

11. *Методы почвенной микробиологии и биохимии* / Под ред. Звягинцева Д.Г. М.: МГУ, 1991. – 304 с.
12. *Некоторые новые методы количественного учета почвенных микроорганизмов и изучения их свойств* /под ред. Ю.М. Возняковской. – Л., 1982. – 52 с.
13. Патика В.П. Екологічні основи застосування біологічних засобів захисту рослин як альтернативи хімічним пестицидам / В.П. Патика, Т.Г. Омелянець // *Агроекологічний журнал*. – 2005. – № 2. – С. 21–24.
14. *Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні*. Київ, «Юні вест Медіа», 2008. – 441 с.
15. Shan M. Effect of chlorpyrifos on soil microbial populations and enzyme activities / M. Shan, H. Fang, X. Wang, B. Feng, XQ Chu, YL Yu // *J. Environ Sci.* – 2006. – 18, N. 1. – P. 4–5.

Отримано 11.04.2011

УДК 579.66

**О.П. Лівінська, І.Л. Гармашева, В.М. Васильєв, Н.К. Коваленко**

*Институт микробиологии і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
вул. Академіка Заболотного, Київ, 03143, Україна*

## **МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ВИДІЛЕННЯ ТЕЙХОЄВИХ КИСЛОТ ІЗ НАТИВНИХ КЛІТИН ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ**

*Отримано тейхоєві кислоти пробіотичних штамів молочнокислих бактерій методом екстракції з нативних клітин із подальшою очисткою виділених екстрактів із застосуванням іонообмінної хроматографії. Відібрані фракції містили високі концентрації фосфору та не містили нуклеїнові кислоти. Вміст тейхоєвих кислот залежав як від видової, так і штамової приналежності. Виявлено гетерогенність досліджуваних біомолекул.*

*Ключові слова: тейхоєві кислоти, іонообмінна хроматографія, молочнокислі бактерії.*

Вивчення хімічного складу клітинних стінок молочнокислих бактерій, а саме, тейхоєвих кислот, довгий час використовувалося з метою діагностики їх родової та видової приналежності. Це обумовлювалося стабільністю хімічного складу, на який, як вважалося, не впливають ні зміни складу поживних середовищ, ні зміни умов культивування культур [6]. Однак, в подальшому Kandler показав, що нестача в поживному середовищі лізину, присутність бактеріофагів чи дія антибіотиків, може істотно позначитися на структурі тейхоєвих кислот молочнокислих бактерій і, особливо, лактобацил [5].

Так як тейхоєвим кислотам притаманний високий рівень структурного різноманіття, вони були досліджені недостатньо.

Прихід ери пробіотиків, в основі яких є живі клітини молочнокислих бактерій та біфідобактерій, дали поштовх детальному вивченню механізму їх дії на макроорганізм. У цьому плані особлива увага почала приділятися аналізу біологічних властивостей тейхоєвих кислот і питанню можливості їх практичного застосування в медицині [3].

Тейхоєві кислоти виконують ряд функцій пов'язаних із механічною міцністю клітинних стінок бактерій, їх адгезивними властивостями, здатністю формувати біоплівку та підтримувати катіонний гомеостаз. В наш час тейхоєві кислоти, з одного боку, викликають інтерес дослідників як фактори патогенності мікроорганізмів – збудників інфекційних захворювань, а з іншого – як імуностимулюючі агенти. [2]. Окрім того, мало відомо про біологічну роль структури тейхоєвих кислот, зокрема у міжклітинних взаємодіях. Цікавим є з'ясування необхідності широкого структурного різноманіття клітинної поверхні, опосередковане тейхоєвими кислотами. Найбільші труднощі при дослідженні тейхоєвих кислот пов'язані із високим рівнем їх різноманітності навіть серед штамів одного виду. Тому особливості функцій, що виконують тейхоєві кислоти в клітині, можуть бути пов'язані не лише із потужним аніонним зарядом та фосфат-збагаченим скелетом, а й різноманіттям структурних модифікацій. Тейхоєві кислоти представляють собою водорозчинні біополімери клітинної стінки грампози-

© О.П. Лівінська, І.Л. Гармашева, В.М. Васильєв, Н.К. Коваленко, 2012

тивних бактерій, що зв'язані ковалентно із пептидогліканом і складають від 10 до 60 % маси клітинної стінки. Їх отримання в лабораторних умовах ускладнюється через високий ступінь інтеграції молекул в ригідний шар пептидоглікану і вимагає використання інструментальної бази високого рівня.

