнегативні бактерії, дріжджоподібні гриби) мали фракції з молекулярними масами від 1 до 10 кДа, виділені з концентрату супернатанта *L. plantarum* 8PA-3 [9]. Передбачають, що антимікробні речовини переважно мають низьку молекулярну масу (4-6 кДа) (виключення реутерін) [10]. Бактеріюцини *L. rhamnosus* відрізняються від інших представників *Lactobacillus* spp. більш широким спектром активності проти грамнегативних та

Рис.1. Фракціонування методом гель-проникаючої хроматографії метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG (а) і *S. boulardii* (б), отриманих культивуванням продуцентів у власних дезінтегратах

Таблиця 2 – Протимікробні властивості структурних компонентів і метаболітичних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii* відносно антибіотикорезистентних тест-культур (за наявності / відсутності росту на щільному живильному середовищі) та співставлення з домінуючими фракціями, розподіленими за допомогою гель-проникаючої хроматографії

Біологічно активні комплекси	Питома вага домінуючих фракцій з молекулярними масами, %		Протимікробна активність відносно тест-культур								
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>			<i>Enterobacter cloacae</i>		
	~ 4,2 – 5,6 кДа	~ 0,8 – 1,6 кДа	час експозиції, год								
			2	24	48	2	24	48	2	24	48
L	~ 62	17	-	-	-	+	-	-	+	-	-
ML	~ 53	21	-	-	-	+	-	-	+	-	-
MLS	~ 49	25	-	-	-	+	-	-	+	-	-
S	~ 12	27	+	+	-	+	+	-	+	+	-
MS	-	54	+	+	-	+	+	-	+	+	-
LS	-	61	+	+	-	+	-	-	+	+	-
ЦБ			+	+	+	+	+	+	+	+	+
ФР			+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: L – фільтрат ультразвукового дезінтеграту (структурні компоненти) *L. rhamnosus* GG, ML – метаболітичний комплекс *L. rhamnosus* GG, одержаний культивуванням лактобактерій у власних дезінтегратах, MLS – комбінація метаболітичного комплексу лактобактерій і сахароміцетів, отриманих при культивуванні мікроорганізмів у дезінтегратах лактобактерій, S – фільтрат ультразвукового дезінтеграту (структурні компоненти) *S. boulardii*, MS – метаболітичний комплекс *S. boulardii*, одержаний культивуванням сахароміцетів у власних дезінтегратах, LS – метаболітичний комплекс *S. boulardii*, одержаний культивуванням сахароміцетів у дезінтегратах лактобактерій, ЦБ – 1%-й цукровий м'ясо-пелтонний бульйон, ФР – 0,9 % розчин натрію хлориду, + - наявність росту культури (протимікробний ефект відсутній), - – відсутність росту культури (протимікробний ефект наявний).

грампозитивних мікроорганізмів. Це підтверджують літературні дані та представлені результати [4, 7]. Також відмінності полягають в наступному: серед всіх біологічно активних речовин із різних представників *Lactobacillus spp.* самими складними являються продукти життєдіяльності *L. rhamnosus* [7, 9].

Встановлений різний склад компонентів в речовинах пробіотичних сахароміцетів співпадає з роботами авторів [11–13]. Так, за допомогою ультрафільтрації через діалізні мембрани з порами 10 кДа отримано чотири ізоляти з протимікробною активністю (50, 75 та 100 мкл концентрованого препарату інгібувало *Bacillus cereus* на 26, 29 та 33 мм відповідно). Після очищення гель-фільтрацією через колонку Sephadex G-50 протимікробна дія підвищилася – зони інгібування збільшилися до 37 мм. Молекулярна маса активного компоненту становила 5792 Да (визначено за допомогою електрофорезу з SDS). Отриманий бактеріоцин був термостабільний, його активність зберігалася при витримці впродовж 30 хв (температура 60–80° С) [13]. Власна методика отримання метаболітичних комплексів також передбачає температурну обробку біоматеріалу із збереженням їхніх протимікробних властивостей. Наступними авторами екстрагування біологічно активних речовин із клітин *S. boulardii* здійснювалося водою, метанолом, ізопропанолом, н-бутанолом та етанолом. Найвищу проти-

