

*В. С. Трунилина**

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА
АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЦИАНОБАКТЕРИЙ *SPIRULINA PLATENSIS***

Поиск антибиотических веществ, которые могут быть эффективными против устойчивых штаммов и не подвергаться резистентности со стороны бактерий, становится все более необходимым из-за распространения множественной лекарственной устойчивости и запросов рынка. Природные антимикробные соединения, полученные из цианобактерий, полностью соответствуют этим условиям.

Цианобактерии продуцируют широкий спектр антимикробных пептидов благодаря своей необычайной синтетической пластичности, наделенной способностью синтезировать не только рибосомные, но и нерибосомные пептиды.

Антимикробные пептиды могут быть получены химическим синтезом, однако существуют ограничения в отношении их длины – синтезировать пептиды длиннее 30 аминокислотных остатков является достаточно сложной задачей. Кроме того, химически синтезированные пептиды не могут занимать требуемую пространственную структуру. В отличие от них, пептиды, продуцируемые в живом организме, имеют определенную кладку, которая играет роль в их антимикробных свойствах, и синтезированная молекула будет уступать естественному аналогу.

Антимикробные пептиды представляют собой катионные молекулы, состоящие из 8 – 45 аминокислотных остатков. Они отличаются низкой резистентностью, обусловленной их множественными механизмами действия. Воздействие антимикробных пептидов на клетки может быть разделено на два основных типа: либо ингибируют метаболические процессы, либо нарушают целостность клеточной мембраны. Они действуют на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, а также на грибы, вирусы и простейшие, но не обладают цитотоксичностью по отношению к нормальным клеткам млекопитающих, селективностью по отношению к воде [1].

* Работа выполнена под руководством д-ра техн. наук, профессора, заведующего кафедрой «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» ФГБОУ ВО «ТГТУ» Д. С. Дворецкого.

У большинства антимикробных пептидов преобладает высокое количество основных (лизин, аргинин, гистиин) и неполярных гидрофобных аминокислотных остатков (чаще всего аланин, изолейцин, лейцин, валин). Доля этих остатков в молекуле пептида может достигать 30...50%. Характер, соотношение и распределение заряженных, нейтральных, гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков в молекуле антимикробных пептидов играют решающую роль в определении их заряда, который влияет на способность взаимодействия пептида с поверхностью микробной клетки. Также они обуславливают амфипатичность антимикробных пептидов, т.е. пространственное разделение гидрофильных и гидрофобных областей в молекуле, что позволяет им проникать в мембраны бактериальных клеток и, в некоторых случаях, в клеточные мембраны различных эукариотических организмов, начиная с простейших и заканчивая млекопитающими. Это осуществляется через взаимодействие с липидами, которые обладают гидрофильными и гидрофобными свойствами. Аминокислотная последовательность и состав антимикробных пептидов также влияют на их структуру и многообразие механизмов, которые обеспечивают их антимикробную активность.

Антимикробные пептиды широко применяют в медицине, в ветеринарии, в сельском хозяйстве, в качестве кормовых добавок, как консерванты, в биохимических исследованиях.

Важной задачей является создание новых антибиотиков, способных предотвратить появление ранее неизвестных видов микроорганизмов, устойчивых к уже существующим антимикробным средствам.

Цианобактерии представляют собой перспективный источник антимикробных веществ, с высокой вероятностью нахождения в них новых, более эффективных молекул. Кроме того, они богаты разнообразными органическими соединениями, такими как пептиды, белки, липиды, витамины, пигменты, углеводы, терпеноиды, полиненасыщенные жирные кислоты, флавоноиды, фенольные соединения и другие. Эти компоненты могут потенциально использоваться для разработки биофармацевтических препаратов [2]. Их адаптивность позволяет легко культивировать их в лаборатории, требуя небольшого количества неорганических питательных веществ.

В качестве продуцента для получения антимикробных пептидов предлагается использовать штамм цианобактерии *Spirulina platensis* IPPAS B-256, обладающий высокой способностью накапливать антибиотические вещества и характеризующийся следующими особенностями: способен выживать в широком диапазоне условий культивиро-

вания как в открытых, так и в закрытых системах; имеет высокую скорость роста и высокую скорость накопления конкретного продукта.

Белок, содержание которого может достигать 60...70% биомассы, является важным компонентом цианобактерий. Синтез белка тесно связан с поглощением азота, поскольку азот является важным его элементом. Для стимулирования синтеза белка в клетках цианобактерий можно повысить концентрацию азота в культуральных средах. Содержание углерода может влиять на усвоение азота в цианобактериях, что еще больше влияет на синтез белка. Таким образом, для стимулирования синтеза белка, в дополнение к улучшению содержания азота в питательных средах, следует повысить содержание углерода [3].

Для жизнедеятельности цианобактерий используется питательная среда Зарука, вода, подача воздуха в качестве аэрации и перемешивания среды. Продуцент является фотосинтезирующим и ему требуется постоянная освещенность 2000 лк. Процесс культивирования осуществляется при температуре 35 °С продолжительностью 10 суток. Поддержание pH на уровне 9,6 обеспечивается подачей питательных солей.

Концентрирование при помощи центрифугирования необходимо проводить с целью уменьшения влажности биомассы с 98% до 50...60% для эффективного выделения целевого компонента путем отделения от нее остатков питательной среды и продуктов жизнедеятельности без изменения химического состава клеток.

Клеточная стенка цианобактерий является жесткой из-за наличия одного или двух пептидогликанового слоя и препятствует экстрагированию продукта. Перед подачей биомассы на экстрагирование необходимо провести дезинтеграцию клеточных стенок для облегчения проникновения экстрагента и извлечения целевого компонента. Основываясь на физико-химических особенностях целевого компонента было целесообразно использовать ультразвуковой метод разрушения клеточных стенок. Для сокращения капитальных и эксплуатационных затрат экстрагирование следует проводить вместе с дезинтеграцией клеток одновременно.

Процесс разделения необходим для отделения белково-водной суспензии от отработанного экстрагента и пермеата (небелковый азот, углеводы, ДНК, хлорофилл) в целях улучшения процесса гидролиза. Очистку от этих загрязняющих веществ осуществляют при помощи ультрафильтрации.

Для получения антимикробных пептидов требуется выполнить гидролиз белков, который осуществляется при 37 °С под воздействием

ферментов. Этот процесс, известный как протеолиз, позволяет разрушать конкретные участки пептидных цепей.

Для разделения пептидов на фракции часто используют хроматографические методы.

В полученной фракции антимикробных пептидов процент влагосодержания составляет 65%. Для достижения требуемой влажности (6%) используется процесс сушки.

Фасовку антимикробных пептидов производят в герметичную упаковку с целью разделения объема на фиксированные порции и обеспечения защиты от внешних воздействий (прямые солнечные лучи, повышенная влажность, температура). Хранить антимикробные пептиды нужно обязательно в герметичной упаковке без доступа прямых солнечных лучей и влаги, так как под их воздействием препарат может поменять свою структуру. Температура хранения должна быть в пределах от 4 до 25 °С. Срок годности устанавливается средний, от 1 года до 5 лет.

Список литературы

1. Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis* / S. Yijun, C. Rong, L. Qingye, L. Bosheng. // European Food Research and Technology. – 2015. – P. 8.
2. Algae and cyanobacteria as a source of novel bioactive compounds for biomedical applications. In Advances in Cyanobacterial Biology / S. Kini, M. Divyashree, M.K. Mani, B.S. Mamatha // Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. – 2020. – P. 173 – 194.
3. Qian, L. Application of microalgae biotechnology for the sustainable development of aquaculture / L. Qian, X. Yu, C. Fufeng // Advances in Bioenergy. – 2021. – V. 6, No. 1. – P. 117 – 163.

Кафедра «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» ФГБОУ ВО «ТГТУ»