Крім того, немає єдиної думки щодо методів отримання тейхоевих кислот. В роботі І.Я. Захарової передбачається екстракція тейхоевих кислот із цілих мікробних клітин [4]. В той же час, в останні роки пропонується їх руйнування ультразвуковим випромінюванням потужністю до 750 Вт [10, 11]. Згідно з нашими даними, руйнування клітинної стінки молочнокислих бактерій не завжди дає очікувані результати [7].

Охарактеризовані раніше різними авторами, тейхоеві кислоти клітинних стінок лактобацил, як правило, складаються із полігліцеролфосфату, хоча в деяких штамів *L. plantarum* основною субодиницею тейхоевої кислоти є рибітол [14]. У літературі також зустрічаються відомості і про повну відсутність тейхоевих кислот у складі клітинних стінок, зокрема у *L. casei*.

Відомо, що біологічна активність пробіотичних штамів може залежати від джерела виділення. Останнім часом це питання знаходиться у фокусі уваги дослідників. У цьому аспекті цікавим є виділити і охарактеризувати тейхоеві кислоти пробіотичних штамів молочнокислих бактерій різного походження з метою оцінки ролі тейхоевих кислот у прояві біологічної активності. Окрім того, автори зазначають, що специфічність будови і складу тейхоевих кислот обумовлюється як видовою, так і штамовою приналежністю [8].

У колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології зберігаються пробіотичні штами молочнокислих бактерій різного походження із широким спектром біологічної активності. Вони успішно застосовуються у практиці. Однак не повністю вивчено механізм їх пробіотичної дії. В цьому плані важливо вивчити вміст тейхоевих кислот в клітинних стінках цих штамів і роль даних компонентів у пробіотичних властивостях. Зважаючи на різноманіття модифікацій методів виділення тейхоевих кислот та складності, що пов'язані із цим процесом, вкрай необхідним є відпрацювання і оптимізація методичного підходу до отримання в лабораторних умовах тейхоевих кислот, зокрема із клітин пробіотичних молочнокислих бактерій.

Метою даної роботи було виділення та очистка тейхоевих кислот із клітинних стінок пробіотичних штамів молочнокислих бактерій.

**Матеріали і методи.** Об'єктами дослідження були штами молочнокислих бактерій Української колекції мікроорганізмів *L. plantarum 11/16*, *L. plantarum 195D* та *E. faecium K-50*. Дані штами привертають до себе науковий інтерес, обумовлений як джерелом виділення, так і високою біологічною активністю. Штам *L. plantarum 11/16* відноситься до епіфітної мікрофлори дикоростучих рослин. Він характеризується високою швидкістю росту і бродіння, здатністю продукувати L+ молочну кислоту і пригнічувати сторонню мікробіоту. Штам *E. faecium K-50*, виділений від птахів, має антагоністичну активність щодо патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, синтезує ряд вітамінів, серед яких рибофлавін, піридоксин, тіамін та біотин. Штам *L. plantarum 195D*, ізолюваний від довгожителів – активний антагоніст щодо *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*. Він активно адгезує на епітеліальних клітинах шлунково-кишкового тракту.