мікробну активність відносно *Escherichia coli* і *Candida albicans* проявляв етиловий екстракт, потім – водний. В іншій роботі бактеріоцини *S. boulardii* очищали використовуючи колонку Sephadex G-50. Протимікробною активністю з зоною інгібування росту *Streptococcus pneumoniae* 26 мм володів компонент з молекулярною масою 18 кДа [12]. Фракціонування на колонці Sephadex G-100 показало наявність різних фракцій з відмінною активністю відносно *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *Aspergillus niger* [11], що співпадає з власними результатами. За попередніми експериментами та даними цієї роботи структурні компоненти та метаболітичні комплекси лактобактерій володіють більш вираженими протимікробними властивостями у порівнянні із зразками сахароміцетів [4, 5]. Представлені результати також показали: додавання мікробних клітин сахароміцетів при культивуванні лактобактерій у власних структурних компонентах, дозволяє отримувати комбіновані метаболітичні комплекси MLS з відмінним складом. А в попередніх експериментах встановлені більш виражені протидифтерійні властивості MLS відносно інших проб лактобактерій та сахароміцетів [5]. Це підтверджує наше припущення щодо залежності ступеню протимікробної активності від складових метаболітичних комплексів пробіотичних мікроорганізмів. В подібних роботах інших авторів також доведена більш виражена антибактеріальна дія при

комбінованому впливі біологічно активних речовин на антибіотикорезистентні збудники [3].

Результати представленої роботи показали відсутність впливу фракції з молекулярною масою ≥ 12 кДа на протимікробну активність. Це також стосується загальної кількості речовин з масою ≤ 12 кДа. Їхня питома вага однакова в MLS, MS, LS наряду з різним рівнем антибактеріальної активності. Встановлено переважний вміст пептидів з молекулярними масами $\sim 4,2 - 5,7$ кДа в речовинах лактобактерій, які володіють більшими антибактеріальними властивостями, на відміну від зразків сахароміцетів ($\sim 1,1$ кДа). Вплив цих фракцій на протимікробну активність потребує підтвердження. Можливо, антибактеріальна дія метаболітичних комплексів обумовлена не лише пептидними компонентами. Необхідна подальша більш детальна характеристика їхньої біохімічної структури.

Висновки

1. Гель-хроматографічним фракціонуванням дослідних речовин *Lactobacillus rhamnosus* LGG і *Saccharomyces boulardii* встановлено багатокомпонентність складу з переважним вмістом пептидних компонентів ($\sim 87\% - \sim 98\%$) та меншою питомою вагою білків з молекулярними масами ≥ 12 кДа ($\sim 2\% - \sim 13\%$).

2. Найбільш ефективними метаболітичними комплексами за протимікробною активністю відносно грампозитивних та грамнегативних збудників є речовини лактобактерій, які містять в переважній кількості пептиди з молекулярними масами $\sim 4,2 - 5,7$ кДа, на відміну від зразків сахароміцетів ($\sim 1,1$ кДа).
3. Фракція з молекулярною масою ≥ 12 кДа не впливає на протимікробну активність біологічно активних речовин.
4. Отримані за однаковим способом одержання (культивуванням мікробних клітин у власних дезінтератах) метаболітичні комплекси *L. rhamnosus* (ML) і *S. boulardii* (MS) мають різний склад фракціонованих сполук, що доводить їх залежність від штаму продуцента.
5. Представлений в роботі фракційний склад досліджуваних структурних компонентів і продуктів життєдіяльності *L. rhamnosus* LGG і *S. boulardii* стане в нагоді при конструюванні на основі біологічно активних речовин пробіотичного походження протимікробних поліфункціональних кандидат-препаратів.

Перспективи подальших досліджень. Планується провести біохімічний аналіз метаболітичних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii*.

References

1. Kang HK, Kim C, Seo CH, Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol.* 2017; 55(1): 1-12. doi: 10.1007/s12275-017-6452-1
2. Azimova VT, Potaturkina-Nesterova NI, Nesterov AS. Endogennoye antimikrobnyye peptidy cheloveka [Endogenic antimicrobial peptides of human]. *Sovr probl nauki i obraz.* 2015; 1(1). [Russian]
3. Mishra B, Reiling S, Zarena D, Wang G. Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Curr Opin Chem Biol.* 2017; 38: 87-96.
4. Isayenko OY, Knysh OV, Babysh YM, Ryzhkova TN, Dyukareva GI. Effect of disintegrates and metabolites of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* on biofilms of antibiotic resistant conditionally pathogenic and pathogenic bacteria. *Regul Mech Biosyst.* 2019; 10(1): 3-8. doi: 10.15421/021901
5. Isayenko OYu. Protydyferiyni vlastyvoosti strukturno-metabolitnykh kompleksiv probiotychnykh shtamiv laktobakteriy i sakharomitsetiv v testakh in vitro ta in vivo [Anti-diphtheria properties of structural-metabolites complexes of Lactobacteria and Saccharomyces probiotic strains]. *Fiziol Zh.* 2019; 65(6): 51-60. [Ukrainian]. doi: 10.15407/fz65.06.051
6. Isayenko OY, Knysh OV, Babysh EM, Kivva FV, Balak OK, Naboychenko OA. Vplyv produktiv metabolizmu *Lactobacillus rhamnosus* GG na test-kul'tury stafilocokiv ta korynebakteriy [The influence of metabolic products of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the test-culture of staphylococcus and corynebacterium]. *Visn probl bioloh i medyts.* 2017; 2 (136): 246-51. [Ukrainian].
7. Pithva S, Ambalam P, Dave JM, Vyas BRM. Antimicrobial peptides of probiotic *Lactobacillus* strains. In: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Editors: A. Mendez-Vilas. FORMATEX; 2011. p. 987-91.
8. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab.* 2012; 61: 160-74. doi: 10.1159/000342079.
9. Sobolev AV, Kolobov AA, Krasovskaya IE, Grishina TV. Podbor metodov vydeleniya antimikrobnnykh peptidov iz kul'tury *Lactobacillus plantarum* 8pa-3 [Selection of methods for the isolation of antimicrobial peptides from the culture of *Lactobacillus plantarum* 8pa-3]. *Russian immunological journal.* 2014; 8(17): 873-5.
10. Rybal'chenko OV, Orlova OG, Bondarenko VM. Antimikrobnyye peptidy laktobatsill [Antimicrobial peptides of lactobacilli]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2013; 4: 89-100. [Russian]
11. Ali MAE, Abdel-Fatah OM, Janson JC. Antimicrobial potential of *Saccharomyces boulardii* extracts and fractions. *JASR.* 2012; 8(8): 4537-43.

12. Venkateswarulu TC, Krupanidhi S, Indira M, Bobby N. Estimation of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of antimicrobial peptides of *Saccharomyces boulardii* against selected pathogenic strains. *Karbala International Journal of Modern Science*. 2019; 5(4): 8. doi: 10.33640/2405-609X.1219
13. Niamah AK, Al-Manhel AJ, Al-Shawi MJ. Isolation, purification and characterization of antimicrobial peptides produced from *Saccharomyces boulardii*. *IJPR*. 2018; 24(3): 455-61. doi: 10.1007/s10989-017-9632-2

УДК 615.372:[579.864.1+579.873.13]:577.112

ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ *L. RHAMNOSUS* GG И *S. BOULARDII* И ИХ ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ

Исаенко Е. Ю., Бабич Е. М., Горбач Т. В., Семенченко А. Ю., Коцар Е. В.

Резюме. Целью работы стало изучение состава метаболитных комплексов *Lactobacillus rhamnosus* GG и *Saccharomyces boulardii* с помощью хроматографического фракционирования и противомикробной активности в отношении антибиотикорезистентных возбудителей для создания противомикробных полифункциональных кандидат-препаратов нового поколения.

Дезинтеграты, представляющие собой структурные компоненты, получены низкочастотной ультразвуковой обработкой пробиотических клеток *L. rhamnosus* GG или *S. boulardii*. Метаболитные комплексы получены авторским способом культивированием лактобактерий и сахаромикетов в собственных дезинтегратах, сахаромикетов и комбинации сахаромикетов с лактобактериями – в дезинтегратах лактобактерий. Фракционирование веществ *L. rhamnosus* и *S. boulardii* осуществляли с помощью гель-проникающей хроматографии. Противомикробную активность по отношению к антибиотикорезистентным штаммам *Staphylococcus epidermidis* PR, *Enterobacter cloacae* PR, *Enterococcus faecalis* PR изучали качественным методом.