**Отримання тейхоевих кислот.** Штами молочнокислих бактерій вирощували на середовищі MRS. Перед дослідом культури активізували шляхом пересівів. Тейхоеву кислоту одержували із цілих клітин за методом Арчібальда [1, 4] із наступною модифікацією. Клітини лактобацил та ентерокока вирощували на рідкому середовищі MRS протягом доби при температурі 37°C. Бактеріальну культуру центрифугували при 3000 об/хв, осад промивали дистильованою водою. Відмиті клітини (3 г біомаси) витримували в 100 мл 0,5 % розчину фенолу протягом 4-х годин із метою позбавлення від капсульного поверхневого шару [15]. Бактерії двічі відмивали від фенолу та двічі обробляли 10 % трихлороцтовою кислотою (ТХО) протягом 24 годин у розрахунку 100 мл на 1 г сухої маси бактерій. Екстракцію проводили при температурі 4°C при періодичному перемішуванні. Суспензію клітин центрифугували при 5000 об/хв, супернатант декантували, осад знову екстрагували 10 % трихлороцтовою кислотою протягом 24 год. Отримані екстракти об'єднували. Тейхоеві кислоти осаджували шляхом додавання трьох об'ємів холодного 96 % етанолу та витримували при 4°C протягом

добі. Преципітат, що утворився, осаджували центрифугуванням при 5000 об/хв та 4°C, розчиняли у 10 мл дистильованої води та фільтрували крізь мембранний фільтр із діаметром пор 0,2 мкм.

Фільтрат розчиняли в 10 мМ буфері ТРІС-НСІ із рН 7,1. На колонку (10x150 мм), наповнену ДЕАЕ-целюлозою (CL<sup>-</sup> форма), наносили 10 мл отриманого екстракту тейхоєвої кислоти, отриманого із бактеріальної культури.

Колонку промивали п'ятьма об'ємами буферу того ж складу. Елюцію проводили ступінчастим сольовим градієнтом NaCl (0,1M, 0,25M, 0,5M) загальним об'ємом 100 мл зі швидкістю 15 мл/год, та відбирали по 5 мл елюату. Отримані фракції досліджували на вміст фосфору, нуклеїнових кислот та вуглеводів. Вміст фосфору визначали за методикою Чена-Торібара [12]. Відбирали по 0,2 мл розчину із кожної фракції та додавали 0,1 мл 40 %-ого розчину сірчаної кислоти. Суміш витримували в герметичних умовах 40 хв при температурі 160°C. Гідролізат розбавляли дистильованою водою до об'єму 4 мл та додавали 4 мл реактиву С, що складався із одного об'єму 6N сірчаної кислоти, 10 % аскорбінової кислоти, 2,5 % молібдату амонію та двох об'ємів дистильованої води. Пробірки закривали герметично та інкубували при 37°C протягом 1,5 год. Вимірювали величину екстинції на фотоелектрокалориметрі (КФК-2УХЛ4,2) при довжині хвилі 750 нм.

Концентрацію вуглеводів визначали фенольно-сірчанним методом [13]. Для цього відбирали по 0,5 мл досліджуваного розчину, додавали 0,5 мл 5 % фенолу та 2,5 мл сірчаної кислоти. Вимірювали величину екстинції при довжині хвилі 490 нм.

Концентрацію нуклеїнових кислот оцінювали шляхом вимірювання коефіцієнту поглинання при 260 нм на спектрофотометрі NanoDrop 2000.

За результатами вимірювання будували хроматографічні криві. Відбирали і об'єднували фракції, що містили фосфор та не проявляли оптичної активності при довжині хвилі 260 нм.

Отримані фракції діалізували протягом доби проти дистильованої води із використанням діалізних мішків із пропускною межею 1000 Да.

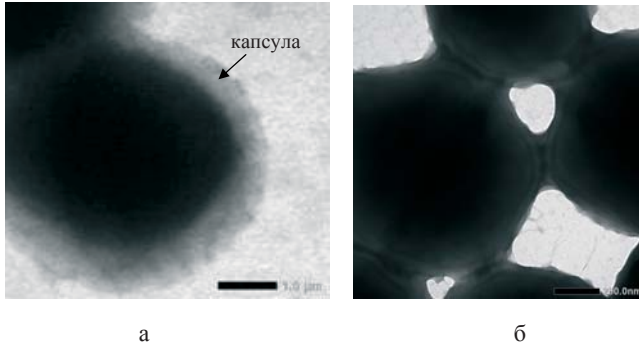
Знесолені екстракти заморозували при -50°C, ліофілізували та зберігали при температурі 4°C.

**Результати та їх обговорення.** Згідно з численними роботами, тейхоєві кислоти отримують із фрагментів клітинних стінок бактерій, які попередньо отримують із використанням мікробних дезінтеграторів [10]. Однак при такому підході можуть виникати труднощі, пов'язані із особливостями клітинних стінок окремих груп мікроорганізмів, зокрема молочнокислих бактерій. Альтернативним методом є отримання тейхоєвих кислот із цілих клітин [4]. Він передбачає екстрагування трихлороцтовою кислотою із нативних клітин без їх попереднього руйнування. При отриманні тейхоєвих кислот із різних груп бактерій слід враховувати особливості їх будови, зокрема наявність капсули. Тому ми модифікували нашу методику отримання тейхоєвих кислот, застосувавши спосіб її розчинення при отриманні капсульних полісахаридів [15].

Як раніше нами показано з використанням електронної мікроскопії (рис. 1, а), клітинна поверхня досліджуваних штамів вкрита щільною капсулою, що перешкоджає ефективній екстракції тейхоєвих кислот, інтегрованих в клітинну стінку [7]. Тому першим етапом роботи була обробка клітин 0,5 % фенолом з метою позбавлення від капсульного матеріалу, компоненти якого також можуть екстрагуватися трихлороцтовою кислотою. Як видно на рис. 1, б, клітини *E. faecium* K-50 після обробки фенолом втрачали поверхневий капсульний шар. Слід зазначити, що при виділенні тейхоєвих кислот із клітинних стінок капсульний шар не є перешкодою, оскільки відокремлюється на етапі отримання клітинних компонентів. При екстракції тейхоєвих кислот із цілих клітин позбавлення від капсул є обов'язковим етапом.

Наступним кроком була екстракція тейхоєвих кислот із клітин молочнокислих бактерій із застосуванням трихлороцтової кислоти з подальшим осадженням етанолом. Зважаючи на поліаніонну природу тейхоєвих кислот, очистку отриманого екстракту проводили шляхом застосування іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі. Так як усі тейхоєві кислоти містять у своєму складі залишки фосфорної кислоти і, як правило, цукровий компонент, в отриманих фракціях аналізували вміст фосфору та вуглеводів [14]. Відомо, що в процесі екстракції трихлороцтовою кислотою можуть виділятися нуклеїнові кислоти, що також містять фосфор та вуглеводні компоненти, про що свідчать роботи інших авторів [4]. У процесі ек-

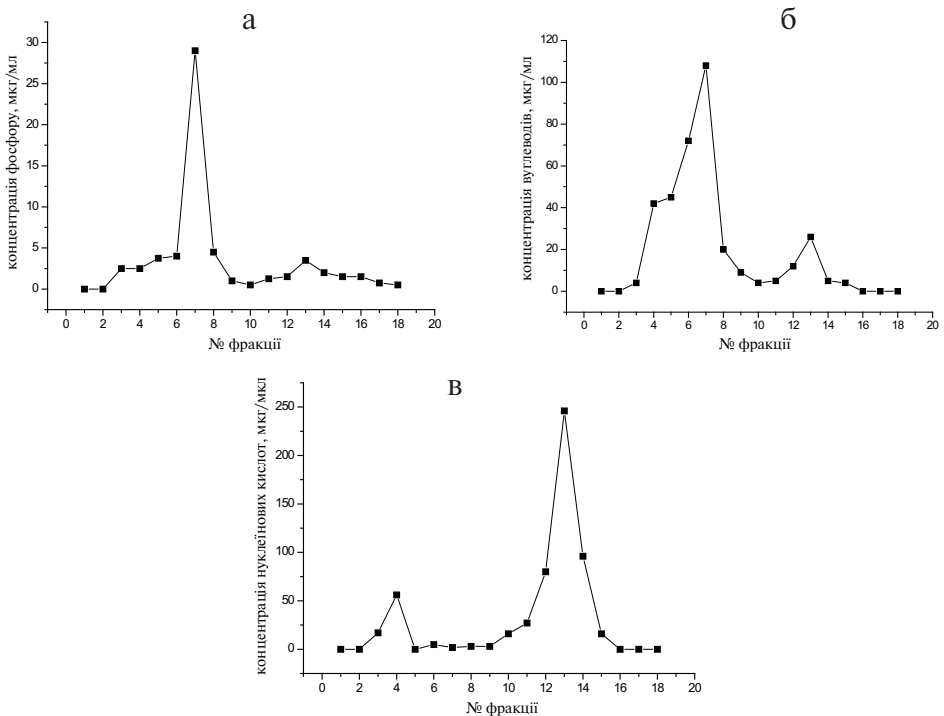
тракції не застосовували обробку матеріалу ферментами (ДНК-за, РНК-за), тому проводили аналіз фракцій на вміст нуклеїнових кислот.



**Рис. 1.** Клітини *E. faecium* K-50

**а – контроль, б – після обробки 0,5 % фенолом протягом 4 год.**

На рис. 2 представлено хроматограму ТХО-екстракту, що містить тейхоєві кислоти штаму *L. plantarum* 195 D. Максимальна концентрація фосфору спостерігалася у фракції № 7 (29 мкг/мл). Концентрація фосфору в інших фракціях не перевищувала 5 мкг/мл. (рис. 2, а). Аналіз кількості вуглеводів показав підвищену їх концентрацію в 4-й, 5-й, 6-й фракціях та найвищу – в сьомій (108 мкг/мл) (рис. 2, б). Вміст нуклеїнових кислот був найвищий у 13-й фракції (246 мкг/мл), а 4-та, 12-та 14-та фракції містили 56, 80 та 96 мкг/мл відповідно (рис. 2, в). Максимум елюції тейхоєвої кислоти зареєстровано при використанні NaCl у концентрації 0,25M. Після порівняльного аналізу вмісту отриманих фракцій нами було відібрано для подальшої роботи фракцію № 7, як таку, що містить низьку концентрацію нуклеїнових кислот та найвищу концентрацію фосфору та вуглеводів.

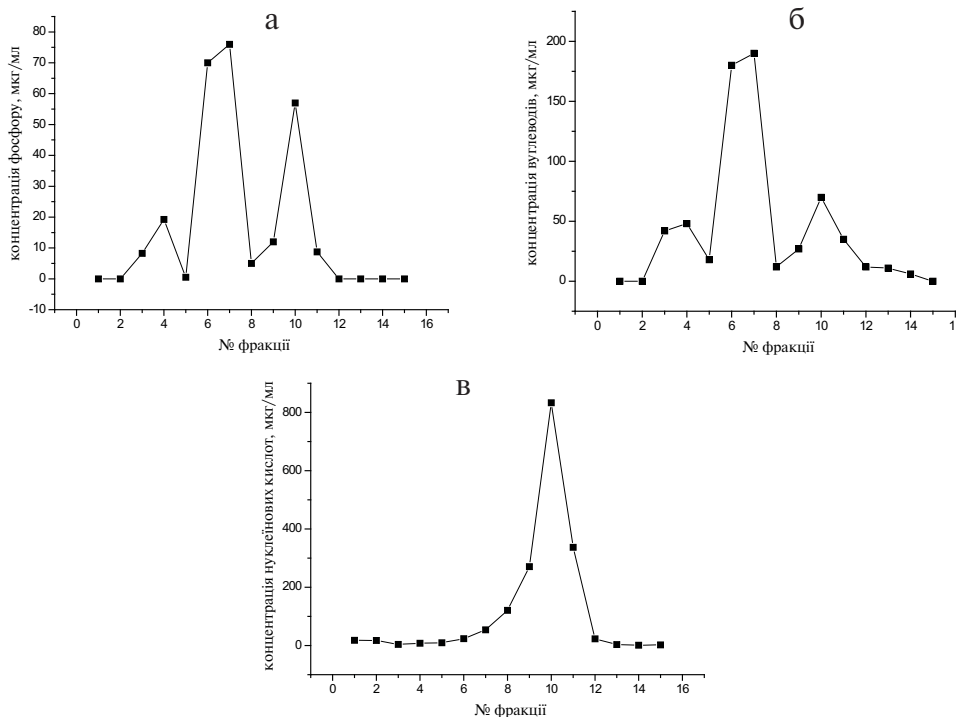


**Рис. 2.** Іонообмінна хроматографія ТХО-екстракту тейхоєвої кислоти штаму *L. plantarum* 195D

**а – вміст фосфору у хроматографічних фракціях, б – вміст вуглеводів,**

**в – вміст нуклеїнових кислот**

Як видно з хроматограми ТХО-екстракту, що містить тейхоеві кислоти штаму *L. plantarum* 11/16, найвищі концентрації фосфору зареєстровано у 4-й, 10-й, 6-й та 7-й фракції (48, 57, 70 та 76 мкг/мл) (рис. 3, а). Концентрації вуглеводів були високі у 7-й, 6-й та 10-й фракціях (190, 180 та 70 мкг/мл) (рис. 3, б). Аналіз вмісту нуклеїнових кислот показав їх найвищу концентрацію у 10-й фракції (833 мкг/мл). Фракції № 11 та 9 також містили істотну їх кількість (337 та 270 мкг/мл відповідно) (рис. 3, в). Для подальшої роботи нами було відібрано 6-ту та 7-му хроматографічні фракції.

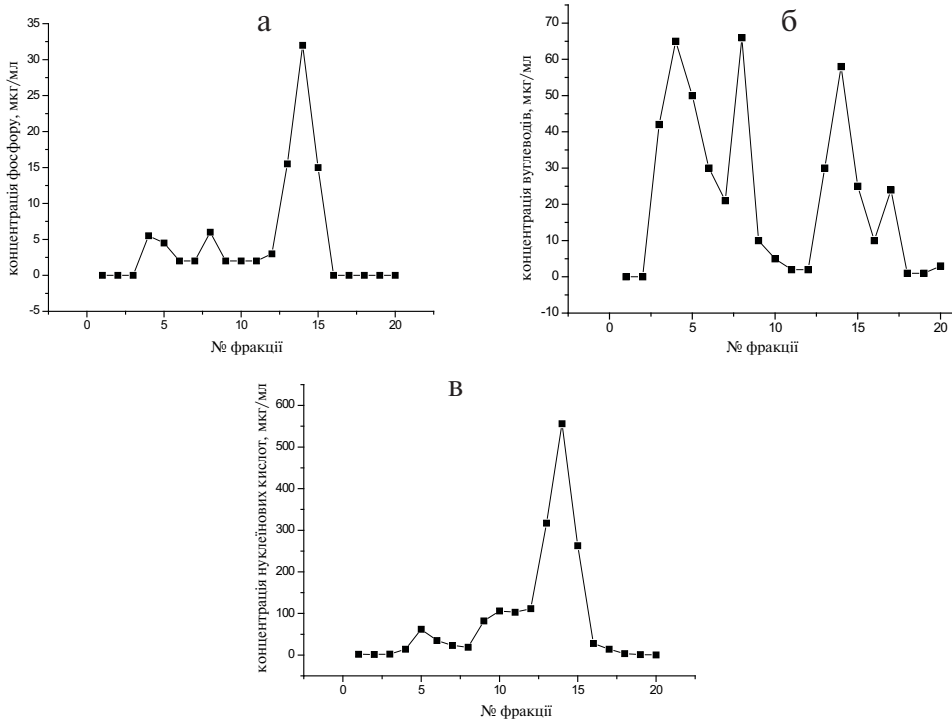


**Рис. 3.** Іонообмінна хроматографія ТХО-екстракту тейхоеві кислоти штаму *L. plantarum* 11/16

**а** – вміст фосфору у хроматографічних фракціях, **б** – вміст вуглеводів, **в** – вміст нуклеїнових кислот

При очищенні тейхоеві кислоти штаму *E. faecium* K-50 в отриманих піках спостерігалася доволі низька концентрація фосфору (5,5, 6,0 та 15,5 мкг/мл фосфору у 4-й, 8-й та 14-й фракціях відповідно) (рис. 4, а). Вміст вуглеводів був підвищений у 3-й, 5-й, 14-й, 4-й та 8-й фракціях, що відповідає їх концентраціям 42, 50, 58 65 та 66 мкг/мл (рис. 4, б). Дослідження фракцій на вміст нуклеїнових кислот показав, що вони присутні найбільшою мірою в 15-й, 13-й, та 14-й аліквотах, що відповідає концентраціям 263, 317 та 556 мкг/мл відповідно. (рис. 4, в). Слід зазначити, що піки концентрацій фосфору та нуклеїнових кислот не збігаються, що можливо свідчить про наявність в екстракті двох типів досліджуваних фосфоровмісних та вуглеводовмісних біомолекул. З іншого боку, концентрація вуглеводів у 4-й та 8-й фракціях, що були відібрані нами для подальшої роботи, була практично однаковою. Це може свідчити про різну ступінь фрагментації біополімеру, що вийшов різними фракціями.

Отже, метод екстракції тейхоевих кислот молочнокислих бактерій із цілих клітин трихлороцтовою кислотою може бути альтернативою методам, що передбачають механічне руйнування клітин бактерій. Використання на першому етапі фенольної обробки є необхідною процедурою, оскільки штами молочнокислих бактерій зазвичай мають щільну капсулу, що може перешкоджати процесу екстракції. Застосування адаптованого нами методу дозволило виділити тейхоеві кислоти із нативних клітин молочнокислих бактерій різних таксономічних груп. Вміст тейхоевих кислот залежав як від видової, так і штамової приналежності. Із одержаних результатів також можна зробити висновок про гетерогенність досліджуваних біомолекул, що спричинило різний характер їх елюції в процесі іонообмінної хроматографії.



**Рис. 4.** Іонообмінна хроматографія ТХО-екстракту тейхоєвої кислоти штаму *E. faecium* K-50  
**а** – вміст фосфору у хроматографічних фракціях, **б** – вміст вуглеводів,  
**в** – вміст нуклеїнових кислот

Таким чином, із трьох промислових пробіотичних штамів молочнокислих бактерій нами було виділено тейхоєві кислоти, проведено їх очистку та отримано ліофільно висушені препарати для подальшої роботи з вивчення фізико-хімічних властивостей та біологічної ролі в пробіотичній активності молочнокислих бактерій.

*Е.П. Ливинская, И.Л. Гармашева, В.Н. Васильев, Н.К. Коваленко*

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев*

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ ТЕЙХОЕВЫХ КИСЛОТ ИЗ НАТИВНЫХ КЛЕТОК ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

#### **Резюме**

Получены тейхоевые кислоты пробиотических штаммов молочнокислых бактерий методом экстракции из нативных клеток с последующей очисткой выделенных экстрактов с применением ионообменной хроматографии. Отобранные фракции содержали высокие концентрации фосфора и не содержали нуклеиновые кислоты. Содержание тейхоевых кислот зависело как от видовой, так и от штаммовой принадлежности. Выявлена гетерогенность исследуемых биомолекул.

Ключевые слова: тейхоевые кислоты, ионообменная хроматография, молочнокислые бактерии.

*O. P. Livinska, I. L. Garmasheva, V.N. Vasilyev, N. K. Kovalenko*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

### **METHODICAL APPROACHES TO ISOLATION OF TEICHOIC ACIDS FROM NATIVE CELLS OF LACTIC ACID BACTERIA PROBIOTIC STRAINS**

#### **S u m m a r y**

Teichoic acids of lactic acid bacteria probiotic strains have been obtained by extraction from native cells, followed by purification of extracts using ion exchange chromatography. Selected fractions contained high

concentrations of phosphorus and did not contain nucleic acids. The content of teichoic acid depended on the species and strain specificity. Heterogeneity of the studied biomolecules was revealed.

The paper is presented in Ukrainian.

**Key words:** teichoic acid, anion-exchange chromatography, lactic acid bacteria.

**The author's address:** *Livinska O. P.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. *Арчибальд А.Р.* Методы исследования углеводов. - М.: Высш. шк., 1975. - 350 С.
2. *Вьелгжанина Е. С., Дмитриева Н. Ф., Наумова И. Б., Чеканова Ю. И., Епишин., Оксман Т. М.* Строение и свойства тейхоевых кислот стрептококка группы А типа М 29 // Антибиотики и химиотерапия. - 1989. - **34**, № 8, - С. 572 - 579
3. *Дерябин П.Н., Каральник Б.В.* Биологические свойства и использование тейхоевых кислот микроорганизмов // ЖМЭИ. - 1983. - **9**. - С. 26-29.
4. *Захарова И.Я., Косенко Л.В.* Методы изучения микробных полисахаридов. - Киев: Наук. думка, 1988. - 189 с.
5. *Квасников Е.И., Коваленко Н.К., Нестеренко О.А.* Молочнокислые бактерии в природе и народном хозяйстве// Прикладная биохимия и микробиология - 1982. - **18**, №6, - С. 821-834.
6. *Квасников Е.И., Нестеренко О.А.* Молочнокислые бактерии и пути их использования. - М.: Наука, 1975. - С. 141-153.
7. *Ливинская Е. П., Коваленко Н. К., Гармашева И. Л.* Дезинтеграция лактобацилл и энтерококков для получения фрагментов клеточных стенок // Микробиол. журн. - 2011. - **73**, №3, - С 26-32.
8. *Наумова И.Б. Шапков А.С.* Лизилтейхоевая кислота клеточной стенки *Streptomyces roseoflavus* var. *Roseofungini* 1128 // Биоорганическая химия - 1982. - **8**, №6, - С. 848-856.
9. *Потехина Н.* Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грамположительных бактерий // Успехи биологической химии. - 2006. - **46**. - С.225-278.
10. *Шапхаев Э. Г., Цыранов В. Ж., Чибунина Е. И.* Дезинтеграция микробных клеток: Учебное пособие. - Улан-Удэ.: ВГСТУ, 2001. - 96 с.
11. *Cameron M., McMaster L. D., Britz T. J.* Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound // Ultrason. Sonochem. - 2008. - **15**. - P. 960-964.
12. *Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H.* Microdetermination of phosphorus // Anal.Chem. - 1956. - **28**. - P. 1756-1758.
13. *DuBois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. - 1956. - **28**, N 3. - P. 350-356.
14. *Tomita S., Urihata K., Ukada T., Satoh E., Chimura T.* Structures of two monomeric units of teichoic acid prepared from the cell wall of *Lactobacillus plantarum* NRIC 1068 // Biosci. Biotechnol. Biochem. - 2009. - **73**, N 3 - P. 530-535
15. *Yang Z., Li S., Zhang X., Zeng X., Zhao Y., Zhang J.* Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products // J. Biosci. and Bioeng. - 2010. - **110**, N.1 - P. 53-57.

Отримано 27.04.2011