Установлено многокомпонентность всех опытных образцов с преимущественным содержанием пептидных компонентов (~ 87% – ~ 98%) и меньшим удельным весом фракций с молекулярными массами ≥ 12 кДа (~ 2% – ~ 13%). При одинаковых условиях получены метаболитные комплексы *L. rhamnosus* GG и *S. boulardii* с различными составляющими, что доказывает зависимость конечного продукта от штамма продуцента. Наиболее эффективными по противомикробному действию в отношении возбудителей заболеваний являются вещества лактобактерий. Они содержат в подавляющем числе фракции с молекулярными массами ~ 4,2 – 5,7 кДа. Образцы сахаромикетов отличаются меньшей антибактериальной активностью и доминирующими составляющими с массами ~ 1,1 кДа.

Представленный в работе фракционный состав метаболитных комплексов *L. rhamnosus* LGG и *S. boulardii* пригодится при конструировании на их основе противомикробных полифункциональных кандидат-препаратов.

Ключевые слова: гель-проникающая хроматография, бактериоцины, противомикробная активность, полирезистентные микроорганизмы, лактобактерии, сахаромикеты.

UDC 615.372:[579.864.1+579.873.13]:577.112

Gel Chromatographic Fractionation of Metabolic Complexes of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii* and their Antimicrobial Activity

Isayenko O., Babych E., Gorbach T., Semchenko O., Kotsar O.

Abstract. The rapid increase in antibiotic-resistant microorganisms encourages the development of alternative antimicrobial drugs, in particular on the basis of antimicrobial peptides.

The purpose of the work was to study the composition of metabolic complexes of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* by chromatographic fractionation and antimicrobial activity against antibiotic-resistant pathogens to create a new generation of antimicrobial polyfunctional candidate drugs.

Material and methods. Disintegrates, which are structural components, are obtained by low-frequency ultrasonic treatment of probiotic cells of *L. rhamnosus* GG or *S. boulardii*. The metabolic complexes were obtained by the author's method of cultivation of lactobacteria and saccharomycete in their own disintegrates, saccharomycetes and a combination of saccharomycetes with lactobacteria – in disintegrate of lactobacterias. The fractionation of the substances of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* was performed by gel permeation chromatography. Antimicrobial activity against multidrug-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* PR, *Enterobacter cloacae* PR, *Enterococcus faecalis* PR was studied by a qualitative method.

Results and discussion. The study established multicomponent nature of all experimental samples with the predominant content of peptide components (~ 87% – ~ 98%) and lower specific weight of fractions with molecular weights ≥ 12 kDa (~ 2% – ~ 13%). We revealed differences in the composition of experimental

substances. This indicates that in the process of culturing cells in ultrasonic disintegrates is the production of metabolites, which is accompanied by changes in the components of metabolic complexes compared with disintegrates. The difference in molecular weights and specific gravity of the fractions of the metabolic complex of lactobacilli and its combination with saccharomycetes proves that the addition of saccharomycetes to lactobacilli allows obtaining excellent substances with their own composition. Gel chromatographic separation of metabolites of *L. rhamnosus* and *S. boulardii*, obtained by the same method of production, but from different microorganisms, have different composition of fractionated compounds. This proves that the difference in the composition of the fractionated components also depends on the producer strain (lactobacilli or saccharomycetes). The most effective antimicrobial action against pathogens are lactobacteria. They contain an overwhelming number of fractions with molecular weights ~ 4,2 – 5,7 kDa. Saccharomycetes samples are characterized by lower antibacterial activity and dominant components with masses of ~ 1,1 kDa. Perhaps less pronounced effect of saccharomycetes was on multidrug-resistant pathogens due to the dominant number of fractions with lower molecular weight. The largest molecular weight fraction ≥ 12 kDa is contained in close amounts in metabolic complexes with different antimicrobial activity, which indicates the absence of influence of this component on multidrug-resistant opportunistic pathogens.

Conclusion. The fractional composition of the metabolic complexes of *L. rhamnosus* LGG and *S. boulardii* presented in the work will be useful in the construction of antimicrobial polyfunctional candidate-medications based on them.

Keywords: gel permeation chromatography, bacteriocins, antimicrobial activity, multidrug-resistant microorganisms, lactobacteria, saccharomycetes.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 10.05.2020 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування