



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«01» квітня 2021 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Ковшар Ірині Дмитрівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання ентероцинів культивуванням *Enterococcus faecalis*

керівник роботи Стабніков В.П., професор, д.т.н.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року №228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2021 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Enterococcus faecalis* 14, цільовий продукт: ентероцин

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика ентероцину. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез ентероцину. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва ентероцину. РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва ентероцину – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва ентероцину – 1 аркуш формату А1. Схема автоматизації ділянки біосинтезу ентероцину – 1 аркуш формату А3.

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва ентероцину	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання «1» квітня 2021 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика ентероцину	01.04.21-03.04.21	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.	04.04.21-11.04.21	
3.	Техніко-економічне обґрунтування.	11.04.21-17.04.21	
4.	Біосинтез ентероцину	17.04.21-18.04.21	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми.	18.04.21-23.04.21	
6.	Специфікація обладнання.	24.04.21-30.04.21	
7.	Опис технологічної схеми.	01.05.21-06.05.21	
8.	Контроль виробництва.	06.05.21-09.05.21	
9.	Автоматизація ділянки виробництва.	10.05.21-14.05.21	
10.	Охорона довкілля.	15.05.21-19.05.21	
11.	Оформлення пояснювальної записки	20.05.21-24.05.21	
12.	Виконання графічної частини проекту	25.05.21-31.05.21	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Ковшар І.Д.**

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Стабніков В.П.**

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

## ЗМІСТ

<b>РЕФЕРАТ</b> .....	6
<b>ВСТУП</b> .....	7
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЕНТЕРОЦИНУ</b> .....	9
<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b> .....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Enterococcus faecalis</i> 14.....	18
2.3. Таксономічний статус <i>Enterococcus faecalis</i> 14.....	19
<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</b> .....	21
3.1. Потреба в ентероцині.....	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	24
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	25
3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу.....	25
<b>РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЕНТЕРОЦИНУ</b> .....	28
4.1. Шляхи катаболізму глюкози у <i>Enterococcus faecalis</i> 14.....	28
4.2. Біотрансформація глюкози в ентероцин.....	29
<b>РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b> .....	34
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	34
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	34
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря...	36
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів .....	37
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.	42
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення ентероцину.....	44
5.2.1. Обґрунтування відділення біомаси <i>Enterococcus faecalis</i> від ентероцину.....	45
5.2.2. Вибір способу виділення ентероцину з супернатанту.....	46

5.2.3. Вибір способу сушіння та сушарки.....	47
5.2.4. Обґрунтування вибору стабілізатору.....	48
5.2.5. Обґрунтування упаковки, об'єму пакування.....	49
5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення Ентероцину.....	49
5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	50
<b>РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....</b>	<b>53</b>
<b>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....</b>	<b>56</b>
<b>РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....</b>	<b>66</b>
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....	66
8.2. Мікробіологічний контроль.....	66
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	72
8.3.1. Концентрація біомаси.....	72
8.3.2. Концентрація ентероцину.....	73
8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	74
8.4. Показники якості готового продукту.....	77
<b>РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....</b>	<b>80</b>
<b>РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....</b>	<b>86</b>
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва ентероцину на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	86
10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	88
10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	88
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	90
10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	90
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	90
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>92</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>107</b>

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці виробництва ентероцинів, шляхом культивування ізольованого штаму *Enterococcus faecalis* 14, що за 18 годин утворює 5,942 г/л бактеріоцину. Ентероцин – це білок, який має антимікробні властивості проти патогенних мікроорганізмів, а особливо проти *Clostridium perfringens*, що є збудником некротичного ентериту у курей. З метою використання даного мікробного білку як кормової добавки до комбікорму розрахована річна потужність виробництва, яка становить 16,9 культуральної рідини або 75,2 кг білку за рік.

Виробництво ентероцину передбачає ряд допоміжних робіт, які включають в себе підготовку аераційного повітря для сушіння ультраконцентрату, підготовку та стерилізацію титрувальних агентів, приготування та стерилізацію поживних середовищ. До технологічного процесу виробництва ентероцину відносяться підготовка посівного матеріалу, виробництво культивування та стадії виділення, які включають в себе центрифугування біомаси, ультрафільтрацію супернатанту, висушування ультраконцентрату, стабілізацію порошку ентероцину з подальшим пакуванням. Технологія виробництва ентероцину зазначено в технологічній та апаратурній схемах кваліфікаційної роботи.

Кваліфікаційна робота включає в себе 106 сторінок друкованого тексту, включаючи 18 таблиць та 9 рисунків, складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (130 найменувань) та графічної частини (2 листа формату А1 та 1 лист формату А3).

**Ключові слова:** ентероцин, мікробний білок, антибіотикорезистентність, комбікорм, некротичний ентерит, ентерококи, *Enterococcus faecalis* 14, ультрафільтрація, імуноферментний аналіз.

## ВСТУП

Реалії сьогодення демонструють велику потребу людства у якісних та безпечних харчових продуктах. Значна необхідність постає саме в продуктах тваринництва. За статистикою кожного року виробництво продуктів тваринного походження збільшується мінімум на 0,4% [1,2].

У структурі валової продукції сільського господарства, тваринництво становить понад 38%. Найбільшу частину ринку цього сегменту агропромисловості займає птахівництво, оскільки воно є найбільш ефективною галуззю, найбільш мобільною та вигідною, яка може розвиватися на обмеженій території. Висока біологічна скороспілість і високий відтворювальний цикл забезпечують динамічне постачання свіжої висококалорійної продукції споживачам [1,3].

Але досить гостро постає проблема щодо антибіотикорезистентності патогенних штамів мікроорганізмів, які мають згубну дію щодо поголів'я птиці. Одним з таких захворювань є некротичний ентерит [1,4].

В умовах ведення інтенсивного птахівництва некротичний ентерит зараз реєструється по всьому світу. Головним збудником некротичного ентериту птахів вважається бактерія *Clostridium perfringens*. Дана хвороба у молодняку птиці перебігає за типом токсикоінфекції, супроводжується високим рівнем захворюваності та летальності (10-60 %) [4].

Якщо не боротися з даним захворюванням, падіж птиці може досягти 1 % від стада в день, а загальна втрата – 10-40 %. Ще більше збитків приносить прихована форма хвороби, адже її, як правило, не виявляють і не лікують, а продуктивність птиці тим часом різко зменшується [4].

Некротичний ентерит і до нині лікують різними антибіотичними препаратами, а також проводять профілактику за допомогою спеціалізованих комбікормів. Та за останніми дослідженнями показано неефективність відомих

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ док.м.	Підпис	Дата	<i>ВСТУП</i>	Лім.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Ковшар І.Д.						
Перевір.		Стабніков В.П.					7	109
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

антибіотиків щодо *Clostridium perfringens*, як основного збудника даного захворювання. Таким чином, раніше лікування та профілактику проводили за допомогою віргініаміцину та бацитрацину, які нині є забороненими для боротьби з даним захворюванням [4].

Для уникнення хвороби, а також зменшення використання антибіотиків застосовують профілактичні дії, шляхом введення комбікормів з антибіотичними добавками. Такий підхід звісно зменшує навантаження на організм та дозволяє йому уникнути небажаного захворювання, але він не вирішує проблему виникнення антибіотикорезистентності.

Сьогоднішній ринок пропонує велику кількість різних кормів з використанням антибіотиків, які за короткий термін стають неефективними. Але замінників або не представлено, або вони мають ряд недоліків, порівняно з антибіотиками [1].

Така ситуація на українському ринку доводить, що **актуальним** є винайдення альтернативних препаратів, які можуть забезпечити здорове поголів'я птиці та, як результат, якісні харчові продукти. Одним з таких замінників може стати бактеріоцин ентерококів – ентероцин, який має високу активність проти бактерій *Clostridium perfringens* і може забезпечити вихід відмінного продукту та задовольнити кінцевого споживача.

**Новизною** данної кваліфікаційної роботи є впровадження ефективної технології культивування *Enterococcus faecalis* 14 для отримання ентероцину як альтернативи антибіотичним речовинам, з подальшим використанням його для профілактики некротичного ентериту та можливим розширенням ринку комбікормів України.

## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЕНТЕРОЦИНУ

Ентероцини – антимікробні агенти, які відносяться до бактеріоцинів II класу за їх молекулярною масою ( $kDa < 10$ ) [5].

В залежності від консенсусної послідовності (нуклеотидний або ж амінокислотний ланцюг, що періодично повторюється) відносяться до 3 та 8 груп. В перспективі розглядаються як безпечні натуральні презерванти або, біоконсерванти, які відносяться до групи безпечних речовин або, так званої GRAS-групи (Generally regarded as safe) [5,6].

За структурою ці сполуки є циклічними пептидами, які є термостабільними та виявляють свою активність в широкому діапазоні рН (від 2 до 10). Оптимальне рН в межах від 4 до 6, дезактивація спостерігається при рН 11. Не є токсичними, мають слабку імуногенність. Проявляють гідрофобні властивості [7-9].

Оскільки ентероцини є термостабільними бактеріоцинами, вплив високих температур не призводить до їхнього руйнування. Є повідомлення, що підвищенні температури до 80°C за часом витримки 15 і 30 хвилин не впливає на показники активності [10].

Ентероцини діють наступним чином. Прийнято вважати, що ці сполуки зв'язують специфічний рецепторний білок на мембрані клітини-мішені. Коли встановлено міжбілковий зв'язок, в мембрані утворюються гідрофільні пори. Це призводить до відтоку цитоплазматичних компонентів, іонів, а також до розсіювання трансмембранного електричного потенціалу. Але досі не відомо, які саме процеси запускають утворення мембранних пор після того, як бактеріоцин пізнає рецептор. Про це повідомляється в статті 2019 року. Ентероцини викликають пошкодження цитоплазматичної мембрани грамполозитивних, а за сучасними описами в літературі й грамнегативних бактерій [5,8-13].

Більшість ентероцинів пригнічують ріст таких бактерій як *Listeria*

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>		<i>Ковшир І.Д.</i>			<b>РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ЕНТЕРОЦИНУ</b>					
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архивів</i>
<i>Реценз.</i>									9	106
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>								

*monocytogenes*, *L. innocua*, *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* та багато інших [14-16].

Також синтез ентероцинів їх продуцентами залежить від оптимального складу поживного середовища. Попри те, що для культивування ентерококів використовуються дешеві субстрати, їх хімічний склад має містити підвищений вміст джерел азоту, зважаючи на вищезазначену біохімічну природу ентероцину. Наприклад, ентероцин А, синтезований з *Enterococcus faecium* Aus0004, в якісному складі має більшість амінокислот: метіонін, серин, лізин, глутамат, ізолейцин, аспарагін, валін, лейцин, тирозин, аспартат, пролін, аргінін, аланін, треонін, гліцин, глутамін, фенілаланін та гістидин. За кількісним – 99 амінокислот [17].

Як джерела вуглецю використовуються полісахариди, які легко засвоюються мікроорганізмами, такі як глюкоза та сахароза. При використанні більш складних сахаридів, таких як галактоза, арабіноза і мальтоза, бактеріоцин майже або взагалі не синтезується. Вплив органічних та неорганічних солей мало досліджено. Проте деякі дослідження зазначають, що використання кислих солей та солей кальцію призводить до пригніченого синтезу ентероцину [7,11].

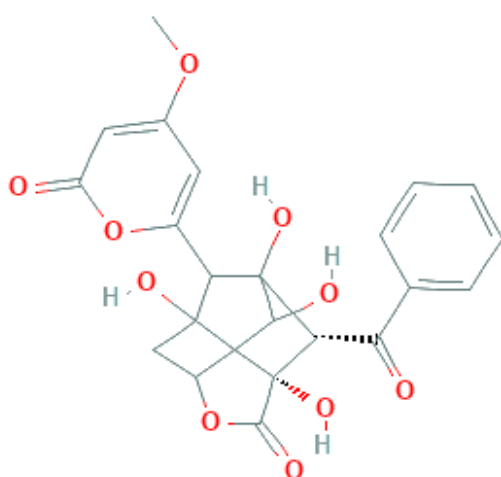


Рис.1.1. Загальна хімічна формула ентероцину [18]

Найвідомішими бактеріоцинами ентерококів є ентероцин А, В і Р. Також наявно багато досліджень про ентероцин SEK4, ентероцин CR35 та ентероцин AS-48 та багато інших. Проте найбільш вивченим на сьогодні є ентероцин А [19].

Також існують бактеріоцини гетеродимери. Тобто в своєму складі мають 2 або більше молекул мікробного білка. Прикладом такого бактеріоцину може бути ентероцин А+В, який в своєму складі має 2 пептиди (ентероцин А і ентероцин В).

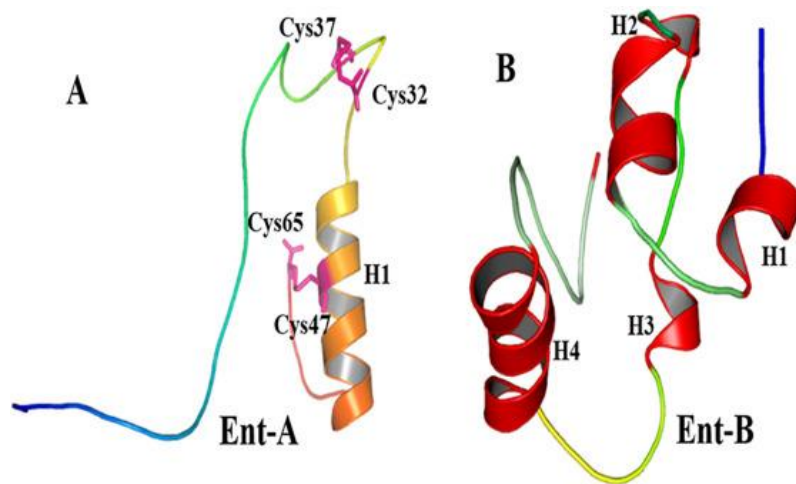


Рис.1.2. Загальні структурні формули ентероцину А та ентероцину В [19]

Дані бактеріоцини, як вже вище зазначалось, використовуються як протидія широкому або вузькому спектру патогенних бактерій, в залежності від інгібуючої дії певного ентероцину. Нові види розробляють з метою подальшої заміни антибіотикам, для виробництва відповідних пробіотиків. Бактеріоцини проявляють антимікробну активність при піко-наномолярних концентраціях, що робить їх дуже привабливими в якості натуральних харчових консервантів. Таке використання бактеріоцинів може сприяти зменшенню вживання хімічних консервантів та фізичних обробок. На сьогоднішній день ентероцини тестують в [11, 20-24]:

- харчовій галузі – для подовження строку придатності продуктів (ферментаційні овочі, риба та м'ясо, молочні продукти);
- фармацевтичній галузі – для уникнення ризику контамінації та створення нових препаратів (захворювання кишково-шлункового тракту, шкірні інфекції, лістеріоз, лейшманіоз), в тому числі і пробіотиків;
- ветеринарії – для створення нових кормових добавок та їх складових.

## РОЗДІЛ 2

### ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

#### 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Використання традиційних мікробіологічних методів для пошуку бактеріоциногенних штамів є малоефективним. Це пов'язано з тим, що спектри антимікробної дії та їх продукція залежить від умов культивування [25].

Оскільки ентероцини мають досить високу антимікробну активність проти патогенних бактерій, пошуки структурних генів, які їх кодують, у продуцентів набули популярності. Для таких досліджень, зазвичай, використовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Такий аналіз проводиться для подальшої розробки генно-інженерного штамів, з метою отримання мікроорганізма, здатного до надсинтезу бажаного продукту. Станом на 2016 рік було показано, що гени даних бактеріоцинів, зокрема ентероцинів А, В, Р, L50А та L50В, дуже поширені серед штамів різного походження [25].

Типовими біологічними агентами ентероцинів є бактерії роду *Enterococcus*. Наприклад, *E. faecium* T136, *E. faecium* PLBC21, *E. faecium* STC492 є продуцентами ентероцину А, *E. faecium* P13 – ентероцину Р, *E. faecalis* UGRA10 – ентероцину AS-48, *E. lactis* – ентероцину А, В та Р [26-29].

Для створення нових рекомбінантних штамів використовують ПЛР, як це було зазначено вище. Такий метод передбачає використання пар праймерів для визначення структурних генів конкретних ентероцинів. Якщо необхідно створити новий штам для продукування ентероцину А, найчастіше використовують структурні гени *E. faecium* T136, як його типового продуцента [25,26].

Таким чином, у 2014 році було отримано рекомбінантні штами *Pichia*

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ковшар І.Д.			РОЗДІЛ 2 ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					12	106
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

*pastoris* X-33 та *Kluyveromyces lactis* GG799, трансформовані плазмідом рPICZαA. У дослідженні вказано порівняння між вказаними дріжджами та їх «попередником», *E. faecium* T136. Дослідження показало наступні результати: найвищий рівень синтезу ентероцину в *P. pastoris* X-33 – 0,0321 г/л за 12 год, в *K. lactis* GG799 – 0,0018 г/л за 8 год. Порівняно з *E. faecium* T136, показники *P. pastoris* X-33 були значно вищими. Щодо *K. lactis* GG799, рівень ентероцину співставний із рівнем ентерококу, оскільки концентрація білка була вища лише на 0,0003 г/л, що свідчить про недоцільність використання цих дріжджів для подальшого використання у синтезі бажаного бактеріоцину [26].

На порядок кращі показники отримані в 2016 році. Порівнювали наступні біологічні агенти: *Enterococcus hirae* EHE 8, *E. hirae* EHE 10, *E. hirae* EHE 18, *E. faecalis* EFE 9, *E. faecalis* EFE 15 та *E. faecalis* EFE 21. Найвищу концентрацію ентероцину в *E. faecalis* показав штам *E. faecalis* EFE 15, 4,7 г/л за 18 год. Щодо *E. hirae*, за таких самих умов, найпродуктивнішим штамом став *E. hirae* EHE 8, 3,8 г/л. Порівнюючи з дріжджами *P. pastoris* X-33 та *K. lactis* GG799 можна зробити висновок, що середовище та умови для культивування було підібрано дещо краще [26,30].

Станом на 2017 рік з меконію новонароджених був виділений ізольований штам *E. faecalis* 14. Даний мікроорганізм було досліджено на антагоністичну дію проти *Clostridium perfringens* різних штамів. За результатами даного аналізу була визначена також концентрація ентероцину, що становило 5,942 г/л за 18 год [31].

У 2018 році була досліджена антимікробна дія *E. faecalis* UNAD 012. Також зазначалася протигрибкова дія щодо деяких фітопатогенних грибів. В результаті культивування на протязі 96 годин було досягнуто результат в 15,8 г/л ентероцину [32].

В 2021 році був виділений штам ентероцин-продукуючих бактерій *E. faecalis* SH2. Штам був ізольований від хворих на карієс людей. Після оптимізації умов культивування та підбору поживного середовища було встановлено, що за 24 години штам продукує близько 10,5 г/л бактеріоцину ентерококів [33].

Перший етап вибору біологічного агенту базується на порівнянні їхніх показників біосинтезу ентероцину, що вказано в табл. 2.1.

Таблиця 2.1.

**Порівняння показників біосинтезу ентероцину різними біологічними агентами**

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Режим культивування	Концентрація ентероцину, г/л	Література
<i>Pichia pastoris</i> X-33	Пептон – 20; Дріжджовий екстракт – 10; Дріжджова азотна основа без амінокислот – 13,4; Біотин – 0,0004; Гліцерин – 10;	12 год pH=6 30 °C	0,0321	[26]
<i>Enterococcus faecalis</i> 14	Пептон – 10; Мозково-серцевий екстракт – 17,5; Глюкоза – 2; NaCl – 5; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2,5;	18 год pH=7 37 °C	5,942	[31]
<i>Enterococcus hirae</i> EHE 8	Пептон – 10; Мозково-серцевий екстракт – 17,5; Глюкоза – 2; NaCl – 5; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2,5;	18 год pH=7 37 °C	3,8	[30]
<i>Enterococcus faecium</i> 12a	Пептон – 10; М'ясний екстракт – 10; Дріжджовий екстракт – 5; Глюкоза – 20; Твін-80 – 1; C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> – 2; Ацетат натрію – 5; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O – 0,1; MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O – 0,05; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2;	20 год pH=7 37 °C	0,625	[34]

За даними з табл.2.1. можна зробити висновок, що штам *E. faecalis* 14 синтезує найбільшу кількість ентероцину. Та слід зауважити, що зазначене середовище (ВНІ) використовується лише на виробниче культивування. Для накопичення біомаси використовують середовище МРС, що здорожчує умовну вартість білку.

Другим біологічним агентом, за кількість бактеріоцину, є *E. hirae* EHE 8. Даний штам також є ізольованим і культивує досить велику концентрацію ентероцину. Але, технологія синтезу мікробного білку співставна із попереднім штамом. Тобто використовуються 2 середовища для культивування: для виробничого – мозково-сердцевий бульйон (ВНІ), а для накопичення біомаси – МРС.

*E. faecium* 12a показав найнижчі показники типового продуцента. Його накопичення біомаси та виробничий біосинтез проходить на одному середовищі – МРС. Оскільки ентероцин може пригнічувати синтез біомаси свого ж продуцента, то за використання даного штаму не дивно, що за 20 годин культивування утворилась замала концентрація мікробного білку.

Найменшу концентрацію продемонстрував рекомбінантний штам дріжджів *Pichia pastoris* X-33. Причиною, що могла спричинити таку низьку концентрацію, може слугувати погано підібрані умови культивування. Та слід зазначити, що в поживному середовищі присутня дріжджова азотна основа без амінокислот. Оскільки ентероцин є мікробним білком, саме замала кількість нітрогену могла посприяти такій малій концентрації цільового продукту.

Доречно провести аналіз вартості поживних середовищ, оскільки данні наведені в табл.2.1 відображають лише показники культивування. Таке порівняння необхідно зробити з метою перевірки рентабельності середовищ для культивування даних мікроорганізмів. Перерахунок представлено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

**Вартість поживних середовищ, використовуваних для вирощування біологічних агентів**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Pichia pastoris</i> X-33	Пептон – 20	850	17	1
	Дріжджовий екстракт – 10	219,45	2,2	2
	Дріжджова азотна основа без амінокислот – 13,4	877,80	11,8	3
	Біотин – 0,0004	617,20	0,0002	4
	Гліцерин – 10	80	0,8	5
<b>Вартість 1 л поживного середовища – 31,8 грн</b>				

<i>Enterococcus faecalis</i> 14	Пептон – 10	850	8,5	1
	Мозково-серцевий екстракт – 17,5	200,5	3,5	6
	Глюкоза – 2	48	0,1	7
	NaCl – 5	5,20	0,03	8
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2,5	110	0,23	9
	<b>Вартість 1 л поживного середовища – 12,36 грн</b>			
<i>Enterococcus faecalis</i> ЕНЕ 8	Пептон – 10	850	8,5	1
	Мозково-серцевий екстракт – 17,5	200,5	3,5	6
	Глюкоза – 2	48	0,1	7
	NaCl – 5	5,20	0,03	8
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2,5	110	0,23	9
	<b>Вартість 1 л поживного середовища – 12,36 грн</b>			
<i>Enterococcus faecium</i> 12a	Пептон – 10	850	8,5	1
	М'ясний екстракт – 10	1744,80	17,45	10
	Дріжджовий екстракт – 5	219,45	1,1	2
	Глюкоза – 20	48	0,1	7
	Твін-80 – 1	316	0,32	11
	Цитрат амонію – 2	525	1,05	12
	Ацетат натрію – 5	62	0,31	13
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,1	65	0,007	14
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O – 0,05	27,90	0,001	15
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2	90	0,18	16
	<b>Вартість 1 л поживного середовища – 29,02 грн</b>			

**Примітка:** ціни наведено станом на 22.05.2021: 1. <https://shop.hlr.ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>, 2. <https://russian.alibaba.com/product-detail/best-price-yeast-extract-60761737505.html?spm=a2700.8699010.normalList.1.5f9974bdCtR4VF&s=p> 3. [https://russian.alibaba.com/product-detail/yeast-nitrogen-base-without-amino-acids-60819457463.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal\\_offer.d\\_image.2328f0f05J21a0](https://russian.alibaba.com/product-detail/yeast-nitrogen-base-without-amino-acids-60819457463.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.2328f0f05J21a0), 4. [https://russian.alibaba.com/product-detail/supply-1-purity-cyanocobalamin-vitamin-b12-1600109728380.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal\\_offer.d\\_title.75b245ecujaMOM&s=p](https://russian.alibaba.com/product-detail/supply-1-purity-cyanocobalamin-vitamin-b12-1600109728380.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.75b245ecujaMOM&s=p), 5. [https://pischevik.in.ua/index.php?route=product/product&path=76&product\\_id=95](https://pischevik.in.ua/index.php?route=product/product&path=76&product_id=95), 6. <https://catrosa.ru/catalog/mikrobiologiya/352767/>, 7. <https://prom.ua/p570556706-glyukoza-farm.html>, 8. <https://prom.ua/p844126269-sol-pishevaya-ekstra.html>, 9. [https://snabhim.com.ua/gidrofosfat-natriya-1-zameshch-bezvodnyj?gclid=Cj0KCQjwx7zzBRCCARIsABPRscNxWHfEnW3jYVvEP-JY16wGioQcUfBDZM4k3VJjy8AQpdb9aPqLpYwaAmRWEALw\\_wcB](https://snabhim.com.ua/gidrofosfat-natriya-1-zameshch-bezvodnyj?gclid=Cj0KCQjwx7zzBRCCARIsABPRscNxWHfEnW3jYVvEP-JY16wGioQcUfBDZM4k3VJjy8AQpdb9aPqLpYwaAmRWEALw_wcB), 10. <https://www.amazon.com/HiMedia-RM669-500G-Beef-Extract-Powder/dp/B00DYOAXZ6>, 11. <https://www.aromasoap.com.ua/pav/polisorbat-80-ercasorb-2080-tvin-80.html>, 12. <https://mendelevmarket.com/himreaktivy/ammoniy/citrat-ammonija/ammonij-limonnikislj-2-zameshhennij-bv-ch.html>, 13. [https://snabhim.com.ua/acetat-natr-yu-bezvodnij-farm?gclid=Cj0KCQjwx7zzBRCCARIsABPRscPukpXJf7sbFA09aJrHgFJERi3dQOW5fwETq7oYTLKtHewy4CTQSBgaAqpvEALw\\_wcB](https://snabhim.com.ua/acetat-natr-yu-bezvodnij-farm?gclid=Cj0KCQjwx7zzBRCCARIsABPRscPukpXJf7sbFA09aJrHgFJERi3dQOW5fwETq7oYTLKtHewy4CTQSBgaAqpvEALw_wcB), 14. <https://prom.ua/p756858204-magnij-ternokislj-ternovodnyj.html>, 15. <https://himfarminvest.com.ua/margantsa-sulfat>, 16. <https://marganec.prom.ua/p384765961-fosfat-kaliya-kalij.html>

Щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, необхідно розрахувати умовну вартість 1 г ентероцину і кількість утвореного ентероцину для кожного з продуцентів (табл.2.3).

Таблиця 2.3

**Узагальнюючі данні**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ентероцину, г/л	Умовна вартість 1 г ентероцину, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного ентероцину за годину, г/год
<i>Pichia pastoris</i> X-33	31,8	0,0321	990	12	0,003
<i>Enterococcus faecalis</i> 14	12,36	5,942	2,1	18	0,33
<i>Enterococcus hirae</i> EHE 8	12,36	3,8	3,25	18	0,21
<i>Enterococcus faecium</i> 12a	29,02	0,625	45,58	20	0,031

Тож, за результатами порівняння найкращим продуцентом є *Enterococcus faecalis* 14. Саме цей штам синтезує найбільшу кількість ентероцину за годину та є найдешевшим у виготовленні.

Та слід звернути увагу на те, що даний штам не є генно-модифікованим. Це ізольовані мікроорганізми з меконію, тому така велика концентрація може викликати сумнів щодо дійсності цих результатів.

Але, як вже вище зазначалося, є штами ентерококів, які мають навіть вищу синтезувальну здатність до ентероцину. Це такі штами як *E. faecalis* UNAD 012 (15,8 г/л), *E. faecalis* SH2 (10,5 г/л), а також *E. faecalis* В3А-В3В (11,2 г/л). Дані штами також є ізольованими, що підтверджує можливість та дійсність отриманих результатів від *E. faecalis* 14 [32,33,35].

Слід зауважити, що вищезазначені надпродуктивні штами ентероцину не порівнюються з іншими, оскільки немає достатньої кількості досліджень, які б могли підтвердити їх надсинтезувальну здатність. А от бактеріоцин штаму *E. faecalis* 14 досліджується і до сьогодні. Досліджувалась генетична послідовність

та гени, які є відповідними за синтез та активність ентероцину даного біологічного агента. Також, намагались створити генно-модифікований мікроорганізм для синтезу ще більшої концентрації ентероцину, але максимальний вихід становив 0,71 г/л, що є на порядок нижче ізольованого штаму [36-38].

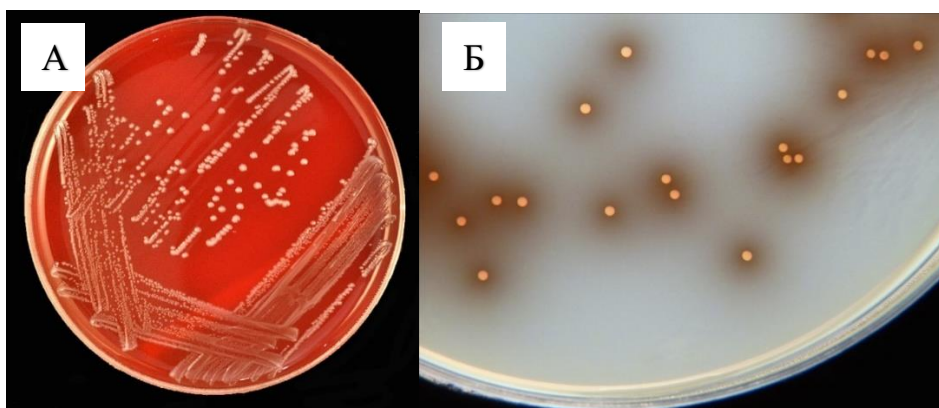
Також, дослідження 2020-2021 року демонструють результати комбінацію ентероцину з іншими бактеріоцину. Наприклад, поєднання нізину або ентероцину DD14 з колістином показав синергетичний ефект проти стійких до колістин штамів *E. coli*, виділених від свиней [39].

Тож, можна зробити висновок, що інтерес до цього штаму нині лише набирає обертів, тому даний штам обираємо як основний біологічний агент для синтезу ентероцину.

## **2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Enterococcus faecalis***

Грампозитивні, круглі або яйцеподібні клітини. Розмір: 0,6-2,0 на 0,6-2,5 мкм. За типом живлення – хемоорганотрофи. Зазвичай вони трапляються попарно або в ланцюгах різної довжини. Не утворюють ні спор, ні капсул. Не мають джгутиків – тому і нерухомі [40-43].

Колонії ростуть на кров'яному або поживному агарі та утворюють круглі, гладкі та цілісні колонії. Більшість штамів є негемолітичними. Рідко штами цієї бактерії виявляють бета-гемоліз [40].



*Рис.2.1. Enterococcus faecalis* на: А – кров'яному агарі; Б – жовчно-ескуліновому агарі (ВЕА) [44,45]

Штами ростуть при 10 і 45 °С, витримують нагрівання при 60 °С протягом 30 хв і вирощують у 6,5% NaCl при рН 9,6 та в 0,1% метиленового синього молока. По відношенню до кисню - факультативні анаероби. При зростанні, що відбувається в присутності 0,04% телуриту і в присутності 0,01% тетразолію, утворюють червоні колонії. Також, культивування може відбуватись в присутності 0,1% талового ацетату та 0,02% азиду натрію. Не потребує фолієвої кислоти для росту. Деякі штами можуть продукувати псевдокаталазу. Каталазо- та оксидазонегативні [40,46].

Позитивні результати для реакції Фогеса-Проскауера, гідролізу гіпурату, гідролізу ескуліну, піролідонілариламідази, аргініну дигідролази, вироблення кислоти з: гліцерину, манітолу, сахарози, трегалози, D-тагатози, рибози, галактози, D-глюкози, D-фруктози, D-маннози, N-ацетилглюкозаміну, саліцину, целобіози, мальтози, лактози, бета-гентиобіози, амігдаліну та арбутину. Утилізує піруват, цитрат, малат та серин [40].

Негативні результати щодо альфа-галактозидази, бета-глюкуронідази, бета-галактозидази, лужної фосфатази, вироблення кислоти з: еритритолу, D-арабінози, L-арабінози, альфа-метил-ксилозиду, інозитолу, D-фукози, L-фукози, D- та L- ксилози, адонітолу, L-сорбози, дульцитолу, альфа-метил-D-маннозиду, альфа-метил-D-глюкозиду, мелібіози, інуліну, D-рафінози, глікогену, ксиліту, D-туранози, D-ліксози, D- або L-арабітолу та 5 –кетоглюконату. Змінні результати виробництва кислоти з: рамнози, сорбіту, мелезітози, крохмалю, глюконату та 2-кетоглюконату [40].

### **2.3. Таксономічний статус *Enterococcus faecalis***

Басонім: *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder 1906 [40].

Історичні синоніми: *Micrococcus ovalis* Escherich 1886, *Streptococcus liquefaciens* Sternberg 1892, *Micrococcus zymogenes* MacCallum and Hastings 1899, "*Enterocoque*" Thiercelin 1902, *Enterococcus proteiformis* Thiercelin and Jouhaud 1903, *Streptococcus glycerinaceus* Orla-Jensen 1919 [40,47,48].

За даними ABIS ENCYCLOPEDIA *Enterococcus faecalis* має наступний таксономічний статус [40]:

Домен: *Bacteria*;  
Відділ: *Firmicutes*;  
Клас: *Bacilli*;  
Порядок: *Lactobacillales*;  
Родина: *Enterococcaceae*;  
Рід: *Enterococcus*;  
Вид: *faecalis*;

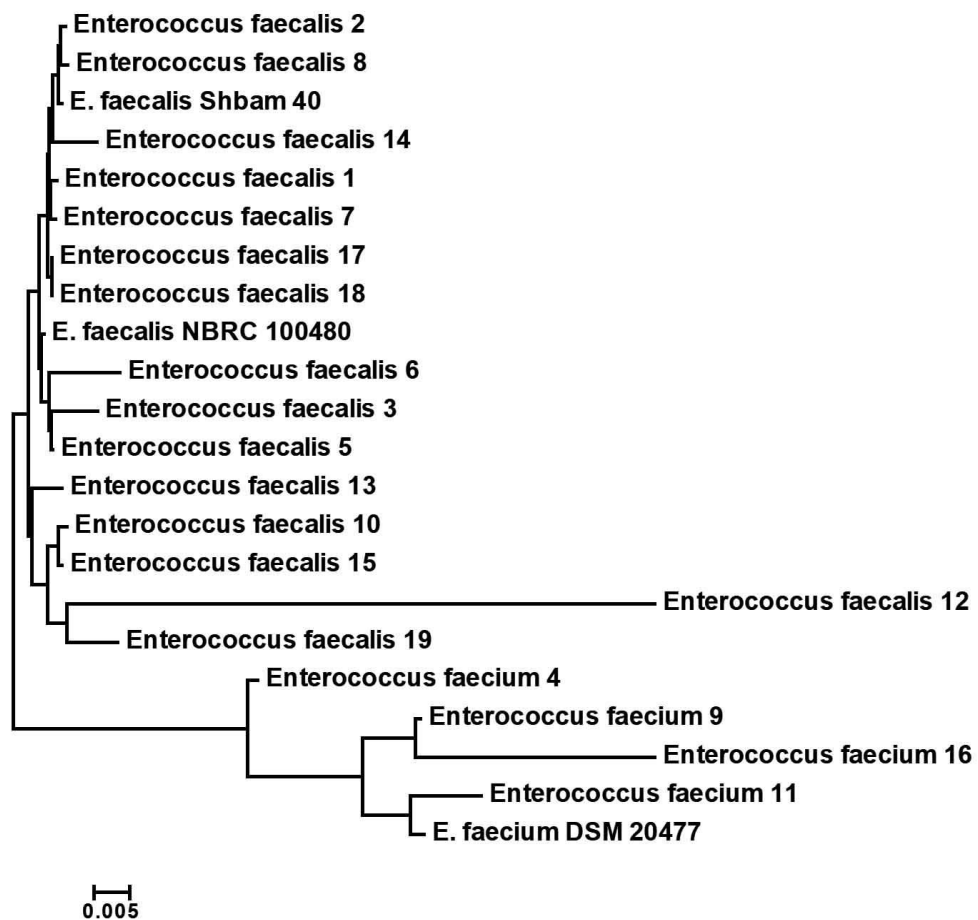


Рис.2.2. Філогенетичний статус *Enterococcus faecalis* 14 [49]

## РОЗДІЛ 3

### ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

#### 3.1. Потреба в ентероцині

Станом на 2020 рік, птахівництво в Україні посягає величезну економічну нішу. Дана сфера тваринництва вирізняється серед інших подібних своєю продуктивністю та автоматизованістю. Виробництво продукції галузі птахівництва безпосередньо впливає на продовольчу безпеку країни. Це пояснюється тим, що ця сфера є основним виробником високоякісного тваринного білка, частка якого в раціонах українців сягає майже 40% за рахунок споживання яєць і м'яса птиці [50-52].

За статистикою, на 2019 рік українцями було спожито 1,4 млн т м'яса курятини та 11,63 млрд яєць. Тобто на 1 людину припадає близько 24,6 кг м'яса птиці та 270 яєць на рік [53,54].

З кожним роком виробництво продуктів птахівництва збільшується на 3-4%. Це пов'язано з відносно дешевим вирощуванням курей та виготовленням харчової продукції в цілому. Як наслідок, виникає низка проблем у харчуванні поголів'я, а саме – харчові захворювання, що можуть призвести до загибелі. Для підтримання здоров'я птахів використовуються високоякісні комбікорми, в складі яких присутні антибіотики. Такими кормами проводять профілактику кокцидіозу, некротичного ентериту та інших харчових захворювань, викликаними патогенними бактеріями. Але, наразі, ефективність використання антибіотичних речовин для лікування ставиться під сумнів, оскільки у великій кількості згубних мікроорганізмів виникла резистентність [55].

Некротичний ентерит (синоніми: клостридіоз, клостридіозний ентерит) – гостре інфекційне захворювання птиці, що характеризується анорексією, депресією, порушенням оперення, діареєю, зниженням приростів і раптовою загибеллю. Збудниками захворювання є *Clostridium perfringens* типу А і С.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ковшар І.Д.			<b>РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ</b>	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					21	106
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

За статистикою, некротичним ентеритом заражуються від 10 до 40% поголів'я. Якщо не лікувати хворобу, смертність птиці може досягати до 50% від числа інфікованих. Відмерлих птахів слід негайно видаляти, оскільки вони можуть стати джерелом токсикозу або інфекції через канібалізм [54,53].

Для вирішення проблеми резистентності та підвищення ефективності, пропонується замінити антибіотики, які використовуються в комбікормах, наприклад: бацитрацин, віргініаміцин, лінкоміцин та інші. Гарною альтернативою буде бактеріоцин ентерококів – ентероцин, який має високу антимікробну властивість щодо штамів *Clostridium perfringens*. Перевагами цього мікробного білку є:

- відсутність резистентності в патогенних мікроорганізмів;
- висока антимікробна дія до збудників харчових отруєнь;
- біологічна безпечність;
- швидке виведення з організму [31,55,56].

Нинішній український ринок показує, що не всі компанії готові переходити на утримання птиці без використання антибіотиків, але є винятки. Таким прикладом може бути група компаній «Ovostar Union» (WSE:OVO). В 2020 році це єдиний з українських виробників яйця, який взяв участь в програмі Асоціації "Союз птахівників України" про відмову використання антибіотиків в птахівництві. Оскільки у даної компанії є інтерес щодо використання безпечних альтернатив антимікробних речовин, подальший розрахунок річної потреби буде приведений для даного виробництва [57,58].

Для порівняння та отримання розрахунків використовується комбікорм з вмістом лінкоміцину 2 г/тонну. Комбікорм з такою складовою застосовують для профілактики некротичного ентериту, та є самим ефективним серед інших комбікормів з антибіотиками даного спрямування. Для прикладу, вміст в такому кормі віргініаміцину має бути не менше 20 г/тонну, бацитрацину – 50 г/тонну [55].

Мінімальна інгібуюча концентрація лінкоміцину на штами *Clostridium perfringens* становить 64 мкг/мл, ентероцину – 50 мкг/мл [56]. Кількість бактеріоцину, необхідну на 1 тонну комбікорму становить:

$$64 \text{ мкг/мл} - 2 \text{ г}$$

$$50 \text{ мкг/мл} - x$$

$$x = \frac{50 * 2}{60} \approx 1,7 \text{ г/тонну}$$

Комбікорм можна використовувати як для основного раціону, або для додаткового харчування. Оскільки Україна є аграрною країною, комбікорм за часту використовують як додатковий пункт до відгодівлі. Також, слід зазначити, що кількість споживаного комбікорму варіюється від віку та сезону. В літній період кількість комбікорму, що з'їдає одна куриця середнього віку за день становить 80 г, взимку цей показник доходить до 140 г [59,60]. Середня кількість комбікорму, який споживає одна куриця в день становить:

$$\frac{80 + 140}{2} = 110 \text{ г/добу}$$

Середня тривалість життя 1 курки-несучки на птахофабриці триває 1 рік. Такий комбікорм не використовують кожного дня. Для профілактики достатньо давати курям його 5 днів 1 раз на місяць [61]. Таким чином, кількість необхідного комбікорму для однієї птиці за її життєвий цикл становить:

$$110 * (12 * 5) = 6600 \text{ г} = 6,6 \text{ кг}$$

Станом на 2019 рік в «Ovostar Union» нараховується 6,7 млн голів курей [14]. Річна потреба комбікорму становить:

$$6,7 * 6,6 = 44220000 \text{ кг} = 44220 \text{ т}$$

Узагальнюючи ці данні, вираховуємо річну потребу в харчовій добавці для комбікорму для «Ovostar Union» (табл.3.1)

Таблиця 3.1.

### Річна потреба в харчовій добавці

Продукт	Норми витрати на 1 т сировини (г)	Кількість комбікорму на курку за життєвий цикл (кг)	Кількість поголів'я в «Ovostar Union» (млн)	Річна потреба комбікорму (т)	Річна потреба в харчовій добавці (кг)
Ентероцин	1,7	6,6	6,7	44220	75,2

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

За даними наведеними в пункті 3.1 в Україні є значна потреба в комбіркомах з використанням заміників антимікробних речовин. В таблиці 3.2 наведений перелік виробників кормових антибіотиків на ринку України, оскільки комбікормів з використанням бактеріоцинів в країні не представлено:

Таблиця 3.2.

#### Перелік кормових антибіотиків на ринку України

Виробник, місто	Назва препарату	Ціна за 1 кг (грн)	Потреба на 1 т комбікорму (кг)
ПП «O.L.KAR.-АгроЗооВет-Сервис», Вінницька область	Біовіт-80 <sup>1</sup>	199	5,7
«БіоТестЛаб», ООО, Київ	Амоксан-500 <sup>2</sup>	1547	0,34
«Бровафарма», ООО, Київська область	Бровасептол <sup>3</sup>	598	4
ПП «Зооветпром», Харківська область	Доксоралвет <sup>4</sup>	5000	0,67
ПП «Базальт», Київська область	Ніфулін <sup>5</sup>	292	1
KRKA, Словенія	Ентероксил <sup>6</sup>	550	1,5
INTERCHEMIE, Єстонія	Доксин-200 <sup>7</sup>	1550	1

**Примітка:** ціни наведено станом на 24.05.2021: 1 - <https://prom.ua/p4950474-biovit-biovit.html>, 2 - <https://veteco.com.ua/amoksan-500/>, 3 - <https://prom.ua/p640744446-brovaseptol-500g-brovafarma.html>, 4 - <https://prom.ua/p1253004044-doksoralvetporoshok-dlya-oralnogo.html>, 5 - <https://prom.ua/p909698259-nifulin-1kg-bazalt.html>, 6 - <https://prom.ua/p1188750285-enroksil-poroshok-enroksil.html>, 7 - <https://prom.ua/p909700348-doksin-200-poroshok.html>

Аналізуючи таблицю 3.2 можна зробити висновок, що в Україні представлено небагато кормових антибіотиків, але які відрізняються за своєю активністю. З кожним роком використання одного і того ж препарату збільшується, оскільки виникає резистентність у патогенних мікроорганізмів. Тому необхідність в альтернативній кормовій добавці є досить високою.

Річна потреба в ентероцині для «Ovostar Union» була зазначена раніше і становить 75,2 кг. За даними статті 2017 року, при культивування *Enterococcus faecalis* 14 було отримано 5,942 г/л мікробного білка [31].

Кількість культуральної рідини необхідної для отримання 75,2 кг ентероцину становить:

$$\frac{75,2}{5,942} = 12,7 \text{ м}^3$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (до 25%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = \frac{12,7}{1 - 0,25} \approx 16,9 \text{ м}^3$$

### 3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Приймаємо, що для отримання 16,9 м<sup>3</sup> культуральної рідини необхідно 230 робочих трудоднів (Т<sub>рд</sub>). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V<sub>д</sub>) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}}/T_{\text{рд}} = 16,9 / 230 \approx 0,074 \text{ м}^3$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, (V<sub>крц</sub>):

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 * 0,074 * 25 / 24 \approx 0,085 \text{ м}^3,$$

де T<sub>цф</sub> - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 25 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 39 години. K<sub>1</sub> – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (K<sub>1</sub> = 1,1).

Геометричний об'єм ферментера для отримання 0,085 м<sup>3</sup> культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 (ферментер без аерації) має становити:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}}/K_{\text{зап}} = 0,085/0,6 \approx 0,142 \text{ м}^3,$$

де K<sub>зап</sub> – коефіцієнт заповнення ферментера.

Отже, вибираємо стандартний ферментер об'ємом V<sub>ф</sub> = 0,15 м<sup>3</sup>

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}}/ V_{\text{ф}} = 0,085/0,15 = 0,57$$

### 3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують V<sub>кр</sub> = 0,085 м<sup>3</sup> культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом з врахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%) становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,085 / (1 - 0,1) = 0,095 \text{ м}^3,$$

де  $E_{\text{ф}}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{\text{роб.1}} = 0,095 \text{ м}^3$ .

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6$  можливий геометричний об'єм ферментера  $V_{\text{ф.1}} = 0,095 / 0,6 = 0,158 \text{ м}^3$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 0,15 \text{ м}^3$  та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 0,095 / 0,15 \approx 0,63$$

Уточнений коефіцієнт дозволяється для ферментерів без аерації.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 0,095 / (1 + 0,1) \approx 0,086 \text{ м}^3$$

де  $X_{\text{ф}}$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 0,095 - 0,086 = 0,009 \text{ м}^3 \text{ або } 9 \text{ л}$$

Для одержання 9 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 9 / (1 - 0,1) \approx 10 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора  $V_{\text{ін}} = 10 / 0,6 \approx 16,6 \text{ л}$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат  $V_{\text{сін}} = 15 \text{ л}$  та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 10 / 15 = 0,67$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{ін}) = 10 / (1 + 0,1) \approx 9,1 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 10 - 9,1 = 0,9 \text{ л}$$

9 л посівного матеріалу ми можемо отримати використовуючи колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Кількість колб становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм2} / (V_{колб} \times K_{зап}) = 900 / (750 \times 0,2) = 6 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 6 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом  $0,15 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення  $0,6$  буде проходити у 2 етапи.

## РОЗДІЛ 4

### БІОСИНТЕЗ ЕНТЕРОЦИНУ

#### 4.1. Шляхи катаболізму глюкози у *Enterococcus faecalis* 14

Оскільки шлях перетворення глюкози штаму *E. faecalis* 14 в Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes не наведено, то катаболізм буде продемонстровано на спорідненому штамі *E. faecalis* ATCC 29212 [62].

Згідно з вищезгаданою бази даних катаболізм глюкози в *E. faecalis* проходить шляхом гліколізу. Такий шлях свідчить про наявність ключових ферментів, а саме гексокінази, фосфоглюкокінази та піруват кінази. Але доречно навести деякі особливості.

Під дією ферменту глюкокінази (1, КФ.2.7.1.2) глюкоза перетворюється в глюкозо-6-фосфат. В подальшому, отримана сполука, за допомогою ферменту глюкозо-6-ізомерази (2, КФ.5.3.1.9), трансформується в фруктозо-6-фосфат. Фруктозо-6-фосфат переходить в фруктозо-1,6-дифосфат під дією 6-фосфоглюкокінази (3, КФ.2.7.1.11), після чого трансформується під впливом фруктозо-дифосфат альдолази (4, КФ.4.1.2.13) у гліцеральдегід-3-фосфат. Дана сполука може переходити в дигідроксиацетонфосфат в присутності тріозофосфат ізомерази (9, КФ.5.3.1.1). Під впливом гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (5, КФ.1.2.1.12) попередня сполука переходить в 1,3-дифосфогліцерат. В свою чергу, дифосфогліцерат, під дією ферменту фосфогліцерат кінази (6, КФ.2.7.2.3), трансформується в 3-фосфогліцерат. З цієї сполуки утворюється 2-фосфогліцерат, під впливом ферменту фосфогліцерат фосфомутази (7, КФ.5.4.2.11). 2-Фосфогліцерат, за допомогою енолази (8, КФ.4.2.1.11) переходить в фосфоенолпіруват. Сполука трансформується в піруват за допомогою піруват кінази (9, КФ.2.7.1.40). Піруват, в подальшому, залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК) [7].

Зазначена схема катаболізму продемонстровано на рис.4.1.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Ковшар І.Д.				<b>РОЗДІЛ 4 БІОСИНТЕЗ ЕНТЕРОЦИНУ</b>	Лім.	Арк.	Аркунів
Перевір.	Стабніков В.П.						28	106
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

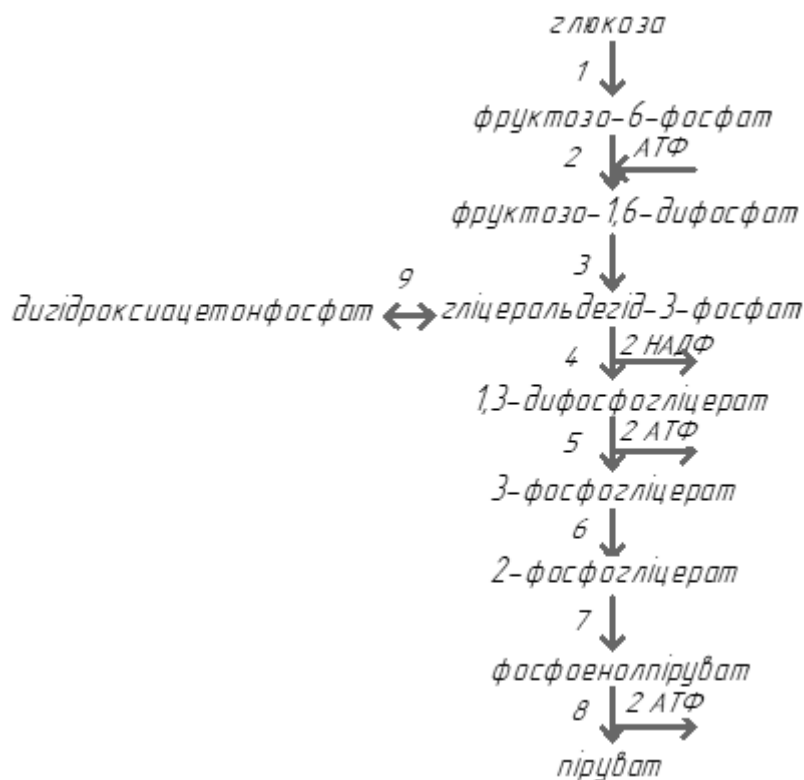


Рис.4.1. Схема катаболізму глюкози *E. faecalis*

#### 4.2. Біотрансформація глюкози в ентероцин

Ентероцин *E. faecalis* 14 це гетеродимер, який складається з ентероцину DD14A та ентероцину DD14B. За амінокислотною послідовністю було досліджено, що дані ентероцини ідентичні ентероцинам 7A та 7B, а також MR10A та MR10B. Амінокислотну послідовність представлено на рис.4.2.

	10	20	30	40
Enterococin DD14A	MGAIAKLVAKFGWPIVKKYKQIMQF	IGEGWAINKI	IDWIKKHI*	
Enterococin MR10A	MGAIAKLVAKFGWPIVKKYKQIMQF	IGEGWAINKI	IDWIKKHI*	
Enterococin L50A	MGAIAKLVAKFGWPIVKKYKQIMQF	IGEGWAINKI	IEWIKKHI*	
	10	20	30	40
Enterococin DD14B	MGAIAKLVAKFGWPF	IKKFKYKQIMQF	IGQGWTIDQIEKWLKRH*	
Enterococin MR10B	MGAIAKLVAKFGWPF	IKKFKYKQIMQF	IGQGWTIDQIEKWLKRH*	
Enterococin L50B	MGAIAKLVTKFGWPL	IKKFKYKQIMQF	IGQGWTIDQIEKWLKRH*	

Рис.4.2. Амінокислотна послідовність ентероцину *E. faecalis* 14 та його співставність з іншими ентероцинами [31]

В статті зазначено, що головною складовою для ентероцину DD14B є наступні амінокислоти: ізолейцин, гліцин, глютамін, триптофан, треонін, аспартат,

глутамат, лізин. Для ентероцину DD14A це: ізолейцин, гліцин, глутамат, аланін, аспарагін, триптофан, лізин.

Загальна кількість амінокислот, яка необхідна для синтезу цих двох пептидів наступна: метіонін, гліцин, аланін, ізолейцин, лізин, лейцин, валін, фенілаланін, триптофан, пролін, тирозин, глутамін, глутамат, аспарагін, треонін, аспарат.

Та слід зазначити, що *E. faecalis* 14 є метаболічним «інвалідом», який неспроможний синтезувати велику кількість амінокислот, які необхідні для утворення мікробного поліпептиду. Таким чином, продуцент не може синтезувати гліцин, ізолейцин, лейцин, валін, фенілаланін, триптофан, тирозин, глутамат та аспарат. Невистачаючі елементи продуцент бере з середовища, на якому культивується.

Синтез ентероцину показано на рисунку 4.3. Опис гліколізу наведено вище (п.4.1.). Пунктирні лінії зазначають відсутність необхідних ферментів для синтезу амінокислот.

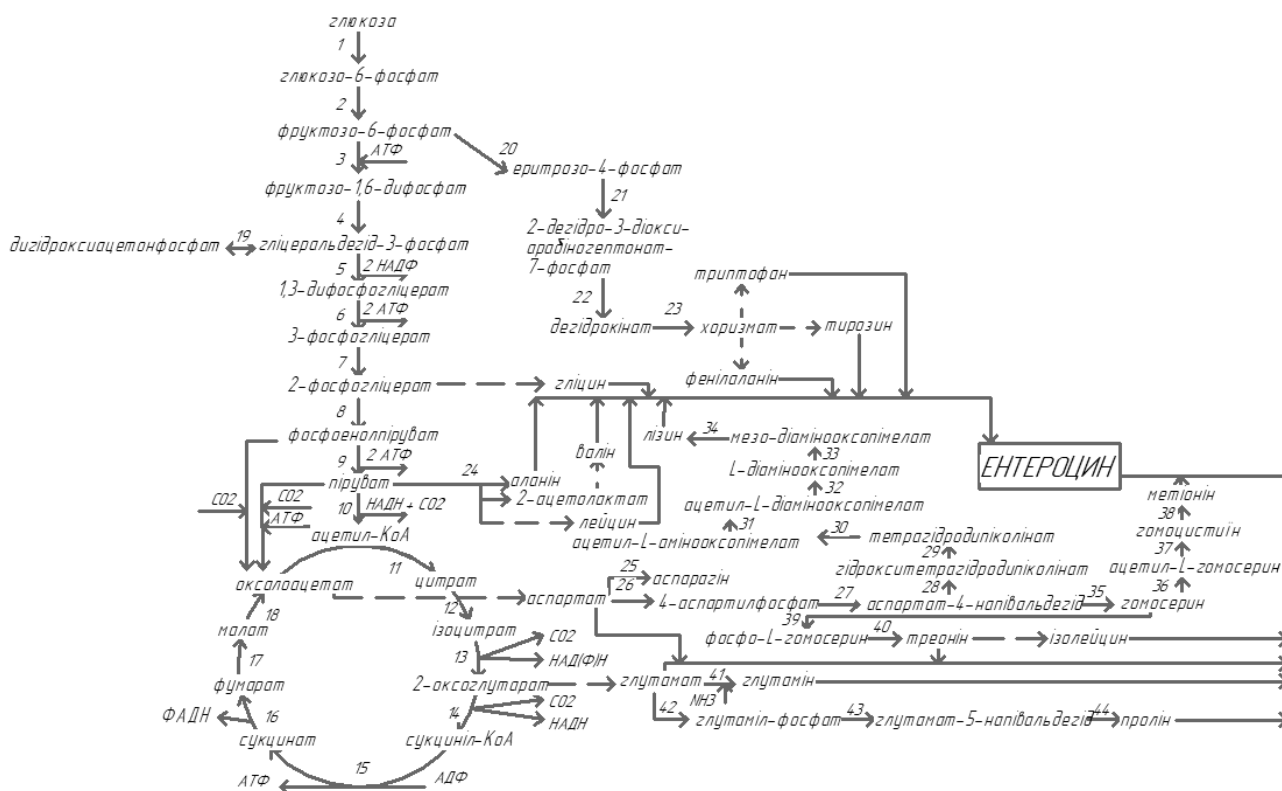


Рис.4.3. Схема синтезу ентероцину *E. faecalis* 14

Цикл трикарбонівих кислот розпочинається з перетворення пірувату, за допомогою 2-оксоглутарат редуктази (10, КФ.1.2.7.11), в ацетил-КоА. Отримана сполука під впливом цитрат синтази (11, КФ.2.3.3.1) трансформується в цитрат. Цитрат взаємодіє із аконітат гідратазою (12, КФ.4.2.1.3) і переходить у форму ізоцитрату. Отримана речовина перетворюється у 2-оксалоглутарат, за допомогою ізоцитрат дегідратази (13, КФ.1.1.1.42), а потім за впливом 2-оксоглутарат редуктази (14, КФ.1.2.7.11) сполука перетворюється в сукциніл-КоА. Після чого, під впливом сукциніл-КоА синтетази (15, КФ.6.2.1.4), утворюється сукцинат. За допомогою фумарат редуктази (16, КФ.1.3.5.4) попередня сполука перетворюється у фумарат, який в подальшому, під впливом фумарат гідратази (17, КФ.4.2.1.2), трансформується в малат. Сполука, за допомогою малат дегідрогенази (18, КФ.1.1.5.4) перетворюється у оксалоацетат, чим і закінчує ЦТК.

Фенілаланін, тирозин, триптофан. Для синтезу даних амінокислот в бактерії відсутні необхідні ферменти, але ентерокок може синтезувати попередника – хоризмат. Синтез попередника розпочинається з фруктозо-6-фосфату, який під дією транскетолази (20, КФ.2.2.1.1.), перетворюється в еритрозо-4-фосфат. Трансальдолаза (21, КФ. 2.2.1.2) перетворює цю сполуку у 2-дегідро-3-діокси-арабіногептонат-7-фосфат. Після чого, 3-дезоксидеозуксогептуланат синтаза (22, КФ.2.5.1.54) трансформує і утворює дегідрокінат. До реакції залучається 3-дегідрокінат синтаза (23, КФ.4.2.3.4), яка синтезує хоризмат. Фенілаланін, тирозин та триптофан бактерія отримує з поживного середовища.

Аланін синтезується з пірувату за допомогою аланін-синтезуючої трансамінази (24, КФ.2.6.1.2). Але валін та лейцин не можуть синтезуватись, відсутні необхідні ферменти. Також, в бактерії не може синтезуватись гліцин. Тому ці амінокислоти біологічний агент також отримує з поживного середовища.

Аспарагін, лізин, метіонін, треонін, ізолейцин. В бактеріальній клітині не може синтезуватись аспарат, оскільки відсутні необхідні ферменти. Але, з аспартату синтезується інші амінокислоти. Тому, отримуючи аспарагін із поживного середовища є можливість синтезувати інші компоненти.

Аспарагін утворюється під дією ферменту аспартат-аміачної лігази (25, КФ.6.3.1.1). Далі, йде ланцюг перетворень, з яких утворюється лізин, метіонін, треонін. Ізолейцин отримується з поживного середовища.

Аспартат перетворюється в 4-аспартилфосфат під дією аспартат кінрази (26, КФ. 2.7.2.4). Після чого, відбувається реакція трансформації у аспартат-4-напівальдегід, під дією аспартат-семіальдегід дегідрогенази (27, КФ.1.2.1.11). Дану сполуку можна вважати попередником всіх зазначених амінокислот. Лізин синтезується наступним шляхом: з напівальдегіду під дією дигідродипіколінат синтази (28, КФ.4.3.3.7) утворюється гідрокситетрагідродипіколінат. Сполука перетворюється в тетрагідродипіколінат під дією дигідродипіколінат редуктази (29, КФ.1.17.1.8). Ацетил-L-амінооксопімелат синтезується за допомогою тетрагідродипіколінат N-ацетил трансферази (30, КФ.2.3.1.89). Далі, до реакцій перетворень залучається амінотрансфераза (31, КФ.2.6.1.-) та синтезує ацетил-L-діамінооксопімелат. Сполука трансформується, за допомогою N-ацетилдіамінопімелат деацетилаза (32, КФ.3.5.1.47) в L-діамінооксопімелат. При дії діамінопімелат епімерази (33, КФ.5.1.1.7) утворюється мезо-діамінопімелат з якого утворюється лізин, під дією діамінопімелат декарбоксилази (34, КФ.4.1.1.20).

Метіонін утворюється наступним чином: напівальдегід, під впливом гомосерин дегідрогенази (35, КФ.1.1.1.3), переходить в гомосерин, що перетворюється в ацетил-L-гомосерин (36, КФ.2.3.1.31). Отримана сполука перетворюється в гомоцистеїн за допомогою цистатіонін-гамма-синтази (37, КФ.2.5.1.48), а сам метіонін утворюється уже за впливом гомоцистеїн S-метил трансферази (38, КФ.2.1.1.10).

З гомосерину утворюється фосфо-L-гомосерин, під дією гомосеринкінази (39, КФ.2.7.1.39). Далі, за реакції перетворень, синтезується треонін, за участю треонін синтази (40, КФ.4.2.3.1).

Глутамат, глутамін, пролін. Глутамат не синтезується в клітині, а отримується з поживного середовища. Під дією глутамін синтази (41, КФ.6.3.1.2) утворюється глутамін. Пролін синтезується наступним чином: з

глутамату утворюється глутаміл-фосфат, під дією глутамат-5 кінази (42, КФ.2.7.2.11). Після чого, подальше перетворення приводить до синтезу глутаман-5-напівальдегіду, за допомогою глутамат-5-семіальдегід дегідрогенази (43, КФ.1.2.1.41). Пролін утворюється за участі піролін-5-карбоксилат редуктази (44, КФ.1.5.1.2).

## РОЗДІЛ 5

### ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

#### 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

##### 5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Особливістю культивування клітин для утворення ентероцину є те, що на заключному етапі синтезу виділяється його мікробний білок в культуральне середовище. Зважаючи на таку специфіку цільового продукту, вибір способу культивування припадає на глибинний спосіб. Слід також зазначити, що до такого методу культивування призводить той факт, що за такого способу біосинтезу зручно видаляти непошкоджений цільовий продукт із культуральної рідини без його значних втрат.

Виробництво ентероцину відбувається періодичним методом, адже синтезується культурою *E. faecalis* 14 в стаціонарній фазі, і координується з виробництвом інших позаклітинних ферментів [31].

Для культивування особливу увагу слід приділяти забезпеченню необхідних оптимальних умов росту і біосинтезу *E. faecalis* 14. Оскільки даний мікроорганізм відноситься до молочнокислих бактерій, основним кінцевим продуктом ферментації є молочна кислота. Утворений «побічний» продукт підкислює поживне середовище, а зависока концентрації, яка накопичується в період ферментації, може призводити до пригнічення росту культури. Для забезпечення регуляції рівня рН в середовище необхідно вводити нейтралізатори. При синтезі біомаси для таких цілей використовується 6-% розчин NaOH, але задля унеможливити зайве підлучення також застосовується 6-% розчин HCl. Для біосинтезу ентероцину для стабілізації рН використовується натрій-фосфатний буфер. Відповідно температура для культивування підтримується на рівні 37°C, а рН на значенні 7 [31,43].

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>		<i>Ковшар І.Д.</i>			<b>РОЗДІЛ 3 ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>					
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>									34	106
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>								

*E. faecalis* 14 є факультативним анаеробом, тому вибір умов щодо доступу кисню під час ферментації залежить від його впливу на синтез цільового продукту. В разі аеробних умов ферменти, що забезпечують синтез ентероцину, мають нижчу активність ніж при анаеробних. Зважаючи на це, при виборі ферментера і обладнання необхідним є забезпечення умови відсутності кисню в середовищі [43].

Підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез проводиться в суворо асептичних умовах. Це потрібне оскільки параметри культивування (температура культивування - 37°C, рН =7) сприяють розвитку й інших мікроорганізмів, які неприпустимі за умов такого біосинтезу. Для забезпечення асептичних умов проводиться ретельна стерилізація обладнання (інокулятори, збірники, ферментери), комунікацій та поживних середовищ для культивування.

Оснащеність, геометричні параметри та інші необхідні характеристики ферментера залежать від поставлених умов, що відтворюють оптимальне культивування цільового продукту. Цими умовами є спосіб культивування і фізіолого-біохімічні особливості продуцента, що зазначено вище.

Особливий вплив на оснащення ферментера при культивуванні *E. faecalis* 14 має система забезпечення безкисневих умов. Тобто, є необхідність у створенні повної відсутності повітря, а також забезпечити відведення надлишку утвореного вуглекислого газу з середовища. Безкисневі умови створюють за допомогою інертного газу, таких як азот, неон, аргон, гелій та ін. Для створення безповітряних умов пропонується використовувати саме азот, оскільки він доступний та ефективний при створенні таких умов для біосинтезу.

Також, слід звернути увагу на те, що *E. faecalis* 14 – це факультативний анаероб, а отже може жити і в аеробних умовах. За літературними джерелами було здійснено порівняння культивування ентерококів в присутності та відсутності кисню. Як виявилось, при анаеробному культивуванні мікроорганізм синтезує дещо більшу біомасу та більшу кількість пептидів, ніж в кисневих умовах. В статтях наведено припущення, що при безкисневому культивуванні бактерії знаходяться в стресових умовах, тому можуть почати синтезувати більшу біомасу.

Тому, для культивування самої біомаси та синтезу ентероцину доречно застосовувати саме безкисневі умови, хоча бактерія може рости в присутності кисню [63].

Контроль за відтворенням безкисневого культивування здійснюється за допомогою інтегрованої в ферментер автоматизованої системи обладнання, що включає в себе датчики розчиненого кисню, відведення вуглекислого газу, системи подачі азоту та газоаналізатор.

Для створенні рівномірного розподілу поживного середовища та мікроорганізмів в апараті за глибинних умов культивування періодичним методом обов'язковим є встановлення перемішуючого пристрою з невеликою частотою обертів. Причиною такого вибору – необхідність в обмеженій аерації під час культивування. Використання пневматичних та ерліфтних перемішуючих пристроїв при таких умовах біосинтезу недоцільні. Такі пристрої використовуються для створення аеробних умов культивування, чого категорично уникають при культивування бактеріоцинів. Для перемішування рекомендується застосовувати доволі просту за конструкцією мішалку – лопатеву. Такі мішалки нині використовуються у тих технологіях, коли необхідність в інтенсивній аерації відсутня. Перевагою лопатевої мішалки є простота та низька вартість.

Для уникнення утворення піни внаслідок пропускання інертного газу через об'єм середовища, в апараті необхідно встановити мішалку в якості механічного піногасника. Це є більш доречним, оскільки хімічні піногасники потребують постійної закупки, що є менш економічно вигідним рішенням.

Окрім контролю концентрації газових утворень, необхідним є і підтримання оптимальної температури культивування і рівня рН середовища. Тобто, ферментеру потрібно мати модулі контролю та управління температури та рН.

#### **5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря**

Для культивування біомаси та ентероцину штами *E. faecalis* зазвичай вирощують в анаеробних умовах. Тому потреба підготовки аераційного повітря відсутня. Для культивування біомаси та синтезу ентероцину застосовується продування інертним газом, а саме азотом, як це зазначалось вище (п.5.1.1).

Для такого продування використовуються балони з азотом. Газ подається в ферментер та інокулятор через спеціальні індивідуальні фільтри, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів.

### 5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво ентероцину, шляхом культивування *E. faecalis* 14 відбувається впродовж 230 днів, що передбачає підготовку наступного обладнання: ферментер об'ємом 150 л, інокулятор на 15 л, а також бокс та лабораторне устаткування (термостат, холодильник, автоклав, апаратура для проведення різних видів контролю).

Габаритні розміри основного обладнання наведено у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

#### Габарити обладнання для виробництва ентероцину з культури *Enterococcus faecalis* 14

Обладнання	Геометричний об'єм, м <sup>3</sup>	Діаметр, см
Ферментер	0,15	2200
Інокулятор	0,015	750
<b>Всього</b>	0,165	

Виробництво включає наступні приміщення: цех виробничого біосинтезу, лабораторне приміщення для проведення різноманітних операцій, де знаходяться автоклави, бокс, термостати, холодильники, апаратура для проведення різних видів контролю.

Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено ферментер (150 л), інокулятор (15 л), автоклав та інше обладнання становить  $10,45 \times 5,2 = 54,35 \text{ м}^2$ . Висота стін, що миється – 2,5 м. Загальна площа стін –  $124,25 \text{ м}^2$ . Площа підлоги –  $54,35 \text{ м}^2$ .

На рис. 5.1 наведено приблизний план приміщення для виробництва препарату для силосування з культурою *E. faecalis* 14. План враховує діаметри обладнання та відстань між апаратами (не менше 1 м) і від стін (не менше 1,5 м).

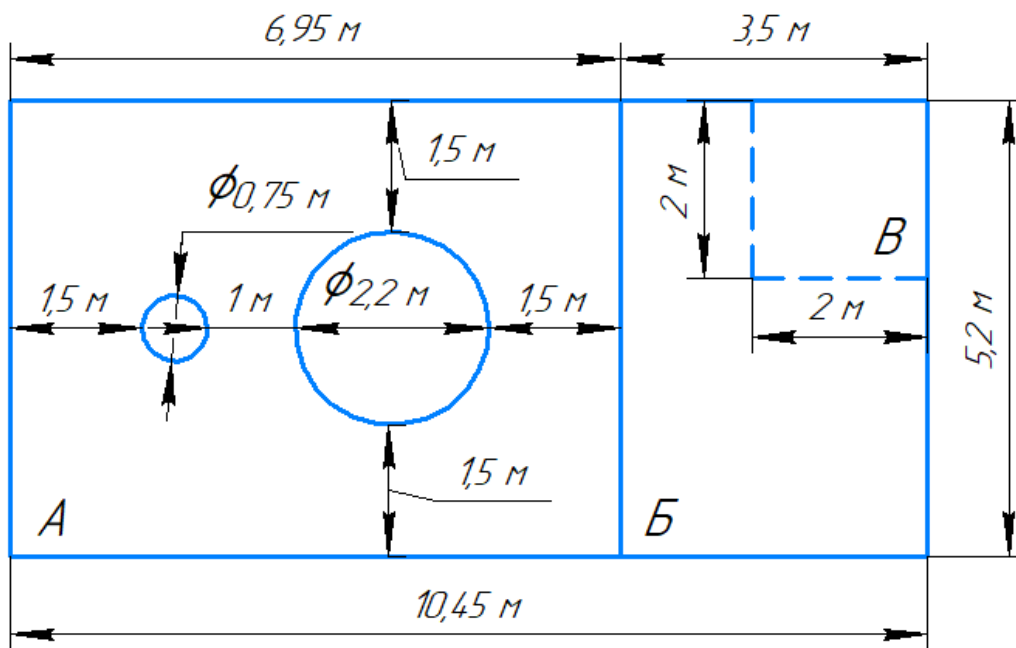


Рис. 5.1. План виробничого приміщення для виробництва ентероцину з культури *Enterococcus faecalis* 14

А – цех виробничого культивування, Б – лабораторія, В – бокс.

Площа цеху виробничого культивування (А) становить  $6,95 \times 5,2 = 36,15 \text{ м}^2$ . Площа лабораторії (Б) становить  $3,5 \times 5,2 = 18,2 \text{ м}^2$ . Таким чином, загальна площа виробничого приміщення становить  $54,35 \text{ м}^2$ .

Необхідно провести розрахунок площі стін для миття. З урахуванням висоти стін, яку необхідно помити (2,5 м), загальна площа стін для миття становитиме:

$$((5,2 \times 4) + (10,45 \times 2) + (2 \times 4)) \times 2,5 = 124,25 \text{ м}^2$$

Узагальнені дані щодо площі приміщень наведено у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

**Розрахунок загальної площі приміщень для виробництва ентероцину з культури *Enterococcus faecalis* 14**

Приміщення	Обладнання	Площа приміщення, м <sup>2</sup>	Площа стін, м <sup>2</sup>
Цех виробничого біосинтезу (А)	Ферментер об'ємом 150 л, інокулятор на 15 л	36,15	60,75
Лабораторія (Б)	Автоклави, бокс (В), термостати, холодильники, апаратура для проведення контролю, хімічний посуд, та інше.	18,2	63,5
<b>Всього</b>		54,35	124,25

Далі, на основі наведених вище даних, необхідно провести розрахунок кількості мийних та дезінфікувальних засобів для миття приміщень та обладнання.

Обладнання необхідно мити та дезінфікувати перед кожним виробничим циклом, тобто 221 раз на рік (кількість циклів на рік).

Підлогу необхідно мити та дезінфікувати кожного дня по одному разові – всього 230 разів (відповідно до кількості трудоднів).

Стіни, двері та вікна миють та дезінфікують раз на місяць в якості генеральних прибирань. Кількість генеральних прибирань становитиме 8 разів.

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції наведено в табл.5.3.

Таблиця 5.3

**Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва ентероцину з культури *Enterococcus faecalis* 14**

<b>Об'єкт миття та/або дезінфекції</b>	<b>Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м<sup>2</sup> (м<sup>3</sup>)</b>	<b>Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва</b>	<b>Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м<sup>2</sup> (м<sup>3</sup>)</b>
Обладнання	0,165	221	36,47
Підлога	54,35	230	12500,5
Стіни, двері, вікна	124,25	8	994

Найважливішими критеріями підбору миючих та дезінфікуючих засобів є їх активна діюча речовина у складі. Оскільки мікроорганізми здатні викликати резистентність впродовж довгого використання одного засобу, слід вчасно

замінити їх на інші для унеможливлення звикання. Тому, при підборі, необхідно дивитись на склад та обирати різні мийно-дезінфікуючі засоби за хімічним складом діючої речовини. Також, важливими факторами є ефективність миючих засобів, їх вартість та безпечність використання [63].

Безпечність використання впливає на фактор працездатності персоналу. Цей фактор призводить до обмежень складу засобів для миття та дезінфекції. Основними компонентами таких засобів є: фосфати, фосфонати, поверхнево активні речовини: детергенти, триклозани, хлор, формальдегіди, тощо. Відомості про їх токсичність обмежуються окремими дослідженнями, в яких переважно приділяється увага подразнюючому та алергенному потенціалу. Відомо, що організм людини реагує навіть на невелику концентрацію токсичних речовин. Наприклад, після потрапляння в організм детергенти пошкоджують активність ферментів і, таким чином, порушують фізіологічні функції організму. Тому дуже важливо забезпечити підприємство нешкідливими для здоров'я мийно-дезінфікуючими засобами [65].

Щодо ціни миючих засобів, є чинники які корелюють даний показник:

- засоби даної категорії є висококонцентрованими, а для роботи в більшості випадків використовуються 1-5% розчини. Тому при визначенні доцільності покупки необхідно враховувати ціну вже готового до застосування розчину;
- професійні засоби мають вузьконаправлену дію, отже, володіють надзвичайно високою ефективністю в рішенні певного спектру завдань, що істотно знижує їх витрати;
- більшість продуктів поставляється відносно великими обсягами (5 і 20 літрів), тому їх вартість дещо нижча за рахунок економії на фасування, тари та ін [66].

Ефективність миючих засобів визначає низка фізико-хімічних властивостей. В залежності від вимог до засобу це може бути: стабільність, емульгуюча здатність, змочуваність, піноутворення та ін [67].

Отже, враховуючи вищенаведене для ефективного і економічно вигідного очищення внутрішніх поверхонь СІР – мийкою, можна використати наступні миючі засоби:

- Каустична сода (їдкий натр, NaOH) являє собою безбарвну кристалічну речовину. Добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі (1-2) % розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. Засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). При використанні необхідний спецодяг. Рекомендується використовувати 1-2 % розчини температурою  $55 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій [68].

- «Фамідез® СІР Ас 220» - сильнокислотний непінний засіб для видалення комплексних органічних та мінеральних відкладень з поверхні технологічного обладнання з неіржавіючої сталі, алюмінію, полімерних матеріалів (полістирол, поліпропілен, ПВХ) методом циркуляційного миття, розпилення чи замочування. Основні діючі речовини: кислота ортофосфорна 5-15%, кислота гліколева 5-15%. Має низьке піноутворення, хороші мийні властивості, працює у воді будь-якої твердості. Робоча концентрація становить 1% [69].

- «ОНІКО» - це висококонцентрований слаболужний та малопінний миючий засіб, що представляє собою оптимізовану суміш ПАР та комплексоутворюючих речовин, водорозчинне, біорозкладне, з використанням активного хлору. Робоча концентрація становить 1,2% [70].

Подальша обробка підлоги, стін, дверей та вікон здійснюється дезінфектантами щоб забезпечити умову бактеріального обнасення  $\text{КУО}/\text{см}^2 < 1 \times 10^3$ . Забезпечити їх ефективну і економічно вигідну дезінфекцію здатен лише хімічний метод.

Оскільки для виробництва ентероцину необхідно обрати щонайменше 3 дезінфікуючих засобів, слід обрати такі засоби, які максимально між собою

будуть мати різні активно-діючі речовини, для унеможливлення розвитку резистентності.

Отже, на основі цих даних можемо обрати наступні дез.засоби:

- «Фамідез® Комбі» - комбінований концентрат з високою миючою здатністю на основі бігуанідину і четвертинної амонієвої. Містить інгібітор корозії, практично без запаху, не має сенсibilізуючої дії. Пропонується використовувати робочу концентрацію 0,2% при витримці 15 хв [70].
- «ДЕЗОХЛОРИН» - це рідкий, концентрований дезінфікуючий засіб, який добре розчиняється у воді. Водні розчини прозорі, мають характерний легкий запах хлору. Основна діюча речовина - натрію гіпохлорит та суміш оксидантів. Пропонується використовувати робочу концентрацію 0,1% при витримці 30 хв [72].
- «AKUTOL sept» - діюча речовина - 1,6-Біс (5- (п-хлорофеніл) бігуанідіно) гексан диглюконат. В межах 0,5% при витримці в 15 хв має швидко виражену бактерицидну дію відносно грампозитивних і грамнегативних бактерій, грибів та вірусів [73].

Рекомендується 100 мл робочого розчину дез.засобу до обробки 1 м<sup>2</sup> поверхонь.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів Виробництво препарату для силосування з культурою *Enterococcus faecalis* 14 наведена в таблиці 5.4.

#### **5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

В першу чергу, композиції розбиваються залежно температурного режиму стерилізації. Це пояснюється тим, що температура стерилізації солі буде зависокою для глюкози, так як вона буде карамелізуватись. Також, оскільки підготовку посівного матеріалу проводять на середовищі МРС, треба зазначити присутність в середовищі фосфатних солей та катіонів магнію. Для унеможливлення утворення нерозчинного осаду, необхідно розділити звичайні

Таблиця 5.4

## Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва ентероцину

Назва мийного/дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup>	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода <sup>1</sup>	Обладнання	1	36,47	7294	45	0,45	3396,6
Фамідез® СІР Ас 220 <sup>2</sup>	Обладнання	1	36,47	7294	89	0,89	6717,72
ОНІКО <sup>3</sup>	Обладнання	1,2	36,47	7294	35,8	0,43	3245,64
Фамідез® Комбі <sup>4</sup>	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	13494,5	1349,5	408	0,82	1195,4
ДЕЗОХЛОРИН <sup>5</sup>	Стіни, підлога, вікна, двері	0,1	13494,5	1349,5	29,8	0,03	437,34
AKUTOL sept <sup>6</sup>	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5	13494,5	1349,5	195,84	0,98	1428,64

**Примітка:** ціни наведені станом на 5.11.20: 1 - <https://prom.ua/p659273745-kausticheskaya-soda-rosiya.html?&primelead=Ml43Mw>,

2 - <https://prom.ua/p1050652475-famidez-cip-220.html> , 3 - <https://prom.ua/p1175453602-professionalnoe-moyuschee-sredstvo.html>, 4 - <https://ua.medsolve.com.ua/meditsinskim-uchrezhdeniyam/dezinfektsiya/famidez-kombi-1-1-a-h1-0008.html>, 5 - <https://prom.ua/p1166281260-dezinfikuyuchij-zasib-oniko.html>, 6 - <https://prom.ua/p917095489-akutol-sept.html?&primelead=Ng>

солі від фосфатних. Тому, пропонується розділити поживне середовище на такі композиції:

**Композиція А:** глюкоза, казеїновий пептон, м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт. Режим стерилізації: 112°C впродовж 30 хв.

**Композиція Б:**  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7(\text{NH}_4)_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Твін-80. Режим стерилізації: 131°C впродовж 40 хв.

**Композиція В:**  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Режим стерилізації: 131°C впродовж 40 хв.

Оскільки середовище не змінюється до виробничого біосинтезу, то склад композицій залишається незмінним, лише їх об'єм збільшується близько 10 раз.

Для виробничого біосинтезу використовується ВНІ-бульйон, який поділяється на наступні композиції (принцип поділу залишається незмінним):

**Композиція А:** глюкоза, пептон, мозково-серцевий екстракт. Режим стерилізації: 112°C впродовж 30 хв.

**Композиція Б:**  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Режим стерилізації: 131°C впродовж 40 хв.

## 5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення ентероцину

Оскільки ентероцин є екзометаболітом, тому немає необхідності робити дезінтіграцію клітин. Це пояснюється тим, що основна концентрація бактеріоцину знаходиться зовні клітини.

Основним критерієм підбору стадій виділення є мета використання цільового продукту. Наприклад, продукти аграрного комплексу не потребують високої очистки як компоненти фармацевтичного направлення. Ціллю застосування ентероцину є його споживання у вигляді харчової добавки у комбікормах для курей-несучок, що направлені на профілактику некротичного ентериту. Тому, використання високоочисної апаратури не є доцільним. Випуск форми препарату не є принциповим, але задля підвищення строку придатності, а також стабільності активності бактеріоцину слід обирати сухий препарат.

Слід звернути увагу на фізико-хімічні властивості бактеріоцину, а також на те, що в культуральній рідині утримуються залишки поживного середовища, продукти метаболізму та клітини самого продуцента. Тому, основними стадіями виділення та очистки ентероцину є:

1. Відділення біомаси
2. Концентрування
3. Сушіння

### **5.2.1. Обґрунтування відділення біомаси *Enterococcus faecalis* від ентероцину**

Першим етапом виділення бактеріоцину є відділення клітин *E. faecalis* від культуральної рідини та отримання супернатанту, що містить ентероцин. Для відділення бактеріальних клітин використовують вакуум-фільтрування, флотацію, центрифугування тощо.

Для відділення клітин від культуральної рідини можна застосовувати флотацію. Використання даного способу для відділення клітин *E. faecalis* від культуральної рідини є недоцільним, оскільки він призначений для згущення більших і важчих клітин дріжджів і мікроміцетів. Крім того, ступінь очищення культуральної рідини від клітин за допомогою даного способу невисокий, що унеможливує його використання у технології отримання препарату на основі бактеріоцину [74,75].

Не доцільно використовувати вакуум-фільтрування як відділення біомаси від культуральної рідини, оскільки це трудомісткий процес. Таким способом дуже важко виділити цільовий продукт, оскільки разом з ним фільтруються й інші мікроелементи. Тому, перед фільтрацією зазвичай застосовують додаткову обробку, а саме коагуляцію для кращого відділення. Існує кілька видів коагуляції: теплова, органічними і неорганічними кислотами, неорганічними сольовими електролітами. У процесах виділення ентероцину неможливо використовувати коагуляцію, оскільки є висока ймовірність значного зниження активності мікробного білку. Також, даний спосіб безперечно є трудомістким, оскільки пори фільтрів забиваються, що потребує часу на їх додаткове очищення [8,76].

Найбільш доцільним у технології виробництва бактеріоцинів є застосування методу центрифугування. Центрифугування – осадження зважених в рідині частинок із застосуванням відцентрової сили. Даний метод потребує більш дорогого устаткування, ніж фільтрування. Тому він виправдовує себе, якщо:

- а) суспензія фільтрується повільно;
- б) поставлене завдання максимального звільнення культуральної рідини від клітин;
- в) необхідно налагодити безперервний процес сепарації в умовах , коли фільтри розраховані тільки на періодичне дію

Даний метод найбільш доцільний для реалізації процесу відділення біомаси від культуральної рідини у виробництві бактеріоцину, оскільки відсутній негативний вплив фізичних та хімічних факторів на активність ентероцину, а також здійснюється максимальне звільнення від клітин продуцента [77,78].

### **5.2.2. Вибір способу виділення ентероцину з супернатанту**

У цей час найбільше поширення одержали наступні методи попереднього концентрування: екстракція, висолювання, ультрафільтрація та інші.

Екстракція передбачає використання в технології різних селективних розчинників, за допомогою яких буде видобуватись цільовий продукт. Головним недоліком даної технології є використання різних речовин, що, з великою ймовірністю, матимуть негативний вплив на мікробний білок. Наприклад, етанол та технічний ізопропіловий спирт, які застосовуються як екстрагенти, денатурують білки, що призведе до осадження та втрати активності препарату. Також, недоліком екстракції є те, що окрім необхідного продукту вона виділяє і супутні речовини, що призводить до додаткової стадії очищення цільового продукту. Тому, не доречно використовувати таке концентрування для видобутку ентероцину [79,80].

Метод висолювання застосовують для високомолекулярних сполук з використанням різних реагентів. Процес полягає у осадженні ВМС шляхом додавання електролітів. Дану технологію не можна застосовувати для ентероцину, оскільки він має малу молекулярну масу (4,4 кДа) [71].

Найбільш вживаним способом концентрування бактеріоцинів є ультрафільтрація. Ультрафільтрація — це фільтрування під надлишковим тиском крізь ультрафільтр, виготовлений із напівпроникної мембрани. Основними перевагами є то, що даний метод забезпечує очищення від баластних домішок і

збільшує активність бактеріоцину. До недоліків можна віднести забивання пор, що потребує постійної промивки. Незважаючи на це, дана технологія є найкращою для застосування, оскільки вона не призводить до денатурації та зниження активності білка, а навпаки, підвищує останній показник [82,83].

### **5.2.3. Вибір способу сушіння та сушарки**

Білкові препарати висушують різними методами. Одні з найбільших поширених є конвективне висушування, контактне, інфрачервоне, ліофільне та високочастотне. Також, на практиці застосовують комбіновані методи, наприклад, конвективно-терморадіаційний спосіб висушування.

При сушінні інфрачервоними променями напрямки потоку вологи і потоку тепла є протилежними, що дещо знижує швидкість сушіння. До недоліків даного методу відносяться:

- підгорання поверхневого шару сировини;
- за рахунок проникнення променів ззовні в середину відбувається дефундування вологи у внутрішні шари сировини, що погіршує фізико-хімічні властивості готового продукту.

До переваг можна віднести економічність даного методу, але зважаючи на нюанси щодо втрат цільового продукту та ймовірного зниження антимікробної активності, даний метод не є доцільним [84,85].

Сублімація – це процес випаровування твердого тіла, тобто перетворення його безпосередньо в газоподібний стан без проміжного проходження через рідкий, і є процесом зневоднювання чи сушіння матеріалу в замороженому стані. Спосіб застосовується для дуже чутливих до нагрівання матеріалів, наприклад, біологічних фармацевтичних препаратів та деяких харчових продуктів. Але ентероцин є термостабільним, тому ця перевага методу не виправдовується для цільового продукту. Недоліками сублімаційного сушіння в порівнянні з атмосферним конвективним чи звичайним контактним вакуум–сушінням є висока вартість установки, складність її експлуатації і значна витрата електроенергії на роботу холодильної установки і вакуум–насос [86-88].

При конвективному сушінні тепло передається від джерела теплової енергії до поверхні матеріалу, що піддається сушінню за допомогою теплоносія. Такий тип сушіння використовується у розпилювальної сушарки. Як теплоносії використовують повітря, інертні гази, димові гази, перегріту пару. Перевагами даного методу є його простота та швидкість висушування. До недоліків можна віднести занадто велику температуру сушіння та габаритне обладнання. Але ентероцин є термостабільним білком, як це вже зазначалось вище, тому даний недолік не є проблемою для збереження фізико-хімічної активності препарату. Тому, для висушування цільового продукту обираємо саме цю технологію [88,89].

Оскільки зазначено перелік теплоносіїв, логічно обрати найоптимальніший варіант. Повітря можна брати з навколишнього середовища, попередньо підготувавши його для позбавлення різних домішок та пилу. Інертні гази, на відміну від повітря, треба постійно закуповувати, що є головним мінусом даного теплоносія. Димові гази мають неприємний запах, а також забруднюють навколишнє середовище, що є важливим недоліком. Тому, найкращим варіантом є повітря, адже обладнання для його підготовки треба закупити 1 раз на багатостроковий термін та періодично обслуговувати, а сам теплоносії можна відбирати безкоштовно з атмосфери, не завдаючи ніякої шкоди.

#### **5.2.4. Обґрунтування вибору стабілізатору**

Існує велика різноманітність упаковок яка має певні функції та створена із різних матеріалів. Для обґрунтованого вибору на цій стадії опираємось на кількість необхідного ентероцину на 1 тону комбікорму.

Як зазначалось вище (п.3.1) на 1 тону корму для курей несучок необхідно 1,7 г ентероцину. Оскільки бактеріоцин має певну активність, то з часом вона може знижуватись і тому, окрім упаковки, доцільно підібрати стабілізатор.

Для стабілізації бактеріоцинів використовується велика кількість стабілізаторів, таких як хлорид натрію, сульфат амонію та інші солі. Але недоліком таких стабілізаторів є те, що вони становлять 90% від загальної кількості препарату. Тобто за перерахунком, на 1,7 г бактеріоцину для стабілізації необхідно додати 15,3 грама солі [90].

Нині для стабілізації пропонується використовувати поліетиленгліколь. За результатами досліджень 2017 року було визначено, що для стабілізації бактеріоцину, необхідна кількість поліетиленгліколю в 2,5 рази менша за ту ж саму кухонну сіль. Тобто за перерахунком, на 1,7 г бактеріоцину необхідно використати близько 5,44 г сухого поліетиленгліколю [90].

Хоча використання такого стабілізатору є дещо дорожчим, порівняно з сіллю, але він є більш ефективним та збільшує тривалість активності білку, що є більш доречним для застосування у кормовій промисловості [90].

#### **5.2.5. Обґрунтування упаковки, об'єму пакування**

Для зазначеного об'єму можна використовувати флакони з закручувальною кришкою. Такі флакони виробляють зі скла та пластику. Перевага пластикових флаконів закладається в їх вартості, а також стійкості до пошкоджень. Скляні флакони є дорожчими, а також можуть легко розбитись при транспортуванні [91,92].

За розрахунками – об'єм пакування близько 7 г у пластикові флакони на 10 мл.

#### **5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення ентероцину**

Для стадії сушіння як теплоносієм обрано повітря. Тому, до допоміжних робіт слід внести підготовку аераційного повітря. Оскільки на даній стадії ультраконцентрат бактеріоцину висушується за високих температур – використання надочищеного, компресованого повітря недоцільно. Цільовий продукт відділений від поживного середовища, тому ріст мікроорганізмів на сухому порошку – малоймовірно.

Повітря для даної стадії достатньо піддати грубій очистці, щоб позбавитись від усіх механічних домішок та пилу. На виході отримується очищене близько на 80% повітря, що задовольняє процес виробництва ентероцину. Після грубої очистки повітря необхідно нагріти на  $145 \pm 5$  °С, щоб його можна було використовувати як теплоносієм.

#### **5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях**

Виходячи з опису післяферментаційних процесів необхідно скласти таблицю стадій з врахуванням втрат на кожному кроці виробництва ентероцину. Особливо важливим моментом є етап ультраконцентрування, оскільки на цій стадії очищення спостерігається найбільша кількість втрат цільового продукту. Підбір обладнання із врахуванням матеріальних потоків представлено в таблиці 5.5.

Таблиця 5.5.

## Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоків на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 25 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 2. Зберігання культуральної рідини</b>						
1	ТП 2. Зберігання культуральної рідини	КР	95 л	-	95 л	Збірник КР 110 л
<b>ТП 3. Відділення біомаси</b>						
2	ТП 3.1 Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	0,95 кг - АСБ, з урахування м 90% вологості 9,5 кг	0,4 кг	9,1 кг	Проточна центрифуга продуктивністю 100 л/год (розрахунок на 1 годину роботи)
		Супернатант	85,5 л (95-9,5)	-	-	Збірник фугату об'ємом 100 л перед УФ установкою
<b>ТП 4. Концентрування і очищення ентероцину</b>						
3	ТП 4.1 Ультрафільтрація ентероцину (приймаємо ступінь концентрування $K_{уф} = 10$ ).	Супернатант	85,5 л	-	-	
		Ультраконцентрат	8,6 (85,5/10)	1,7 л (20%)	6,9 л	Збірник перед сушаркою на 10 л
		Пермеат			76,9 л (85,5-8,6)	На знешкодження

Завершення табл.5.5.

1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 5. Сушіння ентероцину</b>						
4	ТП 5.1. Сушіння у розпилювальній сушарці	Ультраконцентрат	6,9 л	-	-	Розпилювальна сушарка, номінальна потужність 5 л/год
		Висушений ентероцин (вологість 5%)	-	0,14 л (2%)	0,338 кг ((6,9-0,14)*0,05)	Ємність на 0,5 л
<b>ТП 6. Стабілізація ентероцину</b>						
5	ТП 6.1. Змішування ентероцину з стабілізатором	Висушений ентероцин (вологість 5%)	0,338 кг	-	-	V-подібний змішувач, продуктивністю 2 л
		Стабілізатор (поліетилен-гліколь)	1,054 кг	0,02 (2%)	1,372 кг (1,193+0,338)	Ємність на 2 л
<b>ПМВ 6. Пакування, маркування, відвантаження</b>						
6	ПМВ 6.1. Фасування, пакування, маркування порошку ентероцину	Суміш ентероцину з стабілізатором (вологість 1,6%)	1,372 кг	-	-	Автоматизована дозувально-упаковачна лінія
		Упакований в флакони (по 8 г) ентероцин	-	0,03 (2%)	1,342 кг = 192 флаконів (1,275 кг у перерахунку на АСР)	пластикових флаконів, продуктивністю 1800 флаконів за год.

## РОЗДІЛ 6

### СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведено у табл. 6.1.

*Таблиця 6.1.*

#### Специфікація стадій виробництва та виділення ентероцину *Enterococcus faecalis*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
I-1	Інокулятор	1	Інокулятор Biostat® Cplus CC об'ємом 15 л, габарити (д×в×г, см): 100 x 109 x 75, сталь AISI 316L. Оснащений сорочкою, системою механічного перемішування (20-1000 об/хв), системою автоматичного регулювання рН. Виробник: "Sartorius Stedim Biotech" (Франція) <sup>1</sup>
H-2 H-4 H-9	Насос перистальтичний	3	Перистальтичний насос серії IP, продуктивність 40-500 л/год. Корпус – алюміній, тиск – макс. 13 бар. Виробник: «Crane Co.» (США) <sup>2</sup>
ФР-3	Ферментер	1	Ферментер BLBIO-150SJ, об'ємом 150 л, габарити (д×в×г, см): 1400×820×2200, сталь AISI 316L. Оснащений сорочкою, системою механічного перемішування (50-1000 об/хв), системою автоматичного регулювання рН. Виробник: "BLBIOUSA" (США) <sup>3</sup>
ПЗ - 5	Повітрязабірник	1	Обладнаний металефою сіткою для видалення механічних забруднень. Виробник: «Dagco» (Польща) <sup>4</sup>
Ф - 6	Фільтр грубої очистки повітря	1	Карманний фільтр G3-G4. Комплектація: змінні фільтруючі елементами з поліефірного синтетичного волокна. Затримувальна здатність - 80%. Виробник: ТОВ "АЛЬТЕР ЕЙР" (Україна) <sup>5</sup>
Т-7	Теплообмінник-нагрівач	1	Мідноалюмінієвий теплообмінник в трьохрядному виконанні, з крапле-вловлювачем і піддону з патрубками для відводу конденсату, теплоносій-пара або вода. Матеріал ламелей – алюміній. Товщина ламелей 0,2 мм, крок 2,5 мм. Виробник ООО «ОЛЛТАН плюс» (Україна) <sup>6</sup>

<b>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</b>					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.		Ковшар І.Д.			
Перевір.		Стабніков В.П.			
Реценз.					
Н. Контр.					
Затверд.		Пирог Т.П.			
<b>РОЗДІЛ 6 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>					
			Літ.	Арк.	Архів
				53	106
<b>Кафедра БТМ</b>					

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ЗБ-8	Збірник культуральної рідини	1	Об'єм 110 л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316. 3 сорочкою. Виробник (на замовлення): ТОВ «ENERGY SAVING SOLUTIONS» (Україна) <sup>7</sup>
Ц-10	Центрифуга	1	Промислова проточна центрифуга СЕРА Z 81. Габарити (д×ш×в, мм) – 950×500×1500, ротор для сепарації з нержавіючої сталі 1.4571/1.4462, проток – 100-2000 л/год, швидкість – до 16000 об/хв, геометрична місткість – 8 л. Виробник: «BIORUS» (Росія) <sup>8</sup>
УФ-11	Ультрафільтраційна установка	1	Система ультрафільтрації УФ-201: габарити (д×ш×в, мм) – 749.3×548.6×1300, матеріал – нержавіюча сталь 316L, швидкість подачі – 37,85 л/хв, мембрани – поліефірсульфон з відсіканням по 5 кДа. Виробник: «BioTechno Group» (Росія) <sup>9</sup>
З-12	Збірник для концентрату	1	Об'єм 10 л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316. Виробник (на замовлення): ТОВ «ENERGY SAVING SOLUTIONS» (Україна) <sup>7</sup>
Н-13	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос РТЛ05, продуктивність 2,5-10 л/год. Корпус – алюміній, тиск – макс. 4 бар. Виробник: «Тарфло АВ» (Швеція) <sup>10</sup>
С-14	Розпилювальна сушарка	1	Розпилювальна сушарка LPG-5: потужність – 5 л/год, діаметр сушильної башти – 1100 мм, габарити (д×ш×в, мм) – 1680×1500×2100, середній час перебування краплі: 1-1,5 с. Виробник: «Changzhou Jinqiao Spray Drying and Engineering Co.» (Китай) <sup>11</sup>
ЗМ-15	Змішувач	1	V-подібний порошковий змішувач VM-05. Матеріал - нержавіюча сталь AISI 304. Корисний об'єм - 5 літрів. Час перемішування: 7-10 хвилин Швидкість обертання ємності: 20 об / хв. Потужність двигуна: 0,55 кВт. Габаритні розміри: 720мм x 360мм x 620мм. Виробник: «Минипресс» (Росія) <sup>12</sup>
Д-16	Дозатор	1	Дозатор порошків в пластикові флакони «SG-50». Продуктивність 1800 флаконів на годину. Спосіб наповнення – шнековий наповнювач. Потужність – 2,4 кВт. Габаритні розміри: 2000мм x 1000мм x 1800мм. Виробник: «Минипресс» (Росія) <sup>13</sup>

**Примітка:** 1 - <https://www.sartorius.com/download/9612/10/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf>, 2 - [https://mir-nasosov.com.ua/sites/default/files/1\\_1.pdf](https://mir-nasosov.com.ua/sites/default/files/1_1.pdf), 3 - <http://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>, 4 - <https://kaminin.ua/product/vozduhozabornik-pryamougolnyy-cznp150x50oc-4380.html>, 5 - <https://alterair.ua/product/pocket-filter-g-class/>, 6 - <https://alltan.com.ua/p2090292-teploobmennik-vodyanoj.html>, 7 - <https://wise-master.com.ua/p595280969-emkosti-nerzhavayuschej-stali.html>, 8 - [https://biorus.ru/oborudovanie/protochnyie-czentrifugi/czentrifugi-protocnyie-\(-germaniya,-sera\)/promyishlennaya-protocnaya-czentrifuga-cepа-z-81.html](https://biorus.ru/oborudovanie/protochnyie-czentrifugi/czentrifugi-protocnyie-(-germaniya,-sera)/promyishlennaya-protocnaya-czentrifuga-cepа-z-81.html), 9 - <https://biotechno.ru/catalog/pilotnaya/pilotnaya-sistema-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-201/>, 10 - <https://tapflo.ua/products/hose-pumps/seriya-ptl#oglyad>, 11 -

<http://ua.chinaspraydryer.com/laboratory-spray-dryer-lpg-5>, 12 -  
<https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/equipment/blender-and-mixers/mixer-for-powders-vm-05/>, 13 -  
[https://minipress.ru/katalog/farmaceuticheskoe\\_oborudovanie/mashiny-fasovki-poroshkov-vo-flakony/mashina-rozliva-i-ukuporki-plastikovyh-flakonov-pr-15/](https://minipress.ru/katalog/farmaceuticheskoe_oborudovanie/mashiny-fasovki-poroshkov-vo-flakony/mashina-rozliva-i-ukuporki-plastikovyh-flakonov-pr-15/)

## РОЗДІЛ 7

### ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу ентероцину біологічним агентом *E. faecalis* 14 включає в себе приготування та стерилізація титрувальних агентів, підготовку і стерилізацію поживних середовищ, як допоміжні роботи, та стадії технологічного процесу - підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту. Щодо стадії відділення та очищення ентероцину, схема включає в себе підготовку повітря для розпилювальної сушарки, як допоміжну роботу та стадії технологічного процесу, які включають в себе відділення біомаси, концентрування ентероцину та його сушіння, змішування з стабілізатором, та подальше фасування.

Технологічну схему біосинтезу ентероцину наведено у *графічній частині* проекту.

#### ***ДР 1. Підготовка аераційного повітря***

##### ***ДР 1.1. Забір атмосферного повітря***

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник на висоті 10 м, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

##### ***ДР 1.2. Груба очистка повітря***

Очистку повітря від пилу та механічних часток здійснюють у фільтрі, з затримуючою здатністю 80%.

##### ***ДР 1.3. Нагрівання повітря***

З метою запобігання утворення зайвого конденсату, охолоджене повітря у теплообміннику нагрівають до температури 145 °С.

#### ***ДР 2. Підготовка та стерилізація титрувальних агентів***

##### ***ДР 2.1. Приготування та стерилізація 6%-го розчину НСІ***

Загальна кількість запасного розчину становить 100 мл. В термостійку конічну колбу об'ємом на 500 мл за допомогою мірного циліндру на 25 мл вносять

					<b><i>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</i></b>					
<b><i>Змн.</i></b>	<b><i>Лист</i></b>	<b><i>№ докум.</i></b>	<b><i>Підпис</i></b>	<b><i>Дата</i></b>						
<b><i>Розроб.</i></b>	<b><i>Ковшар І.Д.</i></b>				<b><i>РОЗДІЛ 7</i></b> <b><i>ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ</i></b> <b><i>СХЕМИ</i></b>					
<b><i>Перевір.</i></b>	<b><i>Стабніков В.П.</i></b>							<b><i>Лім.</i></b>	<b><i>Арк.</i></b>	<b><i>Аркушів</i></b>
<b><i>Реценз.</i></b>									56	106
<b><i>Н. Контр.</i></b>								<b><i>Кафедра БТМ</i></b>		
<b><i>Затверд.</i></b>	<b><i>Пирог Т.П.</i></b>									

15 мл 36-% розчину соляної кислоти. Потім, за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 85 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою, перемішують вміст до розчинення луку, після чого розчин передають на стерилізацію в автоклав за температури 131°C впродовж 40 хв при 0,15 МПа. Після стерилізації в асептичних умовах на різні стадії підготовки інокуляту відбираються відповідні порції розчину.

#### *ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH*

Розчин 6 %-го NaOH готують для стадії біосинтезу посівного матеріалу в інокуляторі. Для колб титрувальним агентом нехтують, оскільки на цій стадії утворюється замала кількість молочної кислоти, яка не може інгібувати ріст ентерококів. Загальна кількість титрувального агента, яка необхідна на зазначені стадії становить 20 мл. Така кількість титрувального агента замала для приготування, тож пропонується приготувати 100 мл запасного розчину.

В термостійку конічну колбу об'ємом на 500 мл вносять 6 г їдкою натру і за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 94 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою, перемішують вміст до розчинення луку, після чого розчин передають на стерилізацію в автоклав за температури 131°C впродовж 40 хв при 0,15 МПа.

#### *ДР 2.3. Приготування та стерилізація натрій-фосфатного буферу*

Загальна кількість буферу, що необхідно для виробничого культивування – 190 мл. На технічних вагах зважують 2, 14 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  та 7,36 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Наважки переносять в конічну колбу об'ємом на 500 мл. За допомогою мірного циліндру на 200 мл вносять 180,5 мл дистильованої води. Розчин перемішують, передають на стерилізацію в автоклав за температури 131°C впродовж 40 хв при 0,15 МПа.

### *ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ*

*ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах*

Для вирощування інокуляту необхідно 900 мл поживного середовища, 80 мл яких є посівний матеріал з пробірок. Вміст компонентів для даного середовища наведено в табл.7.1.

Таблиця 7.1.

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища для  
одержання посівного матеріалу в колбах на качалках**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 820 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	20	16,4	А	500
Дріжджовий екстракт	5	4,1		
Казеїновий пептон	10	8,2		
М'ясний екстракт	10	8,2		
Вода		463,1		
Твін-80	1	0,82	Б	220
Ацетат натрію	5	4,1		
$C_6H_5O_7(NH_4)_3$	2	1,64		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2	0,16		
$MnSO_4 \times H_2O$	0,05	0,04		
Вода		213,24		
$K_2HPO_4$	2	1,64	В	100
Вода		98,36		

*ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 16,4 г глюкози, 4,1 г дріжджового екстракту, 8,2 г казеїнового пептону і 8,2 г м'ясного екстракту. Отримані наважкми компонентів переносять у колбу на 1 л, за допомогою мірного циліндра на 500 мл додають 463,1 мл дистильованої води. Вміст колби постійно перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв, під тиском 0,05 МПа.

*ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація розчину композиції Б*

На лабораторних вагах зважують 4,1 г ацетату натрію, 1,64 г цитрату амонію, 0,16 г гептагідрату сульфату магнію, 0,04 г моногідрату сульфату мангану

та відмірюють 5-мілілітровим мірним циліндром 0,82 мл твіну-80. Наважки поміщають у термостійку плоскодонну колбу об'ємом 500 мл, за допомогою мірного циліндра на 0,5 л доливають 213,24 мл дистильованої води, і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв, при 0,15 МПа.

*ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація розчину композиції В*

На технічних вагах зважують 1,64 г гідроортофосфату калію. Наважку поміщають у термостійку плоскодонну колбу об'ємом 500 мл, за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 98,36 мл дистильованої води, і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв, при 0,15 МПа.

*ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 15 л*

Для вирощування інокуляту необхідно 9,1 л поживного середовища (10 л з врахуванням інокуляту, що надійшов з колб). Вміст компонентів для приготування даного середовища наведено в табл.7.2.

*Таблиця 7.2.*

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища в інокуляторі 15**

**л**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 9,1 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	20	182	А	3000
Дріжджовий екстракт	5	45,5		
Казеїновий пептон	10	91		
М'ясний екстракт	10	91		
Вода		2591		

Закінчення табл.7.2.

Твін-80	1	9,1	Б	6000
Ацетат натрію	5	45,5		
$C_6H_5O_7(NH_4)_3$	2	18,2		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2	1,82		
$MnSO_4 \times H_2O$	0,05	0,45		
Вода		5325		
Конденсат		600	В	100
$K_2HPO_4$	2	18,2		
Вода		81,8		

*ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 182 г глюкози, 45,5 г дріжджового екстракту, 91 г казеїнового пептону та 91 г м'ясного екстракту. Компоненти поміщають у термостійку плоскодонну колбу об'ємом 5 л, за допомогою мірного циліндра на 5 л додають 2591 мл води дистильованої. Вміст колби перемішують до повного розчинення. Стерилізація композиції проходить в автоклаві при температурі 112°C, під тиском 0,05 МПа, упродовж 30 хв.

*ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 45,5 г ацетату натрію, 18,2 г цитрату амонію, 1,82 г гептагідрату сульфату магнію, 0,45 моногідрату сульфату мангану та відмірюють 10-мілілітровим мірним циліндром 9,1 мл твіну-80. Наважки поміщають у робочий інокулятор на 15 л. За допомогою вагового дозатора додають 5325 мл питної води. Вмикають мішалку та перемішують до повного розчинення. Стерилізація композиції проходить при температурі 131°C упродовж 40 хв, при 0,15 МПа.

*ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Г*

На технічних вагах зважують 18,2 г гідроортофосфату калію. Наважку поміщають у термостійку плоскодонну колбу об'ємом 250 мл, за допомогою

мірного циліндра на 100 мл додають 81,8 мл дистильованої води, і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв, при 0,15 МПа.

*ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,15 м<sup>3</sup>*

Для виробничого культивування необхідно 86 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування даного середовища наведено в табл.7.3.

*Таблиця 7.3.*

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища для виробничого культивування**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 86 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	2	0,17	А	83
Пептон	10	0,86		
Мозково-серцевий екстракт	17,5	1,51		
Вода		72,9		
Конденсат		8,3		
NaCl	5	0,43	Б	3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5	0,22		
Вода		2,4		

*ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 0,17 г глюкози, 0,86 кг пептону та 1,51 кг мозково-серцевого екстракту. Наважку переносять у робочий ферментер на 150 л, додають 72,9 л питної води, об'єм якої контролюється ротаметром. Компоненти перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв, при 0,15 МПа.

*ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 430 г NaCl та 220 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, за допомогою мірного циліндру на 5 л додають 2,4 л дистильованої води, об'єм якої контролюється ротаметром. Стерилізація композиції проходить за рахунок подачі насиченої пари через нижній спуск при температурі 131°C, під тиском 0,15 МПа, впродовж 40 хв.

#### **ТП 4. Підготовка посівного матеріалу**

##### *ТП 4.1. Підтримання колекційної культури*

Зберігають культуру *Enterococcus faecalis* 14 при +4°C (в холодильнику) на напіврідкому МРС-агарі з 0,5% глюкози та крейдою. Пересів здійснюють раз в 1-3 місяця. Усі роботи з колекційною культурою проводять строго в стерильних умовах. Контроль чистоти і активності культури здійснюють висівом бактерій на чашки Петрі і подальшим мікроскопіюванням.

##### *ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі*

Колекційну культуру *Enterococcus faecalis* 14 (від ТП 5.1), розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МРС-агаром і вирощують при температурі +37°C упродовж 24 год.

##### *ТП 4.3. Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі*

Ізольовані колонії (від ТП 5.2) в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з МРС-агаром. Одна ізольована колонія засівається в одну окрему пробірку. Пробірки інкубують 24 год при температурі +37°C. Контроль чистоти і активності культури здійснюють висівом бактерій на чашки Петрі і подальшим мікроскопіюванням.

##### *ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах*

У колбу об'ємом 1 л із 500 мл розчину композиції А (від ДР 3.1.1) в асептичних умовах в лабораторії вносять 220 мл розчину композиції Б (від ДР 3.1.2), 100 мл розчину композиції В (від ДР 3.1.3). Отриману субстанцію перемішують і розливають по 137 мл в 6 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

Далі у пробірки з робочою культурою *E. faecalis* 14, вирощену на МРС-агарі, асептично вносять 10 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають

культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву шести колб використовують бактеріальну суспензію, одержану з восьми пробірок (по 10 мл з кожної).

Культивування бактерій здійснюється у колбах в термостатичному шейкері при 37°C упродовж 24 год, з попереднім продуванням азоту та гідрозатвором для видалення CO<sub>2</sub>. Через 12 годин шприцом відбирається зразок культуральної рідини і проводиться мікробіологічний контроль шляхом мікроскопіювання та посівів на чашки Петрі. Після завершення вирощування посівний матеріал переносять в стерильну засівну колбу об'ємом 2 л, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою.

#### *ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л*

В інокуляторі (І-1) з стерильною композицією Б (від ДР 3.2.2) через засівний бачок вносять композицію А (від ДР 3.2.1) та композицію В (від ДР 3.2.3). До інокулятора (І-1) подають холодну воду та контролюють значення температури поживного середовища на рівні 37°. Після оптимізації температури, через перистальтичний насос в інокулятор (І-1) поступає посівний матеріал з минулої стадії підготовки інокуляту (від ТП 4.4). Далі, в асептичних умовах до автоматизовано системи регулювання рівню рН під'єднують колби з 6 % розчином NaOH (від ДР 2.2) та 6 % розчином HCl (від ДР 2.1). Регулювання рН здійснюється автоматично та відслідковується на дисплеї. Встановлюється режим перемішування – 100 об/хв. Через барботер в середовище подається азот, кількість якого регулюється значенням на датчику розчиненого кисню, і також з середовища відводиться надлишок CO<sub>2</sub> через випускний клапан. Культивування проводять впродовж 24 год. Через кожні 4 години через відбирається зразок культуральної рідини і проводиться мікробіологічний контроль шляхом мікроскопіювання та посівів на чашки Петрі.

### ***ТП 5. Біосинтез***

#### *ТП 5.1. Виробниче культивування*

У ферментер (ФР-3) об'ємом 0,15 м<sup>3</sup> з стерильною композицією А (від ДР 3.3.1) за допомогою засівної колби подають композицію Б (від ДР 3.3.2). В

асептичних умовах до системи під'єднується колба 0,5 М натрій-фосфатний буфер (від ДР 2.3), що поступає до ферментеру (ФР-3) з автоматичною регуляцією рН для нормалізації рН (рН=6,3).

В сорочку ферментера подають холодну воду і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 37°C. Після оптимізації температури і рН, далі у ферментер (ФР-3) за допомогою насосу (Н-2) перекачують посівний матеріал з минулої стадії підготовки інокуляту (від ТП 4.5). Встановлюється частота обертання мішалки - 160 об/хв. Через барботер в середовище подається азот, кількість якого регулюється значенням на датчику розчиненого кисню, і також з середовища відводиться надлишок CO<sub>2</sub> через випускний клапан. Тривалість культивування – 18 год. Кожні 4 години проводиться мікробіологічний контроль шляхом мікроскопіювання та посівів на чашки Петрі. Ферментацію зупиняють після досягнення необхідної концентрації ентероцину.

### ***ТП 6. Зберігання культуральної рідини***

#### ***ТП 6.1. Зберігання культуральної рідини у збірнику на 110 л***

Культуральну рідину зберігають у збірнику при 4-8 °С для подальшого відділення та очищення ентероцину.

### ***ТП 7. Відділення біомаси***

#### ***ТП 7.1. Центрифугування культуральної рідини***

Вмикають проточну промислову центрифугу, до якої за допомогою перистальтичного насосу подають культуральну рідину зі збірника. Встановлюють частоту обертів 8000 об/хв. Робота центрифуги протягом 1 години. Утворена біомаса йде на знешкодження. Супернатант переливають до збірника.

### ***ТП 8. Концентрування і очищення ентероцину***

#### ***ТП 8.1. Ультрафільтрація ентероцину***

Отриманий супернатант від ТП 8.1 перекачують на ультрафільтраційну установку за допомогою перистальтичного насосу через мембрани з номінальним відсіченням молекулярної маси 5. Встановлюється швидкість подачі – 5 л/хв. Ультрафільтрацію проводять протягом 2,5 годин. Концентрування ентероцину в

10 разів. Пермеат передається на знешкодження. Отриманий ультраконцентрат за допомогою перистальтичного насоса перекачують у збірник.

### ***ТП 9. Сушіння ентероцину***

#### ***ТП 9.1. Сушіння ентероцину у розпилювальній сушарці***

Отриманий ультраконцентрат від *ТП 9.1.* поступає до розпилювальної сушарки за допомогою перистальтичного насоса. Підключають повітря з *ДР 2.3.* Вологість отриманого продукту – 1-5%. Тривалість роботи сушарки – 1,5 години. Утворене вологе повітря передається на знешкодження відходів. Висушений ентероцин помішають у ємність на 0,5 л.

### ***ТП 10. Стабілізація ентероцину***

#### ***ТП 10. Змішування ентероцину з стабілізатором***

На технічних вагах зважують 1,217 кг поліетиленгліколю та переносять до V-подібного змішувача. До апарату вносять 0,388 кг ентероцину від *ТП 10.1.* Закривається кришка, перемішування триває 10 хв. Отриманий стабілізований білок переноситься у ємність, об'ємом на 2 л.

### ***ПМВ 11. Пакування, маркування, відвантаження***

#### ***ПМВ 11.1. Фасування, пакування, маркування порошку ентероцину***

Отриманий ентероцин від *ТП 11.1* вивантажують в дозатор автоматизованої лінії заповнення та фасовки з закупорюванням кришок. Встановлюється режим заповнення: 7 г продукту в 1 флакон. Фасування флаконів та їх закупорка триває 20 хв. Отриманий продукт передається на склад.

### ***ЗВ 12. Знешкодження відходів***

#### ***ЗВ 12.1. Знешкодження повітряних відходів***

Отримане вологе повітря від відправляють у системи знешкодження газових відходів.

#### ***ЗВ 12.2. Знешкодження рідких відходів***

Отриманий пермеат від відправляють у системи знешкодження рідких відходів

#### ***ЗВ 12.3. Знешкодження твердих відходів***

Отримана біомаса від *ТП 3.1.* відправляють у системи очисних споруд.

## РОЗДІЛ 8

### КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

#### 8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Постадійний контроль доферментаційних процесів виробництва ентероцину представлено в табл. 8.1.

#### 8.2. Мікробіологічний контроль

З метою контролю чистоти культивування бактерій *E. faecalis* 14 необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Кожні 4 год з інокулятора і ферментера відбирають зразки культуральної рідини для аналізу.

Пробу простерилізованого поживного середовища відбирають в об'ємі, як правило, 50 мл і здійснюють прямим висівом на агаризовані середовища. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища (або стерильної композиції поживного середовища перед змішуванням) на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем і подальшим інкубуванням [93].

*Виконання посівів.* Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єма проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища штрихом за допомогою стерильної бактеріологічної петлі. Чашки з посівами поміщають у термостат за температури 30...32 °С. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6...8 години. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [93].

Мікробіологічний контроль чистоти культури здійснюється двома шляхами: прямим висівом на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням [93].

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Ковшар І.Д.</i>			<b>РОЗДІЛ 8 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					66	106
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

## Карта постадійного контролю біосинтезу ентероцину

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 2.1 Приготування та стерилізація 6%-го розчину HCl	Розчин HCl, концентрація, час та температура стерилізації, стерильність	Хімічний метод	Концентрацію та стерильність після змішування	C = 6 % відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 2.2 Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH	Розчин NaOH, концентрація, час та температура стерилізації, стерильність	Хімічний метод годинник, термометр	Концентрацію до стерилізації, час та температура під час стерилізації та стерильність після	C = 6 % $\tau = 40$ хв $t = 131$ °C P=0,15 МПа відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 2.3 Приготування та стерилізація натрій-фосфатного буфера	Розчин натрій-фосфатного буфера, концентрація, час та температура стерилізації, стерильність	Хімічний метод годинник, термометр	Концентрацію до стерилізації, час та температура під час стерилізації та стерильність після	C = 0,5 М $\tau = 40$ хв $t = 131$ °C P=0,15 МПа відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа $t = 112$ °C, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл.8.1.

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,05$ МПа, $t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г	Композиція Г, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,05$ МПа $t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв, $n=200$ об/хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,05$ МПа, $t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, температура, час стерилізації, частота обертання, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл.8.1.

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.2.4. Приготування і стерилізація композиції Г	Композиція Г, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час стерилізації, частота обертання, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,05$ МПа $t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв, $n=200$ об/хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, температурв, час стерилізації, частота обертання, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,05$ МПа, $t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ год, $n=200$ об/хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, температура, час стерилізації, частота обертання, стерильність	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, $n=200$ об/хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1. Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, частота пересівів, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура протягом зберігання. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 4^{\circ}\text{C}$ , $\tau_{\text{пересів}} = 1-3$ місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2. Одержання робочої культури <i>Enterococcus faecalis</i> 14 на агаризованому середовищі	Колекційна культура, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 37^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл.8.1.

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.3. Вирощування робочої культури <i>Enterococcus faecalis 14</i> на агаризованому середовищі	Робоча культура, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічна чистота визначається після вирощування культури в колбах на качалках. Відбір проб культуральної рідини – кожні 12 год	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л	Посівний матеріал, рН, температура, тривалість культивування, частота обертання, мікробіологічна чистота	Датчик рН та температури, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль під час вирощування інокуляту в посівному апараті і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	$\text{pH}=7,0$ , $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, $n=100$ об/хв відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 5.1. Виробниче культивування	Культуральна рідина, рН, температура, тривалість культивування, частота обертання, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси, концентрація ентероцину	Датчик рН та температури, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль, ФЕК, ІФА	Мікробіологічний контроль під час вирощування культури в ферментері і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	$\text{pH} = 6,3$ , $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 18$ год, $n=160$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти $C_b \approx 5$ г/л $C_e \approx 5,942$ г/л

Прямий висів виконуть висівом культуральної рідини до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром для моніторингу можливих сторонніх бактерій, сусло-агаром або глюкозо-картопляним агаром – дріжджів та грибів та VRE селективний агар для ідентифікації *E. faecalis* 14 [93-95].

Також, для ідентифікації можуть використовуватись CE агар (Chromocult *Enterococci* agar), BEA агар (Bile Esculin Azide agar) та агар для ентерококів (*Enterococcus* agar). Але зважаючи на те, що CE агар та агар для ентерококів призначений для ідентифікації бактерій роду *Enterococcus*, а BEA – окрім ентерококів, ще й стрептококів, доречно обрати VRE селективний агар. На цьому середовищі можуть рости лише бактерії *E. faecalis* та *E. faecium*, колонії яких відрізняються кольором (за умови росту на даному субстраті), що полегшує подальшу ідентифікацію [94-98].

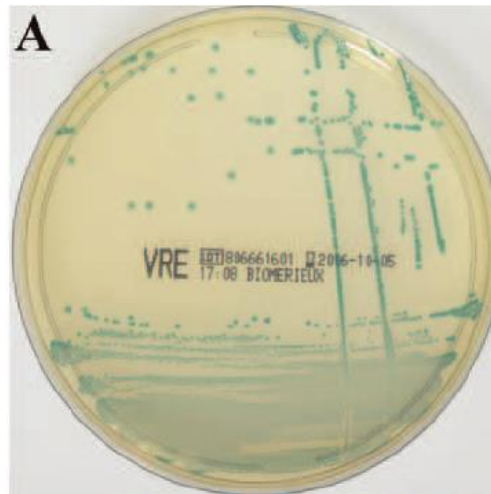
Мікроскопіювання проводять світловим мікроскопом з імерсійною системою. Методика мікроскопіювання [99]:

Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини і розподіляють її рівномірно на площі 1-4 см<sup>2</sup>, зробивши якомога тонший мазок. Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Фіксують препарат тричі провівши скло з препаратом через верхню частину пальника. Фіксований препарат заливають кількома краплями барвника – метиленового синього. Розподіляють барвник по всій поверхні мазка. Фарбують препарат протягом 5 хв. Потім фарбу зливають, препарат добре промивають дистильованою водою. Скло з країв протирають фільтрувальним папером, препарат висушують при кімнатній температурі.

Потім на абсолютно сухий препарат наносять краплину імерсійного масла. Мікроскопіюють під великим збільшенням мікроскопа (×90). Після роботи ваткою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива.

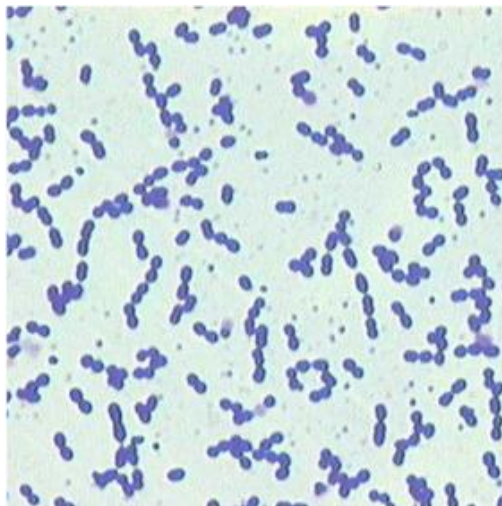
Колонії *E. faecalis* 14 на VRE селективному агарі мають вигляд непрозорих колоній, круглої форми, з гладкою, матовою поверхнею та блакитним або

блакитно-зеленим забарвленням (в залежності від виробника середовища). При відсутності у зразку сторонньої мікрофлори під час мікроскопіювання можна побачити клітини [94,95].



*Рис.8.1.* Колонії *Enterococcus faecalis* 14 на VRE селективному агарі [100]

Під мікроскопом клітини овальні, нерухливі, грампозитивні, спор не утворюють, факультативні анаероби. Розташовуються парами, невеликими скупченнями, рідше - короткими ланцюжками. Розміри клітин 0,6–2,0x0,6–2,5 мкм. При мікроскопіюванні препарату молочнокислих бактерій пофарбованого метиленовим синім, клітини мають синьо-фіолетове забарвлення [43].



*Рис.8.2.* Клітини *Enterococcus faecalis* 14 під світловим мікроскопом (збільшення ×400) [101]

### **8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту**

#### **8.3.1. Концентрація біомаси**

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії, яку потім перераховують в суху біомасу.

*Методика визначення концентрації біомаси.* У пробірки із 9 мл дистильованої води вносимо по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтується, наливається в кювету. Потім, за допомогою фотоелектроколориметру, вимірюється оптична густина при довжині хвилі - 540 нм. За значенням оптичної густини проводять перерахунок в суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.

### **8.3.2. Концентрація ентероцину**

Для визначення концентрації ентероцину використовують гетерогенний імуноферментний аналіз (ІФА) із застосуванням планшетних рідерів [102].

Даний аналіз базується на імунологічній реакції антигену з відповідним антитілом з утворенням комплексу антиген — антитіло. Для виявлення даного комплексу використовують кон'югати антигену, антитіла або обидва компоненти цієї реакції з ферментами. Індикатором реакції є здатність ензимів викликати руйнування субстрату з утворенням забарвленого продукту. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості зв'язаних молекул антигену і антитіл [103,104].

*Відділення біомаси.* Після закінчення індукції синтезу ентероцину культуральну рідину *E. faecalis* 14 (100 мл), центрифугують при 9000 об/хв протягом 5 хв. Отриманий супернатант інкубують всю ніч при 4 °С із СМ Sephadex® С-25 (GE Healthcare Life Sciences, Milwaukee, Вашингтон).

*Відділення смоли.* Смолу промивають у буферах (50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН=6,3 (50 мл) та 0,5 М розчин NaCl (50 мл)). Зв'язаний зі смолою бактериоцин піддають елююванню 1,5 М розчину NaCl (20 мл) [31].

*Приготування буферу.* Для приготування натрій-фосфатного буферу спочатку необхідно приготувати 1 М розчин Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (наважку 142 г розчиняють в 1 л дист.води) і 1 М розчин NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (наважку 60 г розчиняють в 500 мл дист води). Для одержання 50 мл 1 М натрій-фосфатного буферу об'єднують 45,7 мл 1 М розчину Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> та 4,3 мл 1 М розчину NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН контролюють на рН-

метрі). Для одержання 0,05 М натрій-фосфатного буферу 1 М буфер розбавляють дист. водою у 20 разів [105].

*Приготування розчинів.* Для приготування 0,5 М розчину NaCl необхідно приготувати 1 М розчин (наважка 58,5 г розчиняють в 1 л дист.води). Щоб отримати 50 мл 0,5 М розчину, потрібно 25 мл 1 М розчину розвести у 2 рази. Для приготування потрібної кількості 1,5 М розчину NaCl наважку 1,74 розчиняють в 20 мл дист.води [105].

*Додаткове очищення.* Дане очищення проводять гель-фільтрацією, використовуючи колонки PD MidiTrap G-10 (GE Healthcare Life Sciences). Як буфер використовують 50мМ натрій-фосфатний (рН 6,3) (приготування зазначено вище), доповнений 150 мМ розчином NaCl [31].

*Приготування розчину.* Для одержання 0,15 М розчину NaCl необхідно 1 М розчин (приготування розчину зазначено вище) розбавити в 6,7 разів [33].

*Визначення концентрації ентероцину імуноферментним методом.* Для визначення вмісту ентероцину (у супернатанті) методом ІФА використовують зчитувач iEMS Labsystems (Labsystems) із вбудованим програмним пакетом для аналізу даних [99].

Лунки з плоским дном, в яких знаходяться пластинки з полістиролом (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Данія), покривають протягом ночі при 4 °С супернатантами. Після додавання антитіл проти EntA та кон'югату проти козячого імуноглобуліну G пероксидази (Cappel Laboratories, West Chester, PA, США), визначають пов'язану пероксидазу за допомогою АВТС (2,2'-азино-біс [3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота]) (Sigma-Aldrich) як субстрат, шляхом вимірювання поглинання світла при 405 нм. Вимірювання проводять на зчитувачі iEMS Labsystems (Labsystems) [26].

### **8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту**

#### Визначення концентрації глюкози

Основним джерелом вуглецю в середовищі є глюкоза. Для визначення її кількості використовують метод ВЕРХ. Метод базується на визначенні зміни площі піка глюкози на хроматограмі залежно від її концентрації (за необхідності

розчин проби розбавляють до концентрації, що лежить в інтервалі лінійності калібрувального графіка) [106].

*Методика побудови калібрувального графіка.* 60,0 г глюкози вміщують у мірну колбу ємністю 2 л, додають 1700 мл води для хроматографії, розчиняють і доводять об'єм до мітки тим самим розчинником (60 г/л). У мірні колби об'ємом 1 л вміщують 10; 20; 50; 100; 300; 500; 600 мл розчину глюкози і доводять водою для хроматографії до позначки, отримуючи розчини зі вмістом глюкози 1; 2; 5; 10; 30; 50 і 60 г/л відповідно. За одержаними результатами хроматографії (параметри для кожного дослідження підбираються індивідуально) будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис значення концентрації глюкози (г/л), а по осі ординат – значення площ піків [106].

Лінійна залежність для хроматографічного визначення глюкози встановлюється індивідуально за графіком [106].

*Методика визначення глюкози в дослідному зразку.* Культуральну рідину центрифугують при 9000 об/хв протягом 5 хв (Microfuge 20 Series, Beckman Coulter Inc., Brea, CA) і потім фільтрують через 0,2 мкм целюлозний фільтр (PALL). Потім, без розведення, супернатант аналізують за допомогою ВЕРХ, оснащеної 2414 Детектором Рефракції та колоною НРХ-87Н Aminex (300 × 7,8 мм, Bio-Rad, Hercules, Каліфорнія) при 50° С та 410 нм. Як рухому фазу використовують розчин 0,05 М сірчаної кислоти. Зразки зберігають при 4° С під час ін'єкцій. Калібрувальний графік глюкози, що отримана з 99,9% чистої глюкози, лінійний в діапазоні між 1 г/л і 60 г/л [107].

#### Визначення концентрації амінного азоту

Оскільки джерелом азоту в середовищі є амонійні кислоти та пептиди, слід розглядати методи кількісного визначення амінокислот. Для кількісного визначення також використовується метод ВЕРХ.

Принцип базується на порівнянні амінокислот з культуральної рідини з профілем хроматографічного градієнта, який побудовано за допомогою розчину стандартного зразка амінокислот [108].

*Методика побудови калібрувального графіка.* Для побудови графіка необхідно приготувати стандартний зразок амінокислот. Стандартний зразок амінокислот містить у своєму складі такі амінокислоти: аланін, аргінін, аспарагінова кислота, глютамінова кислота, гліцин, гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, пролін, серин, треонін, триптофан, тирозин, валін у кількості 0,25 мМ кожна, а також цистеїн у кількості 0,125 мМ. Зразок піддають хроматографії [108].

За одержаними результатами хроматографії будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис значення концентрації амінокислот (г/л), а по осі ординат – значення площ піків [108].

Лінійна залежність для хроматографічного визначення амінокислот встановлюється індивідуально за графіком.

*Приготування розчинів амінокислот.* 0,25 мМ розчин аланіну – наважку 0,0006 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин аргінін – наважку 0,0011 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин аспарагіну – наважку 0,0009 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин глютаміну – наважку 0,0009 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин гліцину – наважку 0,0005 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин гістидину – наважку 0,001 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин ізолейцину – наважку 0,0008 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин лейцину – наважку 0,0008 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин лізину – наважку 0,0009 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин метіоніну – наважку 0,001 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин фенілаланіну – наважку 0,001 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин проліну – наважку 0,0007 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин серину – наважку 0,0007 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин треоніну – наважку 0,0008 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин триптофану – наважку 0,0007 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин тирозину – наважку 0,0012 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,25 мМ розчин валіну – наважку 0,0008 г розчинити в 25 мл дист.води; 0,125 мМ розчин цистеїну – наважку 0,0004 г розчинити в 25 мл дист.води [105].

Для отримання стандартного зразку амінокислот розчини необхідних амінокислот (зазначено вище) змішують пропорційно одна одній.

*Методика визначення амінокислот в дослідному зразку.* Клітини центрифугують протягом 10 хв при 21500 об/хв. Отриманий супернатант аналізують на кількісне визначення амінокислот [109].

Кількісне визначення амінокислот проводять за допомогою системи HPLC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Німеччина), флуоресцентного детектора системи Agilent 1200 (довжина хвилі збудження: 340 нм, довжина хвилі випромінювання: 450 нм), колонки C18 Gemini1 (5 м, 150×4,6 мм) і передколонки SecurityGuard™ (обидві колони постачаються Phenomenex1, Ашаффенбург, Німеччина). Для дериватизації застосовують ортофталдіалдегід. Поділ досягається за допомогою полярної фази 40 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН=7,8) та 45% MeOH, 45% CH<sub>3</sub>CN, 10% H<sub>2</sub>O як неполярна фаза при швидкості потоку 1 мл на хв<sup>-1</sup> та температурі 40 °С [109].

*Приготування розчину.* Для отримання 0,04 М розчину NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> необхідно розбавити 1 М розчин NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (приготування зазначено вище) в 25 разів (рН регулюється на рН-метрі) [105].

Ідентифікацію амінокислот проводиться шляхом порівняння часів утримування піків на хроматограмі випробовуваного розчину з часами утримування речовин – стандартного зразку амінокислот на хроматограмі розчину порівняння [108].

#### **8.4. Показники якості готового продукту**

##### Мікробіологічний контроль чистоти

1 г препарату розчиняють у 9 мл дистильованої води. Після чого, 0,1 мл отриманої суспензії висівають на агаризовані середовища МПА – для виявлення бактерій та СА – для виявлення грибів та дріжджів.

##### Ідентифікація та контроль концентрації ентероцину

Даний контроль проводять згідно методики визначення ентероцину, що було зазначено вище (п.8.3.2). Відмінність в тому, що використовується не

супернатант, а 1 г розчиненого препарату. Як контроль використовують ентероцин визначеної концентрації.

#### Контроль активності ентероцину

Активність бактеріоцину визначають кількісно в одиницях активності на мілілітр (AU/мл). Для цього ультраконцентрат послідовно розводять 2 рази (1/10 та 1/100). У разі визначення сухого препарату використовують розчин ентероцину із дистильованою водою (розведення 1/10 та 1/100). Після чого, 0,5 мл розведеного концентрату (розчину) завантажують в лунки мікротитрувальної пластини, що містили 0,15 мл індикаторного штаму (OD600 0,02). Пластини інкубують в шейкері-інкубаторі (200 об/хв) при 37 ° С протягом 18 год. Зростання штаму індикатора вимірюють за допомогою зчитувача мікропланшетів (Molecular Devices, Саннівейл, США) при 600 нм. Одну одиницю активності (AU) визначають як еквівалент найбільшого розведення ультраконцентрату (розчину препарату), що призводить до 50% інгібування росту індикаторного штаму [110].

Для визначення активності ентероцину як індикаторні мікроорганізми найчастіше виступають *Lactobacillus sakei*, *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brohotrix thermospacta*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Clostridium perfringens* (як збудник некротичного ентериту) та ін. [111].

Активність ентероцину щодо *Clostridium perfringens* має становити щонайменше 2900 AU/мл.

#### Контроль вологовмісту препарату

Дві наважки порошку масою 1-3 г, зважені з погрішністю  $\pm 0,01$ г, помішують у заздалегідь висушені і зважені разом з кришками бюкси. Кожну наважку порошку сушать в сушильній шафі при температурі 100-105 °С до постійної маси.

Постійна маса вважається досягнутою, якщо різниця між двома подальшими зважуваннями після 30 хв висушування і 30 хв. охолодження в ексікаторі не перевищує 0,01 г.

Вологість сировини (X) у відсотках обчислюють за формулою:

$$X = \frac{(m - m_1) * 100}{m}$$

$m$  – маса порошку до висушування, г

$m_1$  – маса порошку після висушування, г

За остаточний результат визначення беруть середнє арифметичне двох паралельних визначень, обчислених до десятих часток відсотка. Допустима розбіжність між результатами двох паралельних визначень не повинна перевищувати 0,5 % [112].

Вологість ентероцину повинна становити 1-5%.

## РОЗДІЛ 9

### АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Для розробки системи автоматизації відповідно до даного опису всі необхідні параметри і засоби для їх досягнення сформульовані в завданні на автоматизацію (табл. 9.1).

#### Опис розробленої схеми автоматизації та специфікація

У відповідності з завданням на автоматизацію (табл.9.1) ділянка автоматизується по 8 контурах:

**1 контур.** Початок представлений занурювальним датчиком виміру температури 1а. Він складається з вимірювального перетворювача і первинного перетворювача опору та має уніфікований аналоговий вихідний сигнал. Отриманий сигнал поступає на ПЛК та ПК. На схемі продемонстровано, що данні отримані з датчика відображаються, реєструються у вигляді трендів, та піддаються логічному керуванню контролера відповідно до умови завдання автоматизації. На АРМа оператора виведено значення температур, і він може змінювати їхні умови. Після опрацювання даних, ПЛК через перетворювачі електричного струму в пневматичний сигнал 1 б, 1г, 1е здійснюють регулювання виконавчими регулюючими органами 1в, 1с (пара насичена що позначається в розриві 2н), 1д (холодна вода позначається умовно в розриві трубопроводу - 1х). Також, таким же чином температура регулюється у збірнику, занурювальний датчик 1е, регулювання відбувається за допомогою води оборотної.

**2 контур** здійснює регулювання тиску в процесі. Зокрема, в нижній частині ферментеру встановлений датчик виміру надлишкового тиску 2а. Уніфікований аналоговий сигнал перетворюється в цифрову форму через аналоговий вхід. Після цього виміряні параметри перетворюються знову в аналоговий сигнал і відкривають або закривають клапани регулюючого механізму 2б (подача стерильного повітря – розрив з умовним позначенням трубопроводу 3с), і 2в. На

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Ковшар І.Д.</i>			<b>РОЗДІЛ 9 АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА</b>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					80	106
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

## Завдання на автоматизацію ділянки виробничого культивування

*Enterococcus faecalis*

№ з.п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Ферментер	Температура в ферментері (за виробничого культивування)	37± 1°C	Контроль	Відображення Реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив витрати насиченої пари що подається в сорочку ферментеру і на витрату подачі холодної води в сорочку
2	Ферментер	Надлишковий тиск в ферментері (за виробничого культивування)	0,05-0,07 МПа	Контроль	Відображення Реєстрація Сигналізація	АРМ оператора, звуковий сигнал
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на подачу азоту та на випускний клапан відпрацьованого повітря
3	Ферментер	Рівень КР в ферментері	60 ± 5%	Контроль	Відображення Реєстрація Сигналізація	АРМ оператора, звуковий сигнал
4	Ферментер	Активна кислотність ПС за культивування	6,8 ± 0,2од.	Контроль	Відображення Реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на подачу буфера в ферментер
5	Ферментер	Перемішування, двигун мішалки	Ввімкнено/ вимкнено	Управління	Дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора
6	Клапан зливу культуральної рідини	Стан клапану	Ввімкнено/ вимкнено	Управління	Дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора
7	Відцентровий насос перекачування культуральної рідини до збірника	Стан насосу	Ввімкнено/ вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
8	Клапан прийому культуральної рідини	Стан клапану	Ввімкнено/ вимкнено	Управління	Дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора
9	Збірник	Рівень КР в апараті	90± 5%	Контроль	Відображення	АРМ оператора, звуковий сигнал
					Реєстрація	
					Сигналізація	

10	Збірник	Температура КР	20±2 °С	Контроль	Відображення Реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	
						Вплив витрати води оборотної що подається в сорочку збірника

АРМі оператора-технолога можна змінювати умови регулювання параметру, зі відображенням параметру в реальному часі, та з збереження змін в архіві.

**3 контур** вимірює рівень заповнення ферментеру культуральної рідиною, значення якого контролюється на позначці  $60 \pm 5\%$ , а також рівень заповнення збірнику, значення якого контролюється на позначці  $90 \pm 5\%$ . У ферментері це здійснюється датчиком рівня 3а, який встановлюється в днищі апарату вимірюючи гідростатичний тиск. У збірнику використовується ультразвуковий датчик 4а, який встановлюється зверху. При виході значення за межі на АРМі оператора-технолога спрацьовує сигналізація. Значення відображається на АРМі та зберігається у вигляді трендів.

**4 контур** стабілізує рівень закислення КР під час культивування. До контуру входить первинний перетворювач (5а) який вимірює значення кислотності. Значення підтримується на рівні  $6,8 \pm 0,2$  шляхом впливу на клапан подачі буферу, регулюючим органом (5в), попередньо перетворивши цифровий в аналоговий сигнал перетворювачем встановленим «по місцю». Значення активної кислотності відображається на АРМі оператора-технолога та зміни які відбуваються під час процесу і регулювання параметру реєструється.

**Контур 6** здійснює вплив на керування органами відкриття клапану 6а. Над клапанами здійснюється управління оператором з АРМа через дискретні виходи ПЛК.

**Контур 7** забезпечує управління стану мішалки. Для вмикання на щиті дистанційного управління SB1 встановлена пускова апаратура для запуску увімкнення мішалки за рахунок впливу на магнітний пускач КМ1, та кнопка «Стоп» для припинення перемішування.

**Контур 8** Для забезпечення безаварійної роботи насосів необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» з щита управління SB2, та безпосередньо біля насосу («по місцю») SB3. Для вибору місця з якого саме буде здійснюватися управління використовується тумблер SA1. Подача напруги на двигуни насосів здійснюється за допомогою магнітних пускачів KM1 та KM2. Після ввімкнення насосу КР подається на подальшу обробку до збірнику на наступній ділянці.

Всі технічні засоби які наведені в схемі автоматизації і їх характеристики занесені в специфікацію обладнання (табл. 9.2).

## Специфікація і характеристика засобів автоматизації

№ позиції за схемою	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, модель	Виробник
1а	Діапазон виміру - від -50°C до +180°C, сигнал 4...20 мА, діаметр занурювального елемента – 6-8 мм, довжина занурювального елемента – 60 мм. Похибка $\pm 1$ %. Живлення від +9В до +36В. Умовний тиск - 6,3 мПа	ТСМУ-1088.60 [113]	«Маранта Електро», Україна
1б, 1г, 1е	Перетворювач електропневматичний, сигнал на вході 4...20мА, на виході - 20...100кПа	2713-WP	Dwyer
1в, 1 д, 1є	Мембранний виконавчий механізм прямої дії з пневматичним позиціонером, управляючий сигнал 20...100кПа, умовний хід вихідного елемента 25мм	МИМ200-113	ГідроЕнерго-Снаб
2а	Похибка до $\pm 0,075$ %. Тиск максимальний 60 бар. Робоча температура -40 – 150°C. Матеріал корпусу - алюміній, нержавіюча сталь; степінь захисту корпусу: IP66/68. Керамічна мембрана (99.9% Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), уніфікований сигнал 4...20 мА.	Cerabar S PMC71 [114]	Endress +Hauser
2б, 2в	Електромагнітний клапан з котушкою, матеріал виготовлення: латунь, напруга живлення котушки ~230В, =24В, під'єднання: G1/8...G2	316294	ЈAKSA
3а	Врізний датчик вимірювання рівня за гідростатичним тиском. Похибка: 1,0/0,5% Вихідний сигнал: 4...20 мА, 0...10 В Сенсор: керамічний тензорезистивний діапазон температур вимірюваного середовища : -25...+135°C	LMK 331[115]	BD Sensors
4а	Ультразвуковий рівнемір, діапазон вимірювань 0,2-25м, максимальна допустима температура +90°C, максимальний допустимий тиск 3бар, під'єднання G2, аналоговий вихід, клас точності 0,05	NUS-4	Kobold

Закінчення табл. 9.2

5а	Датчик рН. Високоточний. 0 ... 14рН Діапазон роботи – 135°С Максимальний тиск -6 Бар Картридж EVEREF-F для електролітів, що не містить срібло	EASYFERM PlusPlus, VP PlusK8 [116]	Hamilton
5б	Джерело живлення : HART: 14–30 V DC (30 V DC макс.) FOUNDATION FIELDBUS, PROFIBUS PA: FISCO напруга живлення 9–17,5 V DC; лінійна характеристична крива 9–24 V DC. Вихідний сигнал - 1 x 4–20 mA, гальванічно ізольований.	SI792 [117]	HACH-LANGE
5в	Електромагнітний клапан з котушкою, матеріал виготовлення: латунь, напруга живлення котушки ~230В, =24В, під'єднання: G1/8...G2	316294	JAKSA
6а	Електромагнітний клапан з котушкою, матеріал виготовлення: латунь, напруга живлення котушки ~230В, =24В, під'єднання: G1/8...G2	316294	JAKSA
KM1, KM2	Магнітний пускач, робочий струм 400А, потужність двигуна 200кВт, управляючий сигнал 220В	3RT1075-6AP36	SIEMENS
SB1- SB3	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T,B7113	Lovato
SA1	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210-2DA11	SIEMENS

## РОЗДІЛ 10

### ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

#### 10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва ентероцину на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологія одержання мікробного білку ентерококів з використанням *E. faecalis* 14 включає в себе наступні етапи:

1. Санітарна підготовка виробництва. На даному етапі проводиться миття обладнання з використанням СІР-мийки, підготовка приміщень – миття стін, підлоги, вікон, дверей, поверхонь. Зокрема на цій стадії використовуються великі обсяги миючих засобів, таких як кальцинована сода, так і дезінфікуючого засобу – Дезохлорин. Після обробки, відпрацьовані мийні розчини та промивна вода з відповідними забруднювачами прямує до каналізації, звідки вже має згодом залишити межі виробництва.

Отже, робимо висновок, що цей етап є місцем емісії значної кількості рідких відходів.

2. Приготування розчинів титрувальних агентів. На даному етапі відходи можуть складати лише певні зовсім невеликі кількості розчинів, що втратили свої показники нормативної відповідності через певний ряд умов, і не можуть використовуватися в подальшому виробництві. Всі розчини далі передаються на етап підготовки інокуляту та виробниче культивування. Титрувальні розчини, які використовуються представлені сірчаною кислотою, гідроксидом натрію та натрій-фосфатним буфером.

3. Приготування та стерилізація поживних середовищ. При приготуванні поживних середовищ, можливе відбраковування сировини при невідповідності якісних показників, проте передбачається порівняно мала кількість таких відходів. Далі поживне середовище передається на етап підготовки інокуляту та виробниче культивування.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ковшар І.Д.			<b>РОЗДІЛ 10 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</b>	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					86	106
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

4. Підготовка посівного матеріалу. З цього етапу починається безпосередньо технологічний процес, і рідких відходів, як таких, не передбачається, адже посівний матеріал разом з поживним середовищем після культивування перетворюється на культуральну рідину, що передається по стадіям вирощування інокуляту, збільшуючись в об'ємах. Після досягнення об'єму засівної дози ферментеру інокулят передається на виробниче культивування.

Під час культивування *Enterococcus faecalis* 14, аераційне повітря не готується, але культуру постійно продувають інертним газом, а саме азотом. Тож, повітряні відходи будуть складатись з відпрацьованого азоту, та утвореного вуглекислого газу.

Робимо висновок, що цей етап є місцем емісії значної кількості газоподібних відходів.

5. Виробниче культивування. В результаті утворюється культуральна рідина, що передається у збірник для зберігання, і подальшої обробки, і безпосереднього випуску продукту на ринок. З рідких відходів виділятися можуть лише непередбачені обставинами. Повітряні відходи як і на минулому етапі утворені відпрацьованим азотом та вуглекислим газом.

Робимо висновок, що цей етап також є місцем емісії значної кількості газоподібних відходів.

6. Виділення цільового продукту. На даному етапі проводиться центрифугування культуральної рідини для отримання супернатанту з подальшим пропусканням його через ультрафільтраційну установку та сушінням на розпилювальній сушарці. При відділенні супернатанту утворюються тверді відходи у вигляді біомаси ентерококу. При подальшій обробці лише на стадії сушіння виходить відпрацьоване повітря.

Робимо висновок, що цей етап є місцем емісії твердих (пастоподібних) та газоподібних відходів.

**Висновок:** аналіз технологічної схеми показує, що емісія рідких відходів відбувається в основному на етапі санітарної підготовки виробництва (1 етап), та

в невеликих кількостях, в більшості непередбачених випадках, на інших етапах. Емісія газоподібних відходів сконцентрована на етапах підготовки посівного матеріалу (4 етап), виробничого культивування (5 етап) та виділенні цільового продукту (6 етап). Тверді відходи утворюються лише на етапі виділенні цільового продукту (6 етап).

## 10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

### 10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Склад рідких відходів представлений відпрацьованими мийними та дезінфікуючими розчинами із залишками культуральної рідини, та промивною водою. Зазначимо, що виробництво працює 230 робочих днів за рік, тому розрахунок об'ємів проводиться за даною кількістю днів. Детальніше склад і приблизні об'єми наведені в табл. 10.1.

Таблиця 10.1

#### Характеристика рідких відходів на виробництві препарату для силосування з використанням *Enterococcus faecalis* 14

Назва складової рідких відходів	Речовини, що входять до складу	Приблизні об'єми за 230 робочих днів	Клас небезпеки
0,5% мийний розчин кальцинованої соди[6]	кальцинована сода	36,47 м <sup>3</sup>	3 клас небезпеки
0,1% дезінфікуючий розчин Дезохлорину [7]	натрій хлорид, натрій гіпохлорит	13494,5 м <sup>3</sup>	3 клас небезпеки
Пермеат (залишки культуральної рідини)	Глюкоза (20 г/л), дріжджовий екстракт (5 г/л), казеїновий пептон (10 г/л), м'ясний екстракт (10 г/л), мозково-серцевий екстракт (17,5 г/л), твін-80 (1 г/л), солі (близько 15 г/л)	17 м <sup>3</sup>	4 клас небезпеки
<b>Всього</b>		13548 м <sup>3</sup>	

Склад рідких відходів в більшій кількості складають органічні сполуки, та невеликий відсоток неорганічних. Можуть включати невеликі залишки мікроорганізмів.

Відповідно до вимог Правил охорони поверхневих вод від забруднення зворотними водами, затверджених постановою Кабінету Міністрів України від 25 березня 1999 року № 465 [120].

Стічні води мають відповідати низці вимог. Для забезпечення цих умов пропонується наступна схема очистки рідких відходів [121-123]:

1. Надходження стічної води в усереднювач, де відбувається інтенсивне перемішування стоків, та додавання титрувальних агентів для нормалізації рН в разі необхідності, розбавлення водою за необхідності.

2. Освітлення стічних вод від механічних домішок у первинних відстійниках. Де відбувається відокремлення води від завислих часток та поверхнево-активних речовин.

3. Стадія біологічного очищення. Через невеликі витрати стічних вод в добу, пропонується використання крапельних біофільтрів (об'ємного завантаження), адже вони забезпечують повну біологічну очистку стічних вод, з природною вентиляцією.

4. Відокремлення біоплівки що надходить з біофільтрів у вторинних відстійниках.

Схема роботи крапельних біофільтрів наступна. Стічна вода, освітлена в первинних відстійниках, самоплином (або під напором) поступає з системи подачі стічної води в розподільні пристрої, з яких періодично падає на поверхню біофільтра. Вода, профільтрувавшись через біофільтри, потрапляє в дренажну систему та далі за загальним непроникаючим дном стікає до відвідних лотків, розташованих за межами біофільтра. Потім, вода вступає у вторинні відстійники, в яких біоплівка відділяється від очищеної води [124].

Таке очищення стічних вод повністю забезпечує необхідні потреби. Також, можна зазначити, що таку очищену воду можна використовувати на виробництві повторно.

### **10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів**

До твердих відходів, а точніше пастоподібних, відноситься біомаса фекального ентерококу. Слід зазначити, що даний штам є умовно-патогенним та входить до звичайної мікрофлори людини. Відноситься до 3 класу патогенності [125].

Є декілька варіантів знешкодження ентерококу фекального, які є екологічно безпечними. Наприклад, при вермикомпостуванні було виявлено, що такий вид біодеградації призводить до зниження концентрації мікробної маси до 98,7%. Також, є повідомлення про використання біомаси даного біологічного агента як поліпшувача ґрунту та добриво, просто вносячи його в землю. Ще одним варіантом переробки біомаси є отримання енергії, шляхом спалювання мікробної маси [126,127].

Таким чином, за допомогою *Enterococcus faecalis* 14, можна отримати:

- Біогумус (шляхом вермикомпостування);
- Поліпшувач ґрунту та добриво (шляхом внесення в землю);
- Електроенергію (шляхом спалювання).

### **10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів**

Газоподібні відходи представлені загалом відпрацьованим азотом, повітрям та вуглекислим газом. Дані відходи відносяться до 4 класу небезпеки [128].

Правові основи охорони атмосферного повітря передбачені в законі України «Про охорону атмосферного повітря». Для утилізації газових відходів також можна використовувати крапельний біофільтр, але не буде можливо одночасно очищати стічні води та відпрацьовані гази. Тому, для утилізації газових відходів пропонується використовувати біоскрубер [128,129].

Скрубер-абсорбер Вентури з трьома ступенями очищення дозволяє використовувати економічно доцільні гідродинамічні режими з меншими втратами напору, забезпечуючи високу ефективність очищення від пилу і абсорбцію газоподібних шкідливих компонентів [130].

Принцип його роботи такий - забруднене повітря подається до абсорбера, де відбувається змішування повітря і води, далі дана суміш подається в головний реактор, де відбувається її обробка мікроорганізмами активного мулу, що призводить до очистки повітря від шкідливих домішок, після чого вода подається на початок процесу, а очищене повітря виходить через верх абсорбера в момент подачі цієї води [130].

#### **10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів**

Аналіз небезпечності показує, що відходи при виробництві ентероцину мають категорії помірно небезпечних речовин, та мало небезпечних речовин. Також, виробництво має не великі викиди відходів за рік, що дає можливість створити ефективну та економну систему утилізації.

Після аналізу відходів пропонуються зменшення утворення відходів за рахунок повторного використання мийних розчинів для миття обладнання. Так як передбачається встановлення СІР для миття обладнання, то є конструктивні можливості забезпечити багаторазове використання робочих мийних розчинів, що в свою чергу знизить кількість відходів мийних розчинів на виробництві як мінімум в 2 рази.

Виробництво ентероцину з використанням штаму *Enterococcus faecalis* 14 через відносно невеликі в промислових масштабах добові об'єми стічних вод, твердих та газоподібних відходів, та низький рівень токсичності, достатньо легко і ефективно можуть бути повністю знешкоджені за рахунок правильного підбору екологічної утилізації. Загалом дане виробництво, що проектується має повноцінні перспективи повністю відповідати екологічним вимогам, оскільки деякі відходи можна не лише знищувати, а перероблювати на інші необхідні ресурси.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Скоромна О. І., Голубенко Т. Л., Разанова О. П. Альтернативи розвитку виробництва продукції скотарства в умовах земельних відносин. *Аграрна наука і харчові технології*. 2017, 4(98): 209 – 217.
2. Виробництво продукції тваринництва. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://agropolit.com/news/15734-u-2020-rotsi-zroste-virobnitstvo-produktsiyi-tvarinnitstva>.
3. Галанець В. Птахівництво як найбільш дієздатна галузь тваринництва. *Аграрна економіка*. 2014, 7(3-4): 37-41.
4. Фотіна Т. І., Ващик Є. В. Вивчення антимікробної дії експериментального препарату «Сарофлукс» для боротьби з некротичним ентеритом птиці. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*. 2017, 11: 120-123.
5. Ahmad V., Khan M. S., Jamal Q. M. S., Alzohairy M. A., Al Karaawi M. A., Siddiqui M. U. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2017, 49(1): 1-11. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016.
6. Абатуров А. Е., Крючко Т. А. Потенциальное значение бактериоцинов при этиологическом лечении инфекционных заболеваний респираторного тракта. *Здоровье ребёнка*. 2017, 12(7): 812-819. doi: 10.22141/2224-0551.12.7.2017.116187.
7. Cavicchioli V. Q., Camargo A. C., Todorov S. D., Nero L. A. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. *Journal of dairy science*. 2017, 100(4): 2526-2535. doi: 10.3168/jds.2016-12049.
8. Мерліч А. Г. Характеристика штаму *Enterococcus italicus* ОНУ547 продуцента бактеріоцину. Автореф. дис. Одеса, 2018. 94 – 96 с.
9. Бактериоцины пробиотиков. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://propionix.ru/bakteriotsiny> .

10. Чижаева А. В., Дудикова Г. Н. Научный обзор: теоретические и практические аспекты конструирования пробиотических препаратов. *Биологические науки*. 2017, 2: 157-166.

11. Liu G., Wang Y., Li X., Hao X., Xu D., Wang C. Genetic and biochemical evidence that *Enterococcus faecalis* Gr17 produces a novel and sec-dependent bacteriocin, enterocin Gr17. *Frontiers in microbiology*. 2019, 10: 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2019.01806.

12. Braïek O. B., Ghomrassi H., Cremonesi P., Morandi S., Fleury Y., Le Chevalier P., Ghraïri T. Isolation and characterisation of an enterocin P-producing *Enterococcus lactis* strain from a fresh shrimp (*Penaeus vannamei*). *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017, 110(6): 771-786. doi: 10.1007/s10482-017-0847-1.

13. Colombo N. R., Chalón M. C., Dupuy F. G., Gonzalez C. F., Bellomio A. The case for class II bacteriocins: a biophysical approach using “suicide probes” in receptor-free hosts to study their mechanism of action. *Biochimie*. 2019, 165: 183-195. doi: 10.1016/j.biochi.2019.07.024.

14. Pat. 7452544 USA. Bacteriocins and novel bacterial strains / Stern N. J., Svetoch E. A., Eruslanov B. V., Volodina L. I., Kovalev Y. N., Kudryavtseva T. Y. et al. Publ. 30.11.06.

15. Ogaki M. B., Rocha K. R., Terra M. R., Furlaneto M. C., Maia L. F. Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in *Enterococcus* species. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 26: 1026-1034. doi: 10.4014/jmb.1509.09020.

16. Щепитова Н.Е., Сычёва М.В., Карташова О.Л. Скрининг штаммов энтерококков с целью разработки на их основе препаратов-пробиотиков. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2015, 13(188): 226-233.

17. *Enterococcus faecium* Aus0004: EFAU004\_02293. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?efc:EFAU004\\_02293](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?efc:EFAU004_02293) .

18. Enterocin. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enterocin> .

19. Ankaiah D., Palanichamy E., Antonyraj C.B., Ayyanna R., Perumal V., Ahamed S.I.B., Arul V. Cloning, overexpression, purification of bacteriocin enterocin-B and structural analysis, interaction determination of enterocin-A, B against pathogenic bacteria and human cancer cells. *International journal of biological macromolecules*. 2018, 116: 502-512. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.002.
20. Hanchi H., Mottawea W., Sebei K., Hammami R. The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in microbiology*. 2018, 9: 1-16. doi: 10.3389/fmicb.2018.01791.
21. Abengózar M.Á., Cebrián R., Saugar J.M., Gárate T., Valdivia E., Martínez-Bueno M., Rivas L. Enterocin AS-48 as evidence for the use of bacteriocins as new leishmanicidal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017, 61(4): 1-13. doi: 10.1128/AAC.02288-16.
22. Ovchinnikov K.V., Kristiansen P.E., Straume D., Jensen M.S., Aleksandrak-Piekarczyk T., Nes I.F., Diep D.B. The leaderless bacteriocin enterocin K1 is highly potent against *Enterococcus faecium*: a study on structure, target spectrum and receptor. *Front. Microbiol.* 2017, 8(774): 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2017.00774.
23. Singh A., Walia D., Batra N. Fresh-cut fruits: Microbial degradation and preservation. In *Microbial contamination and food degradation*. Academic Press. 2018, P. 149-176. doi: 10.1016/B978-0-12-811515-2.00006-8
24. Yusuf M. Natural antimicrobial agents for food biopreservation. In *Food Packaging and Preservation*. Academic Press. 2018, P. 409-438. doi: 10.1016/B978-0-12-811516-9.00012-9
25. Гармашева І. Л. Розповсюдження генів ентероцинів серед штамів ентерококів, ізольованих з шлунково-кишкового тракту людини. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2016, 2 (34): 30-40. doi: 10.18524/2307-4663.2016.2.
26. Jiménez J. J., Borrero J., Gútiez L., Arbulu S., Herranz C., Cintas L. M., Hernández P. E. Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Molecular biotechnology*. 2014, 56(6): 571-583. doi: 10.1007/s12033-014-9731-7.

27. Ghrairi T., Hani K. Enhanced bactericidal effect of enterocin A in combination with thyme essential oils against *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7. *Journal of food science and technology*. 2015, 52(4): 2148-2156. doi: 10.1007/s13197-013-1214-5.
28. Baños A., García J. D., Núñez C., Mut-Salud N., Ananou S., Martínez-Bueno M., Valdivia E. Subchronic toxicity study in BALBc mice of enterocin AS-48, an anti-microbial peptide produced by *Enterococcus faecalis* UGRA10. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, 132: 1-6. doi: 10.1016/j.fct.2019.110667.
29. Braïek O. B., Morandi S., Cremonesi P., Smaoui S., Hani K., Ghrairi T. Biotechnological potential, probiotic and safety properties of newly isolated enterocin-producing *Enterococcus lactis* strains. *LWT*. 2018, 92: 361-370. doi: 10.1016/j.lwt.2018.02.045.
30. Khan Z. H., Anandani J. H. Biochemical characterization and identification of enterocins produced by *E. hirae* and *E. faecalis*. *Bioscience biotechnology research communications*. 2016, 9(3): 539-545. doi: 10.21786/bbrc/9.3/29
31. Caly D. L., Chevalier M., Flahaut C., Cudennec B., Al Atya A. K., Chataigné G., Drider D. The safe enterocin DD14 is a leaderless two-peptide bacteriocin with anti-*Clostridium perfringens* activity. *International journal of antimicrobial agents*. 2017, 49(3): 282-289. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.016.
32. David O. M., Onifade O. E. Effects of partially purified enterocins from *Enterococcus faecalis* strains on the growth of some phytopathogenic fungi. *Ruhuna Journal of Science*. 2018, 9(2): 160-168. doi: 10.4038/rjs.v9i2.44.
33. Al-Taie S. F., Al-Musawi M. T. Optimization, Purification, and Characterization of Enterocin SH1 Produced By *E. Faecium* SH1 and Enterocin SH2 Produced by *E. Faecalis* SH2 Isolated from Dental Caries. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021, 425(4): 14144-14160.
34. Sharma P., Kaur S., Chadha B. S., Kaur R., Kaur M., Kaur S. Anticancer and antimicrobial potential of enterocin 12a from *Enterococcus faecium*. *BMC microbiology*. 2021, 21(1): 1-14. doi: 10.1186/s12866-021-02086-5

35. Al-Seraih A., Belguesmia Y., Baah J., Szunerits S., Boukherroub R., Drider D. Enterocin B3A-B3B produced by LAB collected from infant faeces: potential utilization in the food industry for *Listeria monocytogenes* biofilm management. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017, 110(2): 205-219. doi: 10.1007/s10482-016-0791-5
36. Ladjouzi R., Lucau-Danila A., Benachour A., Drider D. A leaderless two-peptide bacteriocin, enterocin DD14, is involved in its own self-immunity: Evidence and insights. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020, 8: 644. doi: 10.3389/fbioe.2020.00644
37. Zgheib H., Belguesmia Y., Boukherroub R., Drider D. Alginate Nanoparticles Enhance Anti-*Clostridium perfringens* Activity of the Leaderless Two-Peptide Enterocin DD14 and Affect Expression of Some Virulence Factors. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2021: 1-15. doi: 10.1007/s12602-020-09730-y
38. Belguesmia Y., Leclère V., Duban M., Auclair E., Drider D. Draft genome sequence of *Enterococcus faecalis* DD14, a bacteriocinogenic lactic acid bacterium with anti-*Clostridium* activity. *Genome announcements*. 2017, 5(30): 1-2. doi: 10.1128/genomeA.00695-17
39. Hernández-González J. C., Martínez-Tapia A., Lazcano-Hernández G., García-Pérez B. E., Castrejón-Jiménez N. S. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals*. 2021,11(4): 979. doi: 10.3390/ani11040979
40. *Enterococcus faecalis*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://tgw1916.net/Enterococcus/faecalis.html>
41. *Enterococcus* (энтерококки). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/1794>
42. Růžicková M., Vítězová M., Kushkevych I. The characterization of *Enterococcus* genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. *Open Medicine*. 2020, 15(1): 211-224. doi: 10.1515/med-2020-0032
43. Энтерококки. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://mibio.ru/contents.php?id=92>

44. *Enterococcus faecalis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteriainphotos/bacteria%20under%20microscope/enterococcus%20faecalis%20microscopy.html#>
45. *Enterococcus faecalis* colonies on bile esculin agar. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/enterococcus-faecalis-images/enterococcus-on-bile-esculin-agar.html>
46. *Enterococcus faecalis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.thistle.co.za/pdf\\_files/education/microbiology/microbiology\\_legends/Cycle\\_39/Cycle%2039%20Organism%203%20-%20Enterococcus%20faecalis.pdf](http://www.thistle.co.za/pdf_files/education/microbiology/microbiology_legends/Cycle_39/Cycle%2039%20Organism%203%20-%20Enterococcus%20faecalis.pdf)
47. Таксоному - *Enterococcus faecalis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.uniprot.org/taxonomy/1351>
48. *Enterococcus faecalis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=1351>
49. Wala F. A., Felemban E. M., Shafie A., Alhomrani M., Habeebullah H., Alsharif K., et al. The Antimicrobial Resistance and Prevalence of Enterococcus Species in Saudi Arabia. *J Pure Appl Microbiol.* 2019, 13(4)^ 2461-2470. doi: 10.22207/JRAM.13.4.61
50. Полегенька М. А. Аналіз сучасного стану виробництва продукції птахівництва України. *Економіка та держава.* 2019, (3): 137-143. doi: 10.32702/2306-6806.2019.3.137.
51. Державна служба статистики України. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.ukrstat.gov.ua/> .
52. Лаготюк В. О. Аналіз тенденцій розвитку галузі птахівництва в Україні. *Економіка і суспільство.* 2018, (6): 156-163.
53. Аграрний 2019-й: птиця утримує лідерство на ринку м'яса. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://agravery.com/uk/posts/show/agrarnij-2019-j-ptica-utrimue-liderstvo-na-rinku-masa> .
54. Прокопенко О. М. Баланси та споживання основних продуктів харчування населенням України. Статистичний збірник. – К.: Державна служба статистики України, 2019. – с. 18-19.

55. Hargis B. M. Overview of necrotic enteritis in poultry. *The Merck Veterinary Manual for Veterinary Professionals*. 2014.
56. Ngamwongsatit B., Tanomsridachchai W., Suthienkul O., Urairong S., Navasakuljinda W., Janvilisri T. Multidrug resistance in *Clostridium perfringens* isolated from diarrheal neonatal piglets in Thailand. *Anaerobe*. 2016, 38: 88–93. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.12.012.
57. «Ovostar Union». [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://lb.ua/file/company/4368\\_ovostar\\_union.html](https://lb.ua/file/company/4368_ovostar_union.html)
58. «Ovostar Union». Company overview. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ovostar.ua/uploads/investors/files/5e187c8f8b6fe.pdf>
59. Комбікорм для курей: склад, приготування своїми руками, норми годування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.vomturmhaus.com/kombikorm-dlya-kurei-sklad-prigotuvannya-svoyimi-rukami-norm>
60. Сколько корма нужно курице-несушке в день: составляем рацион кормления. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://poferme.com/ptitsy/kury/soderzhanie-k/nesushek/korm-k/ratsion-tablitsa.html> .
61. Аграрний 2019-й: птиця утримує лідерство на ринку м'яса. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://agravery.com/uk/posts/show/agrarnij-2019-j-ptica-utrimue-liderstvo-na-rinku-masa> .
62. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/efq00010>
63. Comerlato C. B., Zhang X., Walker K., Brandelli A., Figeys D. Comparative proteomic analysis reveals metabolic variability of probiotic *Enterococcus durans* during aerobic and anaerobic cultivation. *Journal of proteomics*. 2020, 220: 103764.
64. Використання профхімії на підприємствах відповідно до стандарту НАССР. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://officem.com.ua/uk/eksperty-rekomendujut/vikoristannja-profhimii-na-pidprijemstvah-vidpovidno-do-standartu-hassp>

65. Правильно вибираємо засоби хімії. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ns-plus.com.ua/2020/04/30/pravylno-vybyrayemo-zasoby-pobutovoyi-himiyi/>
66. Професійна і побутова хімія. Критерії вибору. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://officem.com.ua/uk/eksperty-rekomendujut/profesijna-i-pobutova-himija-kriteriji-viboru>
67. Миючі засоби. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://medbib.in.ua/moyuschie-sredstva.html>
68. Засекін Д., Пушкова А., Димко Р. Сучасні вимоги до мийно-дезінфікуючих засобів для санітарної обробки доїльного обладнання та молочного інвентаря. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції пам'яті професора Петра Столярчука «Управління якістю в освіті та промисловості: досвід, проблеми та перспективи» (Львів, НУЛП, лютий 2017 р.). С. 74.
69. Фамідез® СІР Ас 220. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://desomark.com.ua/index.php?option=com\\_virtuemart&view=category&virtuemart\\_category\\_id=80](https://desomark.com.ua/index.php?option=com_virtuemart&view=category&virtuemart_category_id=80)
70. Оніко. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p1175453602-professionalnoe-moyuschee-sredstvo.html>
71. Фармідез комбі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://desomark.com.ua/doc/2014%20MI%20Famides%20Combi.pdf>
72. Дезохлорин. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://oniko.ua/products/dezinfektsiya/dezinfikuyuchiy-zasib-dezohlorin.html>
73. АКУТОЛ СЕПТ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://prom.ua/p917095489-akutol-sept.html?prosale=&utm\\_source=google\\_pla&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=kiev\\_pla\\_promyshlennaya\\_himiya&utm\\_term=%7Bkeyword%7D&gclid=Cj0KCQiAnb79BRDgARIsAOVbhRoWohNcnRuQ1cXKVhzx8c\\_mxWXAduSQIhYEtLaKFI2szHox9S\\_rt44aAgdqEALw\\_wcB](https://prom.ua/p917095489-akutol-sept.html?prosale=&utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=kiev_pla_promyshlennaya_himiya&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=Cj0KCQiAnb79BRDgARIsAOVbhRoWohNcnRuQ1cXKVhzx8c_mxWXAduSQIhYEtLaKFI2szHox9S_rt44aAgdqEALw_wcB)

74. Взаємодія мікроорганізмів з навколишнім середовищем. Мікробіота ротової порожнини людини: навч. посібник з мікробіології для студентів-стоматологів II-III курсу мед ф-ту/О. В. Войтович. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2015. – 68 с.

75. Герман В. Ф., Одненко А. І. Вільновихровий насос для мікробіологічної промисловості. Матеріал и науково - технічної конференції викладачів, співробітників, аспірантів і студентів факультету технічних систем та енергоефективних технологій (Суми, 18–21 квітня 2017 року). С. 52

76. Мерліч А. Г., Жунько І. Д., Ліманська Н. В., Іваниця В. Антагоністична активність продуктів метаболізму бактерій *Lactobacillus plantarum* та *Enterococcus italicus* за сумісної дії проти фітопатогенних бактерій. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2017, (3): 45-54.

77. Сливка І. М., Цісарик О. Й. Біотехнологія створення вітчизняних бактеріальних препаратів для молочної промисловості України. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. Серія: Харчові технології*. 2016, 18 (2): 103-110.

78. Bağcı U., Togay S. O., Temiz A., Ay M. Probiotic characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from human milk and colostrum. *Folia microbiologica*. 2019, 64 (6): 735-750. doi: 10.1007/s12223-019-00687-2.

79. Kassaa I. A., Rafei R., Moukhtar M., Zaylaa M., Gharsallaoui A., Asehraou A., et al.. LABiocin database: a new database designed specifically for Lactic Acid Bacteria bacteriocins. *International journal of antimicrobial agents*. 2019, 54 (6): 771-779. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.07.012

80. Gaspar C., Donders G. G., Palmeira-de-Oliveira R., Queiroz J. A., Tomaz C., Martinez-de-Oliveira J., Palmeira-de-Oliveira A. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *Amb Express*. 2018, 8 (1): 1-8. doi: 10.1186/s13568-018-0679-z.

81. Балко О. І., Ярошенко Л. В., Балко О. Б., Пасічник Л. А., Авдєєва Л. В. Активність бактеріоцинів *Pseudomonas aeruginosa* щодо фітопатогенних штамів *Pseudomonas syringae*. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2017, 2 (38): 51-60.
82. Juturu V., Wu J. C. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology advances*. 2018, 36 (8): 2187-2200. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.10.007
83. Niederhäusern S. D., Camellini S., Sabia C., Iseppi R., Bondi M., Messi P. Antilisterial Activity of Bacteriocins Produced by Lactic Bacteria Isolated from Dairy Products. *Foods*. 2020, 9 (12): 1757. doi: 10.3390/foods9121757
84. Дубковецький І. В., Малезик І. Ф., Пасічний В. М., Страшинський І. М., Стрельченко Л. В., Коломієць Р. А., Фурсік О. П. Дослідження впливу комбінованого термопідведення в процесі сушіння на зміну характеристик білків різної природи. 2014.
85. Lorenz-Fonfria V. A. Infrared difference spectroscopy of proteins: from bands to bonds. *Chemical reviews*. 2020, 120 (7): 3466-3576. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00449
86. Charoenviriyakul C., Takahashi Y., Nishikawa M., Takakura Y. Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization. *International journal of pharmaceutics*. 2018, 553 (1-2): 1-7. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.032.
87. Abanoz H. S., Kunduhoglu B. Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* KT11 against some pathogens and antibiotic-resistant bacteria. *Korean journal for food science of animal resources*. 2018, 38 (5): 1064. doi: 10.5851/kosfa.2018.e40
88. Миралимова Ш. М., Огай Д. К., Кутлиева Г. Д., Ибрагимова А., Сохибназарова Х. Синтез бактериоциноподобного вещества штаммом *Lactobacillus plantarum* 42, выделенным из квашеной капусты. *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2016, 2 (3): 6-11.
89. Трубнікова А. А., Чабанова О. Б., Бондар С. М., Шарахматова Т. Є. Одержання сухого безлактозного білково-ліпідного концентрату маслянки. *Вісник*

Національного технічного університету ХПІ. Серія: Нові рішення в сучасних технологіях. 2019, (1): 86-99.

90. Holcarpкова P., Kolarova Raskova Z., Hrabalikova M., Salakova A., Drbohlay J., Sedlarik V. Isolation and thermal stabilization of bacteriocin nisin derived from whey for antimicrobial modifications of polymers. *International Journal of Polymer Science*. 2017: 3072582. doi: 10.1155/2017/3072582

91. Флакoн полимерный, 10мл. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p236347739-flakon-polimernyj-10ml.html?>

92. Флакoн 10мл стекло вcборе. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p1162614411-flakon-10ml-steklo.html?>

93. Красінько В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія». – К.: НУХТ, 2019. – с. 144-157.

94. Nishiyama M., Iguchi A., Suzuki Y. Identification of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* as vanC-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan. *Journal of Environmental Science and Health*. 2015, 50(1): 16-25. doi: 10.1080/10934529.2015.964599.

95. Chromogenic medium for the immediate identification of *E. coli*, *Proteeae* and *Enterococcus*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary\\_us/files/18\\_chromid\\_reading-guides\\_v3-digital.pdf](https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/18_chromid_reading-guides_v3-digital.pdf).

96. Chromocult Enterococci agar (Хромогенный агар на энтерококки). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mibio.ru/contents.php?id=292>.

97. Bile esculin azide agar. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/06105?lang=en&region=UA>.

98. m *Enterococcus* Agar. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.humeau.com/media/blfa\\_files/274620.pdf](https://www.humeau.com/media/blfa_files/274620.pdf).

99. Пирог Т. П., Антонюк М.М. Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум для студ. освітнього ступеня «Бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія». – К.: НУХТ, 2016. – с. 21-35.

100. Cuzon G., Naas T., Fortineau N., Nordmann P. Novel chromogenic medium for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of clinical microbiology*. 2008, 46(7): 2442-2444. doi: 10.1128/JCM.00492-08.

101. Hashem A. M., Gamal A. A., Mansour N. M., Salama B. M., Hassanein N. M., Awad G. E., Esawy M. A. Optimization of *Enterococcus faecalis* Esawy KR758759 dextranase and evaluation of some dextran bioactivities. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 2018, 15: 348-358. doi: 10.1016/j.bcab.2018.06.008.

102. Kiseleva E., Mikhailopulo K., Novik G. Modern immunochemical approaches in microbiology. *Microbial Resource Conservation*. 2018, P. 303–333. doi:10.1007/978-3-319-96971-8\_11

103. Иммуноферментный анализ (ИФА). [Электронный ресурс]. Режим доступа:

<https://nsau.edu.ru/images/vetfac/images/ebooks/microbiology/stu/immun/ifa.htm>

104. Імуноферментний аналіз. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3315/imunofermentnij-analiz>

105. Волков А. И., Жарений И. М. Большой химический справочник. – Мн.: Современная школа, 2005. – с. 522-539.

106. Федосенко Г. О., Скрипинець Ю. В., Леоненко І. І., Єгорова А. В., Кашуцький С. М., Антонович В. П. Вивчення залишкових кількостей глюкози на поверхнях фармацевтичного обладнання методами поляриметрії та ВЕРХ. *Фармацевтичний журнал*. 2015, 5: 83-89.

107. Mahdinia E., Demirci A., Berenjian A. Utilization of glucose-based medium and optimization of *Bacillus subtilis* natto growth parameters for vitamin K (menaquinone-7) production in biofilm reactors. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 2018, 13: 219-224.

108. Єфімов В., Тригуб І., Лісничка О. Визначення амінокислот в комбікормах методом обернено-фазової ВЕРХ шляхом дериватизації фенолізотіаціанатом. *Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*. 2014, 2(2): 62-67.

109. Lemoine A., Maya Martínez-Iturralde N., Spann R., Neubauer P., Junne S. Response of *Corynebacterium glutamicum* exposed to oscillating cultivation conditions in a two-and a novel three-compartment scale-down bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*. 2015, 112(6): 1220-1231. doi: 10.1002/bit.25543.

110. Yadav, M. K., Singh, B., & Tiwari, S. K. Comparative analysis of inhibition-based and indicator-independent colorimetric assay for screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2019, 11(2): 687-695. doi: 10.1007/s12602-018-9445-4

111. Мерлич А. Г., Галкін Б. М., Ліманська Н. В., Іваниця В. О., Галкин Б. Н., Іваниця В. А. Спектр активності бактеріюцина *Enterococcus italicus* w та його ефект на утворення біоплівки *Lactobacillus sakei*. *Клітинна, генетична та метаболічна інженерія*. 2016: 49.

112. Марчевський В. М., Гробовенко Я. В. Задача ефективного управління процесом отримання тонкодисперсного порошку діоксиду титану в ході вихрової сушки. *Automation of technological and business processes*. 2018, 10(3): 59-66.

113. Погружные термопреобразователи сопротивления ТСМУ-1088 и ТСПУ-1088 с выходом 4-20мА [Електроний ресурс]. Режим доступу: <http://maranta-electro.com.ua/ru/converters/rtd/tsmpu1088>

114. Датчик абсолютного и избыточного давления Cerabar S PMC71 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <http://www.pkimpex.ru/opisanie/datchik-davleniya-cerabar-s-pmc71>

115. LMK 331 врезной датчик уровня BD Sensors [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://geonorma.com.ua/p1188549-lmk-331-vreznoj.html>

116. Датчики pH EASYFERM PlusPlus, VP PlusK8 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <http://www.ecoinstrument.com.ua/proizvoditeli/hamilton/datchiki-ph-easyferm-plusplus-vp-plusk8/>

117. Преобразователи проводимости, рН, кислорода SI 792/794 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <http://www.ecoinstrument.com.ua/proizvoditeli/hach-lange/preobrazovateli-provodimosti-ph-kisloroda-si-792-794/>

118. Автоматизація та управління біотехнологічним виробництвом: Метод. рекомендації до виконання індивідуального завдання з дисципліни для студентів освітнього ступеня бакалавр за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» всіх форм навчання. /Уклад: І.Ельперін – К.: НУХТ, 2017. – с.

119. Ельперін І.В. Автоматизація виробничих процесів: підручник / І.В.Ельперін, О.М.Пупена, В.М.Сідлецький, С.М.Швед. – Вид. 2-ге виправлене – К.: Вид. Ліра-К, 2015. – 378 с.

120. Постанова Кабінету Міністрів України від 25 березня 1999 року № 465 про «Правила охорони поверхневих вод від забруднення зворотними водами».

121. Класифікація біофільтрів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://budmayster.info/2782-klasifikacya-bofltrv.html>

122. Відходи виробництва і споживання та їх вплив на ґрунти і природні води: Навчальний посібник / За ред. В.К. Хільчевського. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2007. – 152 с.

123. В.О. Красінько Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 143 с.

124. Патент России на изобретение № 2513401. Капельный биофильтр / Кочетов О.С., Стареева М.О., Стареева М.М. Опублик. 20.04.2014 Бюл. № 11.

125. Классификация микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://surl.li/hyys>

126. Біоконверсія органічних відходів: теорія і практика // М. С. Слободяник, К. О. Чеботько, Л. В. Войтенко, В. А. Копілевич, В. В. Жирнов, В. Є. Косматий. – Ніжин: Видавець ПП Лисенко М.М., 2015. – 87-88 с.

127. Руководство по обеспечению санитарии и охраны здоровья населения. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/guidelines-on-sanitation-and-health/ru/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/guidelines-on-sanitation-and-health/ru/)

128. Наказ Міністерства охорони навколишнього природного середовища України від 27 червня 2006 року № 309 про «Затвердження нормативів граничнодопустимих викидів забруднюючих речовин із стаціонарних джерел».

129. Закон України про «Охорону атмосферного повітря», чинна редакція від 16.10.2020.

130. Патент России на изобретение № 177440. Скруббер-абсорбер Вентури / Югай Ф. С., Ситдикова Ю.Р. Опублик.: 21.02.2018 Бюл. № 6

## Use of Synthetic Genes for Cloning, Production and Functional Expression of the Bacteriocins Enterocin A and Bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*

Juan J. Jiménez · Juan Borrero · Loreto Gútiéz · Sara Arbulu · Carmen Herranz · Luis M. Cintas · Pablo E. Hernández

© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** The use of synthetic genes may constitute a successful approach for the heterologous production and functional expression of bacterial antimicrobial peptides (bacteriocins) by recombinant yeasts. In this work, synthetic genes with adapted codon usage designed from the mature amino acid sequence of the bacteriocin enterocin A (EntA), produced by *Enterococcus faecium* T136, and the mature bacteriocin E 50-52 (BacE50-52), produced by *E. faecium* NRRL B-32746, were synthesized. The synthetic *entA* and *bacE50-52* were cloned into the protein expression vectors pPICZαA and pKLAC2 for transformation of derived vectors into *Pichia pastoris* X-33 and *Kluyveromyces lactis* GG799, respectively. The recombinant vectors were linearized and transformed into competent cells selecting for *P. pastoris* X-33EAS (*entA*), *P. pastoris* X-33BE50-52S (*bacE50-52*), *K. lactis* GG799EAS (*entA*), and *K. lactis* GG799BE50-52S (*bacE50-52*). *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS, but not *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S, showed antimicrobial activity in their supernatants. However, purification of the supernatants of the producer yeasts permitted recovery of the bacteriocins EntA and BacE50-52. Both purified bacteriocins were active against Gram-positive bacteria such as *Listeria monocytogenes* but not against Gram-negative bacteria, including *Campylobacter jejuni*.

J. J. Jiménez · J. Borrero · L. Gútiéz · S. Arbulu · C. Herranz · L. M. Cintas · P. E. Hernández (✉)  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain  
e-mail: eheman@vet.ucm.es

**Keywords** Synthetic genes · Bacteriocins · Enterocin A · Bacteriocin E 50-52 · Heterologous production · *Pichia pastoris* · *Kluyveromyces lactis*

### Introduction

The use of synthetic genes for production of proteins by heterologous microbial hosts may become a useful tool when the DNA sequence encoding the protein of interest is not available or difficult to obtain or when the producer species show a nonuniversal genetic code [1]. The optimization of gene sequences to enhance protein production is also important for industry applications when low-cost and large-scale production are demanded [2]. Furthermore, the replacement of native gene sequences with the preferred codon usage of the producer host cells can lead to significant increases in protein synthesis and overall protein yield [3]. The adaptation of codon usage for protein expression in yeasts appears to enhance protein production and secretion since translation efficiency and transport across the endoplasmic reticulum (ER) are favoured [2, 4].

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides secreted by bacteria, and those produced by lactic acid bacteria (LAB) attract considerable interest as natural and nontoxic food preservatives, for human and veterinary applications, and in the animal production field [5, 6]. Furthermore, among the LAB, the enterococci produce a diverse and heterogeneous group of bacteriocins, coined enterocins, which differ with respect to their antimicrobial activities, structures, processing, and secretion mechanisms [7]. Most bacteriocins, including enterocins, are synthesized as biologically inactive precursors or prepeptides containing an N-terminal extension. The mature peptides are often cationic, amphiphilic molecules of 20–60 amino

acid residues that are generally classified into two main classes: the lantibiotics or class I that consist of modified bacteriocins and the class II or nonmodified bacteriocins, which are further subdivided into class IIa or pediocin-like, strong antilisterial bacteriocins with the N-terminal consensus sequence YGNGVxC, class IIb or two-peptide bacteriocins, class IIc or cyclic bacteriocins, and the class II d consisting of linear nonpediocin-like one-peptide bacteriocins [8–10]. Additional subgroups have been suggested for leaderless peptides, circular bacteriocins, linear peptides derived from large proteins, and the glycosylated bacteriocins [11]. However, because enterocins may be produced by enterococcal species carrying antibiotic resistance genes or genes coding for potential virulence factors due to hygienic, safety, and biotechnological reasons, the production of enterocins in heterologous microbial hosts is being actively evaluated [5, 12].

The enterocin A (EntA) is a class IIa bacteriocin with two disulfide bridges whose synthesis is directed by a gene cassette that encodes the *entAIFKRTD* operon and from which *entA* encodes the enterocin A prepeptide synthesized as an 18 amino acid leader sequence and the 47 amino acid mature bacteriocin [13, 14]. Furthermore, the potent antilisterial activity of EntA has driven interest for its overproduction by heterologous hosts throughout fusion of mature EntA to signal peptides that acts as secretion signals [5, 15]. Several bacteriocins have been also identified from chicken commensal bacteria that are active against Gram-positive and Gram-negative bacteria, reduce *Campylobacter* colonization in poultry, and are being directed toward on-farm control of this foodborne human pathogen [16, 17]. In this context, the bacteriocin E 50-52 (BacE50-52) is also a class IIa, 39 amino acid mature bacteriocin, produced by *Enterococcus faecium* NRRL B-30746, capable of killing a wide variety of Gram-negative and Gram-positive pathogens under in vitro and in vivo conditions [18–21]. However, to our knowledge, the gene encoding this bacteriocin has not been yet sequenced. Accordingly, we report in this work the synthesis of *entA* and *bacE50-52* designed from the amino acid sequence of mature EntA and BacE50-52 and with adapted codon usage for expression by *P. pastoris* and *K. lactis*, their cloning into appropriate protein expression vectors, and the production and functional expression of EntA and BacE50-52 by recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 derivatives.

## Materials and Methods

### Microbial Strains, Plasmids, and Growth Conditions

The microbial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. The enterococci were grown in MRS

broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32 °C. *P. pastoris* X-33 (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) and *K. lactis* GG799 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) were cultured in the YPD medium (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) at 30 °C with shaking (200–250 rpm). *Escherichia coli* JM109 (Invitrogen S.A.) was grown in LB broth (Sigma-Aldrich) at 37 °C with shaking. *Pediococcus damnosus* CECT4797 was also grown in MRS broth (Oxoid) at 37 °C. All *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus* 4-03937 and *Streptococcus pneumoniae* FQ35, were cultured in BHI broth (Oxoid) at 37 °C. *Aeromonas salmonicida* LMG3776 and *Yersinia ruckeri* LMG3279 were grown in TSB (Oxoid) at 28 °C. *Vibrio campbellii* LMG21363 was grown in TSB supplemented with 1 % NaCl, at 28 °C. *Salmonella typhimurium* CECT443 was grown in TSB at 37 °C. *Campylobacter jejuni* ATCC33560 and *C. jejuni* NCTC11168 were grown in BHI broth (Oxoid) supplemented with 1 % defibrinated horse serum (BDBiosciences, San Jose, CA, USA) at 37 °C in micro-aerophilic conditions. *Clostridium perfringens* CECT821 was grown in RCM (Oxoid) at 37 °C in anaerobic conditions. *S. pneumoniae* FQ35 was grown at 37 °C on Blood Agar Plates (BAP) (Biomérieux S.A., Marcy l’Étoile, France). When necessary, zeocin (Invitrogen) and ampicillin (Sigma-Aldrich) were used at a concentration of 25 and 50 µg/ml, respectively. Cell dry weights of late exponential phase bacterial and yeast cultures, expressed as cell dry mass, were determined gravimetrically. All *Listeria* spp. were obtained from the CECT (Colección Española de Cultivo Tipo, Valencia, Spain), *S. aureus* 4-03937 was obtained from VISAVET (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain), and *S. pneumoniae* FQ35 was obtained from the SMRC (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain). Strains with the letters LMG were obtained from the Laboratorium voor Microbiologie (University of Ghent, Ghent, Belgium), those with ATCC from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), and those with NCTC from the National Collection of Type Cultures (London, UK).

### Basic Genetic Techniques and Enzymes

The known amino acid sequence of mature EntA, produced by *E. faecium* T136 [22] or *E. faecium* CTC492 [23] (GenBank n° X94181), and that of the BacE50-52, produced by *E. faecium* NRRL B-32746 [18] (GenBank n° P85148), were used as the amino acid sequences from which to design their preferred codon usage for production by *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799. The nucleotide sequence the *entA* and the *bacE50-52* synthetic genes contained a 5'-nucleotide appendix including a *Xho*I restriction site and a 3'-nucleotide appendix including the

**Table 1** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description <sup>a</sup>	Source and/or reference <sup>b</sup>
<b>Strains</b>		
<i>Enterococcus faecium</i>		
T136	Enterocin A and B producer; MPA and ADT indicator; Indicator strain	DNBTA; [22]
P13	Enterocin P producer; MPA and ADT indicator; Indicator strain	DNBTA; [49]
<i>Escherichia coli</i> JM109		
	Selection of recombinant plasmids	Promega
<i>P. pastoris</i> X-33	Yeast producer	Invitrogen Life Technologies
<i>K. lactis</i> GG799	Yeast producer	New England Biolabs
<b>Plasmids</b>		
pMA	Amp <sup>r</sup> ; pDFB36 derivative; <i>Plac-motA lacIq</i>	GeneArt
pPICZαA	Zeo <sup>r</sup> ; integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α factor prepropeptide and functional sites for the integration at the 5'AOX1 locus of <i>P. pastoris</i> X-33	Invitrogen Life Technologies
pKLAC2	Amp <sup>r</sup> ; integrative plasmid carrying the <i>Aspergillus nidulans</i> acetamidase gene ( <i>amdS</i> ), the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α factor prepropeptide and functional sites for the integration at the LAC4 locus of <i>K. lactis</i> GG799	New England Biolabs
pMAPEAS	Amp <sup>r</sup> ; pMA plasmid carrying the <i>entA</i> synthetic gen with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt
pMAKEAS	Amp <sup>r</sup> ; pMA plasmid carrying the <i>entA</i> synthetic gen with the <i>K. lactis</i> codon usage	GeneArt
pMAPBE50-52S	Amp <sup>r</sup> ; pMA plasmid carrying the <i>bacE50-52</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt
pMAKBE50-52S	Amp <sup>r</sup> ; pMA plasmid carrying the <i>bacE 50-52</i> synthetic gene with the <i>K. lactis</i> codon usage	GeneArt
pPICEAS	pPICZαA derivative carrying the PCR product KR-PEAS	This work
pPICBE50-52S	pPICZαA derivative carrying the PCR product KR-PBE50-52S	This work
pKLEAS	pKLAC2 derivative carrying the PCR product KR-KEAS	This work
pKLE50-52S	pKLAC2 derivative carrying the PCR product KR-KBE50-52S	This work

<sup>a</sup> ADT agar well diffusion test, MPA microtitre plate assay, Amp<sup>r</sup> ampicillin resistance, Kan<sup>r</sup> kanamycin resistance, Zeo<sup>r</sup> zeocin resistance

<sup>b</sup> DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain)

stop codon (TAA) and the *NotI* restriction site (Table 2). Both synthetic genes were supplied by GeneArt<sup>®</sup> (Life Technologies, Paisley, UK). DNA restriction enzymes were supplied by New England BioLabs. Ligations were performed with the T4 DNA ligase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). *E. coli* JM109 and *K. lactis* GG799 competent cells were transformed as described by the supplier. Competent *P. pastoris* X-33 cells were obtained as recommended by the supplier, and electroporation of competent cells was performed as previously described [24]. Electrocompetent cells were transformed with a Gene Pulser<sup>™</sup> and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### PCR Amplification and Nucleotide Sequencing

Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd., (Cambridge, UK). PCR amplifications were performed in 50 µl reaction mixtures containing 1 µl of purified

DNA, 70 pmol of each primer, and 1 U of Platinum<sup>®</sup> Pfx DNA Polymerase (Invitrogen S.A.) in a DNA thermal cycler Techgene (Techne, Cambridge, UK). The PCR-generated fragments were purified by a NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit (Macherey–Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) for cloning and nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of the purified PCR products was performed using the ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator cycle sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), at the Unidad de Genómica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain.

#### Cloning of the *entA* and *bacE50-52* Synthetic Genes in *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 and Antimicrobial Activity of the Transformants

The primers and inserts used for construction of the recombinant plasmids are listed in Table 2. Derivatives of

**Table 2** Primers and PCR products used in this study

Primer or PCR product	Nucleotide sequence (5'-3') or description	Amplification
<b>Primers</b>		
JPKE-F	GAGGTACCGAATTCTCGAGAAAAGAAC	KR-PEAS, KR-KEAS, KR-PBE50-52S, KR KBE50-52S
JPKE-R	AGCTCATAAGTTGCGGCCGCTATTTA	
<b>PCR products</b>		
KR-PEAS	195-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entA</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
KR-KEAS	195-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entA</i> gene with the <i>K. lactis</i> codon usage	
KR-PBE50S	165-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>bacE50-52</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
KR-KBE50S	165-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>bacE50-52</i> gene with the <i>K. lactis</i> codon usage	
<b>Bacteriocins</b>		
EntA (Amino acid sequence)	TTHSGKYNGVYCTKNKCTVDWAKATTCIAGMS IGGFLGGAIPGKC	
EntA ( <i>P. pastoris</i> codon usage)	actactcactccgtaagtactacgtaacgggtttactgactaagaacaagtg tactgttgactggcctaaggctactactgtatcctgctgatgccatcgggtg tttttgggtggtctatcccaggaagtgttaa	
EntA ( <i>K. lactis</i> codon usage)	actactcattccgtaagtactacgtaacgggtttactgactaagaacaag tgactgttgatggcctaaggctactactgtatgctgtatgctattggt ggtttctgggtggtctattccaggaagtgttaa	
BacE50-52 (Amino acid sequence)	TTKNYNGVNCNSVNWQCQGNVWASCNLTGCAAWLCKLA	
BacE50-52 ( <i>P. pastoris</i> codon usage)	actactaagaactacgtaacgggtttgcaactccgtaactggtgcaagtggg taacgtttggctctctgtaactggcactggttgctgctggtgtaaatggcttaa	
BacE50-52 ( <i>K. lactis</i> codon usage)	accactaagaactacgtaacgggtggtgtaactctgtaaatgggtgcaatggtg aacgtttggctctctgtaaatggcactggttgctgctggtggtgtaaatggcttaa	

plasmids pPICZ $\alpha$ A and pKLAC2 were constructed as follows: Primers JPKE-F and JPKE-R were used for PCR amplification from plasmids pMAPEAS, pMAKEAS, pMAPBE50-52S, and pMAKBE50-52S of the fragments KR-PEAS, KR-KEAS, KR-PBE50-52S, and KR-KBE50-52S, respectively, carrying the  $\alpha$ -factor Kex2 signal-protease cleavage site without the Glu-Ala spacer, fused to the synthetic *entA* and *bacE50-52* genes. Digestion of the above cited fragments with the *XhoI-NotI* restriction enzymes permitted ligation of the resulting 195- and 165-bp *XhoI-NotI*-cleavage fragments into pPICZ $\alpha$ A and pKLAC2, digested with the same enzymes, to generate the plasmid-derived vectors pPICEAS, pKLEAS, pPICBE50-52S, and pKLBE50-52S, respectively. Competent *E. coli* JM109 cells were transformed with the above cited vectors, and the resulting transformants were confirmed by PCR amplification and sequencing. Subsequently, the *SacI*-linearized pPICEAS and pPICBE50-52S vectors and the *SacII*-linearized pKLEAS and pKLBE50-52S plasmid

derivatives were used to transform *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799, respectively. The *P. pastoris* X-33EAS and *P. pastoris* X-33BE50S transformants were selected from YPD agar supplemented with zeocin (100 and 1,000  $\mu$ g/ml) and sorbitol (1 M). The *K. lactis* GG799EAS and *K. lactis* GG799BE50-52S transformants were selected on YCB (New England Biolabs) agar supplemented with Tris-HCl Buffer (30 mM) and acetamide (5 mM). Plates were incubated at 30 °C for 3–5 days. The presence of the integrated pPICEAS, pKLEAS, pPICBE50-52S, and pKLBE50-52S linearized plasmids in the genome of the transformed yeasts was confirmed by bacteriocinogenicity tests and sequencing of the inserts.

The antimicrobial activity of individual *P. pastoris* X-33EAS, *P. pastoris* X-33BE50-52S, *K. lactis* GG799EAS, and *K. lactis* GG799BE50-52S transformants was screened by a stab-on-agar-test (SOAT). Briefly, the *P. pastoris* X-33EAS and *P. pastoris* X-33BE50S transformants were streaked onto BMMY buffered methanol complex

medium (1 % yeast extract, 2 % peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6), 1.34 % yeast nitrogen base (YNB) without amino-acids,  $4 \times 10^{-5}$  % biotin, 0.5 % methanol) agar and grown at 30 °C to induce production of the bacteriocins. During the incubation period, methanol was added daily to the plates at 0.5 % (v/v) final concentration to maintain the induction. The *K. lactis* GG799EAS and *K. lactis* GG799BE50-52S transformants were streaked onto YPGal (1 % yeast extract, 2 % peptone, and 2 % galactose) agar. After incubation of the plates at 30 °C for 48 h, 40 ml of MRS soft-agar containing  $1 \times 10^5$  cfu/ml of the indicator microorganisms *E. faecium* P13 (EntA<sup>S</sup>) or *P. damnosus* CECT4797 (BacE50-52<sup>S</sup>) was added to the plates that were incubated at 30 °C overnight.

To determine the growth of the recombinant yeasts and the antimicrobial activity of their supernatants, the *P. pastoris* X-33EAS bacteriocin producers were grown in the buffered glycerol complex medium BMGY (1 % yeast extract, 2 % peptone, 100 mM potassium phosphate [pH 6], 1.34 % YNB without amino-acids,  $4 \times 10^{-5}$  % biotin, 1 % glycerol) at 30 °C, until an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of approximately 2–6 was reached. Cells were then harvested by centrifugation ( $5,000 \times g$  at 4 °C for 10 min) and resuspended to an OD<sub>600</sub> of 1 in the BMMY medium. Similarly, the *K. lactis* GG799EAS selected clones were grown in the YPD medium until an OD<sub>600</sub> of approximately 2–6 was reached. Cells were then harvested by centrifugation ( $5,000 \times g$  at 4 °C for 10 min), washed with YPGal (1 % yeast extract, 2 % peptone, and 2 % galactose), and resuspended to an OD<sub>600</sub> of 1 in fresh YPGal medium. The *P. pastoris* and *K. lactis* cultures were incubated at 30 °C for 36 h with shaking (250 rpm). During growth, samples were collected periodically for determination of their OD<sub>600</sub>, bacteriocin production, and the antimicrobial activity of their supernatants by an agar well diffusion test (ADT) and a microtiter plate assay (MPA) [12], using *E. faecium* P13 (EntA<sup>S</sup>) as the indicator microorganism. With the MPA, growth inhibition of the sensitive culture was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtitre Labsystems iEMS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50 % growth inhibition (50 % of the turbidity of the control culture without bacteriocin).

#### ELISA for Quantification of the Production of EntA

Rabbit polyclonal antibodies with predetermined specificity for EntA and a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA) were used to detect and quantify EntA in the supernatants of the producer cells [5]. Briefly, wells of flat-bottom polystyrene microtitre plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated

overnight (4 °C) with supernatants from *E. faecium* T136 and the EntA-producing yeasts. After addition of the anti-EntA antibodies and the goat anti-rabbit immunoglobulin G peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, PA, USA), bound peroxidase was determined with ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (Sigma-Aldrich) as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader (Labsystems) with a built-in software package for data analysis.

#### Purification of the Bacteriocins EntA and BacE50-52, and Mass Spectrometry Analysis

EntA was purified from *E. faecium* T136, *P. pastoris* X-33EAS, and *K. lactis* GG799EAS, while bacteriocin BacE50-52 was purified from *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S, using a previously described procedure [12, 25]. Briefly, supernatants from early stationary phase 1-L cultures of *E. faecium* T136 and 0.5-L of the recombinant yeasts were precipitated with ammonium sulfate, desalted by gel filtration, and subjected to cation exchange and hydrophobic-interaction chromatography, followed by reverse-phase chromatography in a fast-protein liquid chromatography system (RP-FPLC) (GE Healthcare, Barcelona, Spain). Purified fractions were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, as previously described [12]. The antimicrobial activity of the purified bacteriocins was evaluated against *P. damnosus* CECT4797 (EntA<sup>S</sup> and BacE50-52<sup>S</sup>) but also against *Listeria* spp. and other Gram-positive and Gram-negative microorganisms, using the MPA.

## Results

#### Heterologous Production and Functional Expression of EntA and BacE50-52 by Recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799

The cloning of PCR-amplified fragments with the synthetic mature *entA* or *bacE50-52* into the protein expression vectors pPICZαA and pKLAC2 resulted in the recombinant plasmids listed in Table 1. Similarly, transformation of the linearized plasmids into competent yeasts permitted isolation of the *P. pastoris* X-33EAS (*entA*), *P. pastoris* X-33BE50-52S (*bacE50-52*), *K. lactis* GG799EAS (*entA*), and *K. lactis* GG799BE50-52S (*bacE50-52*) recombinant yeasts. *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS were selected according to their high antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 by the SOAT. However, *P. pastoris* X-33BE50-52S did not show antimicrobial

**Table 3** Production and antimicrobial activity of the EntA from supernatants of *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS

Strain	Incubation time (h)	OD <sub>600</sub> <sup>a</sup>	EntA production (µg EntA/ml) <sup>b</sup>	Antimicrobial activity (BU/ml) <sup>c</sup>	Specific antimicrobial activity (BU/µg EntA) <sup>d</sup>
<i>P. pastoris</i> X-33EAS	0	1.0	ND	NA	NE
	2	1.6	1.4	40	28
	4	1.9	6.2	8,372	1,350
	6	3.4	17.2	33,684	1,958
	8	6.5	22.1	43,692	1,970
	10	7.2	24.3	77,418	3,185
	12	8.9	32.1	136,000	4,236
	24	9.0	29.7	70,506	2,374
	36	8.8	28.2	43,715	1,551
	48	9.8	19.2	19,216	1,001
<i>K. lactis</i> GG799EAS	0	1	ND	NA	NE
	2	2	0.3	18	60
	4	4.8	0.6	90	150
	6	6.7	1.0	94	94
	8	8.4	1.8	9	5
	10	8.7	1.7	8	4
	12	10.1	0.4	NA	NE
	24	9.1	ND	NA	NE
	36	9.4	ND	NA	NE
	48	8.5	ND	NA	NE
<i>E. faecium</i> T136 <sup>e</sup>	16	0.9	1.5	577	385

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate

<sup>a</sup> OD<sub>600</sub>, optical density of the culture at 600 nm

<sup>b</sup> Production of EntA was calculated by using an NCI-ELISA with polyclonal antibodies specific for EntA. ND no detected

<sup>c</sup> Calculated by MPA against *E. faecium* P13 (EntA<sup>+</sup>). BU bacteriocin units, NA no activity

<sup>d</sup> Calculated as the antimicrobial activity against *E. faecium* P13 divided by the EntA produced. NE not evaluable

<sup>e</sup> Cultures of *E. faecium* T136 were used as controls for EntA production and antimicrobial activity

activity against any of the indicator bacteria tested and was selected for its high zeocin resistance (1,000 µg/ml). Similarly, *K. lactis* GG799BE50-52S did not show a direct antimicrobial activity but was also selected for further studies. Colonies of *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 transformed with the linearized control plasmids without inserts were used as bacteriocin-negative controls to discard the possibility that the antimicrobial activity exerted by the recombinant hosts was due to metabolites other than bacteriocins.

The production and functional expression of EntA by *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS was quantified by specific anti-EntA antibodies in a NCI-ELISA and a microtitre plate assay (MPA), respectively. The largest production of EntA by *P. pastoris* X-33EAS was 21.4-fold higher, its antimicrobial activity was 235-fold higher, and its specific antimicrobial activity was 11-fold higher than that of the EntA from the supernatants of *E. faecium* T136 (Table 3). However, the production of EntA by *K. lactis*

GG799EAS was 1.2-fold higher, but its antimicrobial activity and specific antimicrobial activities were 2.5- to 6.1-times lower than that of the EntA produced by *E. faecium* T136 (Table 3).

#### Purification of the Bacteriocins EntA and BacE50-52, and Mass Spectrometry Analysis

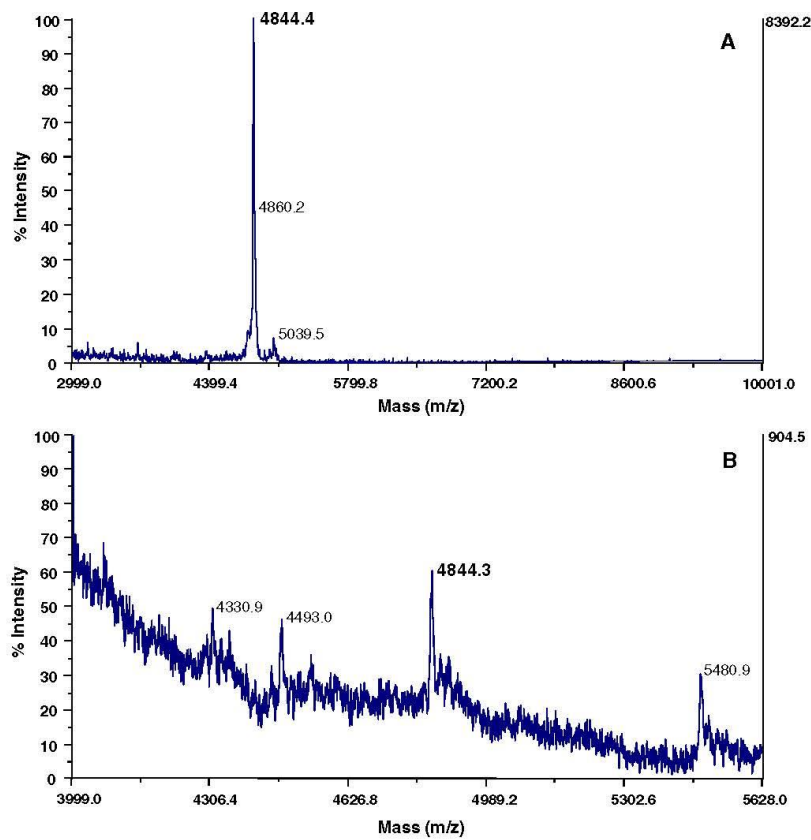
The EntA produced by *E. faecium* P13, *P. pastoris* X-33EAS, and *K. lactis* GG799EAS was purified to homogeneity (results not shown). The BacE50-52, produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S, was also purified, although only eluted fractions after the gel filtration step showed antimicrobial activity. Furthermore, purified fractions from the *K. lactis* GG799BE50-52S supernatants showed a higher antimicrobial activity than those from *P. pastoris* X-33BE50-52S (Table 4). MALDI-TOF MS analysis of the purified EntA from *P. pastoris* X-33EAS showed a major dominant signal of

**Table 4** Antimicrobial activity of fractions generated during purification of the BacE50-52 produced by the recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 derivatives

Strain	Antimicrobial activity (BU/ml) of the purified fractions <sup>a</sup>					
	SN	AS	GF	SE	OE	RP-FPLC
<i>Pichia pastoris</i>						
X-33BE50-52S	NA	NA	35,680	9,643	173,453	316,977
<i>Kluyveromyces lactis</i>						
GG799BE50-52S	NA	NA	74,568	40,211	174,682	714,621

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate

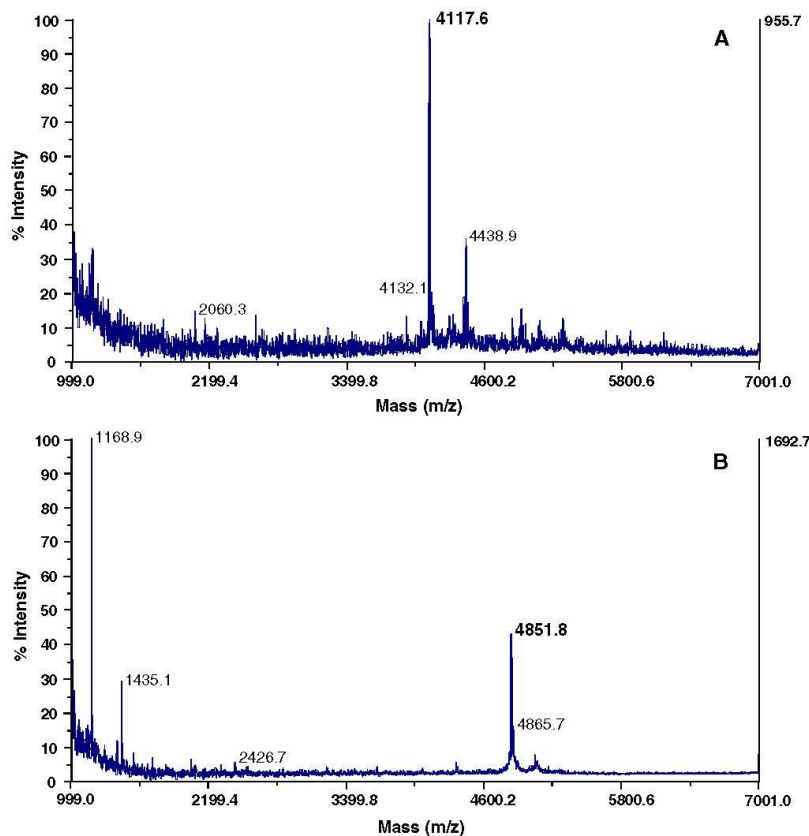
<sup>a</sup> Antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797. BU, bacteriocin units. NA, no activity. Purification fraction abbreviations as: SN supernatant, AS ammonium sulfate precipitation, GF gel filtration, SE Sepharose fast flow eluate, OE octyl Sepharose eluate, RP-FPLC reversed-phase eluate



**Fig. 1** Mass spectrometry analysis of purified enterocin A from *P. pastoris* X-33EAS (a) and *K. lactis* GG799EAS (b). Numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments

4,844.4 Da. However, the EntA purified from *K. lactis* GG799EAS showed a major peptide peak of 4,844.3 Da and peptide fragments of major and minor molecular mass (Fig. 1). Similarly, MALDI-TOF MS of the purified

BacE50-52 produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S showed major peaks of 4,117.6 and 4,438.9 Da, respectively, while the purified BacE50-52 from *K. lactis* GG799BE50-52S showed a major peptide fragment of 4,851.8 Da (Fig. 2).



**Fig. 2** Mass spectrometry analysis of purified bacteriocin E 50-52 from *P. pastoris* X-33E50-52S (a) and *K. lactis* GG799E50-52S (b). Numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments

#### Antimicrobial Activity of the Purified EntA and BacE50-52 Against *Listeria* spp. and Other Selected Bacteria

The purified EntA and BacE50-52 were evaluated for their antimicrobial activity against *L. ivanovii*, *L. grayii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, and six *L. monocytogenes* strains. All purified bacteriocins showed antagonistic activity against *Listeria* spp. The purified EntA produced by *P. pastoris* X-33EAS showed a 3.7- to 603-fold higher antilisterial activity than the EntA purified from *E. faecium* T136 and a 568- to 3,741-fold higher antilisterial activity than the EntA produced by *K. lactis* GG799EAS (Table 5). The purified BacE50-52 produced by *K. lactis* GG799BE-50-52S showed a 5.7- to 28.1-fold higher antilisterial activity than the BacE50-52 produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S, although their antilisterial activities were

90- to  $3.4 \times 10^4$ -times lower than the purified EntA produced by *P. pastoris* X-33EAS (Table 5). However, none of the purified EntA and BacE50-52 bacteriocins showed antimicrobial activity against *S. aureus* 4-03937, *C. perfringens* CECT821, *S. pneumoniae* FQ35, *E. coli* JM109, *S. typhimurium* CECT443, *A. salmonicida* LMG3776, *V. campbellii* LMG21363, *Y. ruckeri* LMG3279, *C. jejuni* ATCC33560, and *C. jejuni* NCTC11168.

#### Discussion

With the emergence of bacterial antibiotic resistance and emerging bacterial pathogens, bacteriocins produced by LAB may find their use as natural antimicrobial peptides in food, medical, veterinary, and animal production applications. However, the high cost of synthetic bacteriocin

**Table 5** Antimicrobial activity<sup>a</sup> of the purified EntA and BacE50-52 produced by the recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 derivatives against *Listeria* spp<sup>b</sup>

Strain	<i>L.</i>	<i>L.</i>	<i>L.</i>	<i>L.</i>	<i>L.</i>	<i>L. monocytogenes</i>					
	<i>ivanovii</i>	<i>grayii</i>	<i>welshimeri</i>	<i>seeligeri</i>	<i>innocua</i>	911	935	936	939	4,031	4,032
<i>Pichia pastoris</i>											
X-33EAS	2,027,800	103,900	134,300	1,405,600	48,330	122,800	35,500	195,000	493,000	371,200	204,700
X-33BE50-52S	58	41	41	75	8	8	8	33	41	33	16
<i>Kluyveromyces lactis</i>											
GG799EAS	542	86	114	271	42	71	42	343	503	343	171
GG799BE50-52S	1,312	1,156	935	980	213	176	149	441	236	435	237
<i>Enterococcus faecium</i>											
T136 <sup>c</sup>	185,400	27,550	4,940	2,330	2,760	640	410	5,030	3,130	4,380	8,940

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate

<sup>a</sup> Antimicrobial activity in BU/ $\mu$ g purified bacteriocin (EntA or BacE50-52). NA, no activity

<sup>b</sup> All *Listeria* spp. were obtained from the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain)

<sup>c</sup> Culture of *E. faecium* T136 used as control for the antimicrobial activity of its purified EntA

synthesis, their low yields, and the production of potential virulence factors from many natural producers drive the exploration of microbial systems for the biotechnological production of bacteriocins by heterologous LAB and yeasts [5, 15].

A number of yeast platforms have been used for the heterologous production of peptides and proteins, including bacteriocins [15, 26, 27]. Furthermore, while synthetic genes encoding the bacteriocin divercin RV41 and the hybrid bacteriocin Ent35-MccV have been evaluated for its expression by recombinant bacterial hosts [28, 29], the use of synthetic bacteriocin genes has not been yet sufficiently explored for their expression by recombinant yeasts. In this work, the pPICZ $\alpha$ A and pKLAC2 protein expression vectors containing the (1) strong and inducible P<sub>AOX1</sub> and P<sub>LAC4</sub> promoters, respectively, (2) the *S. cerevisiae* gene region encoding the mating pheromone  $\alpha$ -factor-1 secretion signal (MF $\alpha$ 1<sub>s</sub>) and the Kex2 signal cleavage site for processing of fusion proteins during MF $\alpha$ 1<sub>s</sub>-directed secretion through the Sec-dependent system, and a (3) host homologous gene which drives the integration of the linearized vectors into the yeast genome stabilizing foreign protein [30, 31] have been used to drive the expression of synthetic genes encoding the mature bacteriocins EntA and BacE50-52 by recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 derivatives.

Initial experiences with recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 determined that yeasts encoding EntA but, not those encoding BacE50-52, showed antimicrobial activity by the SOAT. A number of factors including copy number integration of the protein expression vectors in the yeast DNA, mRNA stability, and coordination of the rates of protein synthesis, folding and translocation of the

produced bacteriocin may affect production of foreign peptides by heterologous yeasts [15]. The amino acid sequence following the secretion signal and the nature of the cleavage site for processing and secretion by bacterial and yeast Sec-dependent systems may also interfere with the secretion of fused proteins through membranes [32]. Although EntA holds the TTHSGKY amino acid sequence before the YGNGVxC consensus sequence of the class IIa bacteriocins, and BacE50-52 holds the TTKN amino acid sequence before its YGNGVC consensus like sequence, it may happen that the charged K<sup>+</sup> residue of BacE50-52 limits its processing and secretion out of the recombinant yeast cells. It is known that bacteriocins cloned in *S. cerevisiae* [33–35], *P. pastoris* [15, 24, 36–38], and *K. lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans* [15] have been produced by these recombinant yeasts with variable success regarding its secretion and functional expression.

In this work, the production of EntA by *P. pastoris* X-33EAS was 21.4-fold higher than by *E. faecium* T136. However, the production of EntA by *K. lactis* GG799EAS was lower than expected (Table 3). The different production of EntA by recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 may be due to promoter differences, to the dosages of *entA* in their genomes, and/or to differences in the genetic backgrounds of the two strains. The decrease in EntA in the supernatants of *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS during induction and growth in their production medium may be ascribed to, among other factors, the attachment of EntA to cell walls, the formation of aggregates, and/or to subtle proteolytic degradation [15]. The antimicrobial activity of the EntA produced by *P. pastoris* X-33EAS was 235-fold higher and its specific

antimicrobial activity 11-fold higher than the produced by *E. faecium* T136. However, the antimicrobial activity and the specific antimicrobial activity of the EntA produced by *K. lactis* GG799EAS was 2.5–6.1-times lower, respectively, than the EntA produced by *E. faecium* T136 (Table 3).

Recombinant *P. pastoris* X-33 encoding the synthetic mature *entA* with the codon usage for expression by *P. pastoris*, as shown in this work, or encoding the mature *entA* from *E. faecium* T136 [15] secrete in their supernatants a 21.4- to 30-fold higher amounts of EntA with a 235- to 430-fold higher antimicrobial activity and a 11- to 14-fold higher specific antimicrobial activity than the EntA produced by *E. faecium* T136. Slightly higher amounts of EntA of higher antimicrobial activity were produced by recombinant *P. pastoris* encoding the *entA* from *E. faecium* T136 than the synthetic *entA* used in this work. Thus, although gene sequences with the preferred codon usage of the producer cells can lead to increases in protein synthesis, other factors such as *entA* copy number and/or yeast growth rates may affect the amount and antimicrobial activity of the produced EntA. Recombinant LAB, heterologous producers of EntA, also show a higher production of EntA (1.5- to 18.5-fold) and a higher antimicrobial activity (1.5- to 6.6-fold) than that of *E. faecium* T136, but the specific antimicrobial activity of the secreted EntA is lower than deduced from its production [5, 39]. Other recombinant LAB, heterologous producers of enterocin P (EntP), hiracin JM78 (HirJM79), and pediocin PA-1 (Peda-1), also showed a higher production and antimicrobial activity of these bacteriocins, although their specific antimicrobial activities differed from that produced by the original LAB producers [12, 37, 40, 41]. Accordingly, *P. pastoris* X-33EAS and *P. pastoris* X-33EA, overproducers of EntA and with higher antimicrobial and specific antimicrobial activities than the EntA produced by *E. faecium* T136, would be considered as appropriate cell factories and an alternative to LAB for production of EntA of higher antimicrobial and specific antimicrobial activities, providing a means by which the potential benefits of this bacteriocin could be exploited in diverse biotechnological applications.

The bacteriocins produced by recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 were also purified to homogeneity. All purified fractions from yeasts producing EntA showed antagonistic activity (results not shown), while antimicrobial activity was only observed after purification of the supernatants of *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG700BE50-52S, encoding *bacE50-52*, by gel filtration (Table 4). While interesting, this was not an unexpected observation since purification of the circular garvicin ML, produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, showed a higher antibacterial activity and a broader

antimicrobial spectrum as it was increasingly purified [42]. MALDI-TOF MS analysis of the EntA produced by *P. pastoris* X-33EAS showed a major peptide fraction of identical molecular mass (4,844.4 Da) than the EntA produced by *E. faecium* T136 [5]. The peptide fragment of 4,860.2 Da may correspond to oxidation (+16 Da) of the methionine residue (Met<sup>33</sup>) of the EntA to methionine sulfoxide (MetSO) (Fig. 1). The oxidation of methionine residues during production and purification of EntA by recombinant LAB is common [5, 39]. However, the purified EntA from *K. lactis* GG799EAS gave not only a peptide fragment with a molecular mass (4,844.3 Da) identical to the EntA produced by *E. faecium* T136, but also other peptide fragments of minor (4,330.9 Da; 4,993.0 Da) and major (5,480.9 Da) molecular mass (Fig. 1). It is possible that synthetic *entA*, cloned in *K. lactis* GG799EAS, may produce incorrectly folded EntA thus affecting the processing, transport, and functional expression of the synthesized EntA [43]. The lower production of EntA by *K. lactis* GG799EAS and the presence of purified peptide fragments of different molecular mass may also suggest the existence of truncated EntA fractions, the interaction of the bacteriocin with unknown biological compounds [36] or the EntA being subject to post-translational modifications (PTM). The presence of four cysteine residues and one methionine residue in the EntA would permit the formation of correct disulfide bridges but also the oxidation of these residues and the covalent attachment of different compounds to cysteine. Cysteine is susceptible to chemical modifications such as glutathionylation and cysteinylation. Glycosylation is also a common post-translational modification in eukaryotes involving linkage via the N-X-S/T amino acid sequence (N-glycosylation) or the side chain of serine and threonine (O-glycosylation) [44]. The absence in EntA of attachment sites for N-linkages precludes their N-glycosylation, but the presence of six threonines and two serines makes the EntA suitable for O-glycosylation.

MALDI-TOF MS analysis of the purified BacE50-52, produced by *P. pastoris* X-33BE50-52, showed a major peptide fragment of 4,117.6 Da, identical to the theoretical 4,125.7 Da molecular mass of mature BacE50-52 assuming the existence of three disulfide bonds linking the six cysteine residues of its amino acid sequence. However, the presence of peptide sequences of higher (4,438.9 Da) molecular mass was also observed. On the other hand, the purified BacE50-52, produced by *K. lactis* GG799BE50-52, showed a peptide fragment of a higher molecular mass (4,851.8 Da) than expected for mature BacE50-52 (Fig. 2). The presence of six cysteine residues in BacE50-52 would facilitate the formation of correct disulfide bridges but also permit its oxidation, glutathionylation, and cysteinylation. The absence in BacE50-52 of attachment sites for

N-linkages precludes its N-glycosylation, but the presence of three threonines and two serines makes the bacteriocin sensitive to O-glycosylation.

The purified EntA and BacE50-52 showed antimicrobial activity against *Listeria* spp. with purified EntA, produced by *P. pastoris* X-33EAS, as the most active antilisterial bacteriocin (Table 5). It has been speculated that the lower specific antimicrobial activity of bacteriocins produced by heterologous LAB may be due, among other factors, to deficiencies in disulfide bond (DSB) formation, a conserved mechanism for stabilizing extracytoplasmic proteins carried out by thiol-disulfide reductases [15]. The EntA has two DSB that appear to improve its antimicrobial activity [45]. However, an advantage of yeasts over bacterial systems is that yeasts may perform post-translational modifications, such as DSB formation and protein folding, more efficiently [46]. The highest antilisterial activity of the purified EntA, produced by *P. pastoris* X-33EAS, as compared to that of the EntA produced by *K. lactis* GG799EAS and *E. faecium* T136, further reinforces the role of this recombinant yeast as a potential cell factory for the heterologous overproduction, recovery, and purification of EntA as a natural antimicrobial agent in potential food, medical, veterinary, and animal production applications. The lower antilisterial activity of the EntA purified from *K. lactis* GG799EAS could be ascribed to its lower production by the recombinant yeast (Table 3), the existence of truncated bacteriocin forms, and the existence of post-translational modifications that would be the subject of future investigations (Fig. 1).

The antilisterial activity of the purified BacE50-52, produced by *K. lactis* GG799BE50-52S, was 5.7- to 28.1-fold higher than that produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S, but 90- to 1,545-times lower than the antilisterial activity of the EntA produced by *P. pastoris* X-33EAS (Table 5). Differences in susceptibility of *L. monocytogenes* strains to class IIa bacteriocins have been previously noted [47]. But in order to be active, bacteriocins need to recognize a target molecule at the surface of sensitive cells, and the target receptor for class IIa or pediocin-like bacteriocins has been identified as proteins of the sugar transporter mannose phosphotransferase system (Man-PTS) [11, 48]. Interestingly, Man-PTS are not found in eukaryotes. Moreover, class IIa bacteriocins seem to target specifically a phylogenetically defined subgroup of Man-PTS that exclusively contain members of the Gram-positive Firmicutes with the most potent receptors being those found in *Listeria* spp. and *Enterococcus* spp. [11]. However, misfolding of secreted bacteriocins and extensive PTMs may be responsible of the lower antilisterial activity of the EntA produced by *K. lactis* GG799EAS, and the BacE50-52 produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S.

However, none of the purified EntA and BacE50-52 showed antimicrobial activity against *S. aureus* 4-03937, *C. perfringens* CECT821, *S. pneumoniae* FQ35, *E. coli* JM109, *S. typhimurium* CECT443, *A. salmonicida* LMG3776, *V. campbellii* LMG21363, *Y. ruckeri* LMG3279, *C. jejuni* ATCC33560, and *C. jejuni* NCTC11168. While the EntA produced by *E. faecium* strains of diverse origins shows a high antilisterial activity with no activity against Gram-positive bacteria [23, 25], the BacE50-52 produced by *E. faecium* B-30746 showed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Campylobacter* spp. [18, 19]. It has been also reported that purified BacE50-52 from *E. faecium* B-30746 showed a molecular mass of 3,339.7 Da which is in contrast with its predicted molecular mass of 4,125 Da [18]. However, the purified BacE50-52 from *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S did not show a peptide fragment of the molecular mass as that produced by *E. faecium* B-30746. It may happen that still unknown modifications of purified BacE50-52 and the presence of nonreported synergistic compounds or specialized outer membrane transporters would be required for BacE50-52 to reach sensitive Gram-negative bacterial receptors. Uncorrect disulfide bond formation, misfolding of the secreted bacteriocin and extensive PTMs, may be also responsible for the non-detected antimicrobial activity of the purified BacE50-52 against the evaluated Gram-negative bacteria.

As reported in this study, *P. pastoris* X-33EAS producer of EntA from a codon usage adapted synthetic mature *entA* significantly increases the production, antimicrobial activity, and specific antimicrobial activity of EntA in the absence of dedicated immunity and secretion proteins, as compared to that of recombinant LAB heterologous producers of EntA from PCR-amplified *entA* encoded by enterococci. These results also contrast with the lower production and antimicrobial activity of the EntA produced by *K. lactis* GG799EAS, and with the low antimicrobial activity of the BacE50-52, produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S. Moreover, since the effectiveness of yeast expression systems for production, recovery, and functional expression of bacteriocins from synthetic bacteriocin genes is difficult to predict, further efforts should be performed for a more efficient genetically engineered production and functional expression of other synthetic bacteriocin genes, their quimeras or hybrid antimicrobial peptides by heterologous producer yeasts.

**Acknowledgments** This work was partially supported by projects AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and AGL2009-08348 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), by project GR35-10A from the Banco de Santander Central Hispano-Universidad Complutense de Madrid

(BSCH-UCM), and by project S2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (CAM). J.J. Jiménez and S. Arbulu are recipient of fellowships (FPI) from the MICINN. J. Borrero held a research contract from the CAM, and L. Gútierez holds a fellowship (FPU) from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain.

## References

- Denis-Quanquin, S., Lamouroux, L., Lougarre, A., Mahéo, S., Saves, I., Paquereau, L., et al. (2007). Protein expression from synthetic genes: Selection of clones using GFP. *Journal of Biotechnology*, *131*, 223–230.
- Gao, Z., Li, Z., Zhang, Y., Huang, H., Li, M., Zhou, L., et al. (2012). High-level expression of the *Penicillium notatum* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* using codon usage optimization. *Biotechnology Letters*, *34*, 507–514.
- Öberg, F., Sjöhmán, J., Conner, M. T., Bill, R. M., & Hedfalk, K. (2011). Improving recombinant eukaryotic membrane protein yields in *Pichia pastoris*: The importance of codon optimization and clone selection. *Molecular Membrane Biology*, *28*, 398–411.
- Ward, N. J., Buckley, S. M., Waddington, S. N., Van den Driessche, T., Chuah, M. K., Nathwani, A. C., et al. (2011). Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high level expression. *Blood*, *117*, 798.
- Borrero, J., Jiménez, J. J., Gútierez, L., Herranz, C., Cintas, L. M., & Hernández, P. E. (2011). Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, *156*, 76–86.
- Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2011). Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *12*, 1205–1220.
- Franz, C. M., van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*, *31*, 293–310.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, *3*, 777–788.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*, 564–582.
- Nes, I. F., Yoon, S. S., & Diep, D. B. (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. *Food Science and Biotechnology*, *16*, 675–690.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D. J., Holo, H., Cintas, L. M., et al. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from gram-positive bacteria. *Microbiology*, *157*, 3256–3267.
- Gutiérrez, J., Larsen, R., Cintas, L. M., Kok, J., & Hernández, P. E. (2006). High-level heterologous production and functional expression of the *sec*-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*, 41–51.
- Nilsen, T., Nes, I. F., & Holo, H. (1998). An exported inducer regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *Journal of Bacteriology*, *180*, 1848–1854.
- O’Keefe, T., Hill, C., & Ross, R. P. (1999). Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Applied and Environment Microbiology*, *65*, 1506–1515.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J. J., Böer, E., Gútierez, L., Herranz, C., et al. (2012). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxida adenivorans*. *Applied and Environment Microbiology*, *78*, 5956–5961.
- Hoang, K. V., Stern, N. J., & Lin, J. (2011). Development and stability of bacteriocin resistance in *Campylobacter* spp. *Journal of Applied Microbiology*, *111*, 1544–1550.
- Messaoudi, S., Kergourlay, G., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Ferchichi, M., Prevost, H., et al. (2012). Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiology*, *32*, 129–134.
- Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Pereygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Borzenkov, V. N., et al. (2008). Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 1942–1948.
- Svetoch, E. A., Levchuk, V. P., Pokhilenko, V. D., Eruslanov, B. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., et al. (2008). Inactivating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogens by use of bacteriocins OR-7 and E 50-52. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*, 3863–3865.
- Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Kovalev, Y. N., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Levchuk, V. P., et al. (2009). Antimicrobial activities of bacteriocins E 50-52 and B 602 against antibiotic-resistant strains involved in nosocomial infections. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *1*, 136–142.
- Svetoch, E. A., & Stern, N. J. (2010). Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry—A review. *Poultry Science*, *89*, 1763–1768.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernández, P. E., & Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, *143*, 2287–2294.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M., & Nes, I. F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin-family of bacteriocins. *Applied and Environment Microbiology*, *62*, 1676–1682.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Martín, M., Herranz, C., Cintas, L. M., & Hernández, P. E. (2005). Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*, 3004–3008.
- Sánchez, J., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cintas, L. M., & Hernández, P. E. (2007). Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a *Sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiology Letters*, *270*, 227–236.
- van Ooyen, A. J. J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M. M. A., Jacobs, D. I., Colussi, P. A., et al. (2006). Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, *6*, 381–392.
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G., & Gellissen, G. (2007). Yeast expression platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*, 513–523.
- Richard, C., Drider, D., Elmorjani, K., Marion, D., & Prevost, H. (2004). Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *186*, 4276–4284.
- Acuña, L., Picariello, G., Sesma, F., Morero, R. D., & Bellomio, A. (2012). A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays

- antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEBS Open Bio*, 2, 12–19.
30. Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16, 23–52.
  31. Colussi, P. A., & Taron, C. H. (2005). *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Applied and Environment Microbiology*, 71, 7092–7098.
  32. Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, D., & Langella, P. (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 180, 1895–1903.
  33. Schoeman, H., Vivier, M. A., du Toit, M., Dicks, L. M. T., & Pretorius, I. S. (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15, 647–656.
  34. van Reenen, C. A., Chikindas, M. L., van Zyl, W. H., & Dicks, L. M. T. (2002). Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 29–40.
  35. Basanta, A., Herranz, C., Gutiérrez, J., Criado, R., Hernández, P. E., & Cintas, L. M. (2009). Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting the leaderless enterocin L50 peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50. *Applied and Environment Microbiology*, 75, 2382–2392.
  36. Beaulieu, L., Groleau, D., Míguez, C. B., Jetté, J. F., Aomari, H., & Subirade, M. (2005). Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expression and Purification*, 43, 111–125.
  37. Sánchez, J., Borrero, J., Gómez-Sala, B., Basanta, A., Herranz, C., Cintas, L. M., et al. (2008). Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae*, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Applied and Environment Microbiology*, 74, 2471–2479.
  38. Basanta, A., Gómez-Sala, B., Sánchez, J., Dzung, B. D., Herranz, C., Hernández, P. E., et al. (2010). Use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. *Applied and Environment Microbiology*, 76, 3314–3324.
  39. Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L. M., & Hernández, P. E. (2007). Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *Journal of Food Protection*, 70, 2792–2798.
  40. Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L. M., & Hernández, P. E. (2007). Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 667–675.
  41. Borrero, J., Jiménez, J. J., Gutiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L. M., & Hernández, P. E. (2011). Use of the *usp45* lactococcal secretion sequence signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 131–143.
  42. Borrero, J., Brede, D. A., Skaugen, M., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., et al. (2011). Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Applied and Environment Microbiology*, 77, 369–373.
  43. Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., et al. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: A host comparative overview. *Microbial Cell Factories*, 4, 7–11.
  44. Zhao, Y., & Jensen, O. N. (2009). Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics*, 9, 4362–4641.
  45. Eijsink, V. G. H., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B., & Nes, I. F. (1998). Comparative studies of class II bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environment Microbiology*, 64, 3275–3281.
  46. Zerbs, S., Frank, A. M., & Collart, F. R. (2009). Bacterial systems for production of heterologous proteins. *Methods in Enzymology*, 463, 149–168.
  47. Katla, T., Naterstad, K., Vancanneyt, M., Swings, J., & Axelsson, L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1, and nisin. *Applied and Environment Microbiology*, 69, 4431–4437.
  48. Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., & Nes, I. F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 2384–2389.
  49. Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Hernández, P. E., & Nes, I. F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environment Microbiology*, 63, 4321–4330.

## Biochemical characterization and identification of enterocins produced by *E. hirae* And *E. faecalis*

Zia H. Khan\* and J.H.Anandani  
 Department of Biochemistry, Shri Shivaji College, Akola

### ABSTRACT

The present study was an endeavour to partially purify and characterize enterocins produced by *E. hirae* and *E. faecalis* from UTI patients. Maximum enterococcal isolates were obtained from females of 10-20 years age group and compared with males of same age group. Enterocin was partially purified by ammonium sulphate precipitation technique followed by dialysis and analysis by SDS-PAGE revealed molecular mass of enterocin to be 4.5-5.5 kDa approximately. Partially purified enterocin was heat and pH stable and sensitive to proteolytic enzymes, thus proving it to be of proteinaceous nature and was therefore characterized as enterocin. Such bacteriocin have broad field of application including both food industry and medical sector.

**KEY WORDS:** *ENTEROCOCCUS HIRAE*, DIALYSIS, *E. FAECALIS*, ENTEROCIN, SDS-PAGE.

### INTRODUCTION

For years, Enterococci have been considered as harmless inhabitants of the gastrointestinal tracts of humans and animals. The genus *Enterococcus* is a heterogeneous group of bacteria, which includes 20 different species. The interest on Enterococci is raised in the last decades mainly for 2 important characteristics; they are considered as infection agents especially in immune compromised hosts and they are used as useful probiotics and starter cultures in various fermented food (Maki and Agger 1998; Leroy *et al.*, 2003; Manolopoulou *et al.*, 2003).

*Enterococci* produce bacteriocins, known as enterocins which are proteinaceous compounds produced by bacteria that exhibit a bactericidal or bacteriostatic mode of action against sensitive gram positive and gram negative bacteria. *Enterococci* are part of the normal intestinal microflora and may become opportunistic pathogens in individuals with serious diseases whose immune systems are compromised. *E. faecium* and *E. faecalis* are known to produce enterocins which possess heat stability and antilisterial activity, (Wilaipun *et al.*, 2004, Enan, 2006, Sawa *et al.*, 2009, Jamaly *et al.*, 2010).

Urinary Tract Infection (UTI) is a common infection prevalent among various age groups. Although UTI is

### ARTICLE INFORMATION:

\*Corresponding Author: [ziakhan7862@rediffmail.com](mailto:ziakhan7862@rediffmail.com)

Received 25<sup>th</sup> July, 2016

Accepted after revision 5<sup>th</sup> Sep, 2016

BBRC Print ISSN: 0974-6455

Online ISSN: 2321-4007



Thomson Reuters ISI/ESC and Crossref Indexed Journal

NAAS Journal Score 2015: 3.48 Cosmos IF : 4.006

© A Society of Science and Nature Publication, 2016. All rights reserved.

Online Contents Available at: <http://www.bbrc.in/>

common in women it can affect both gender and all age groups. Untreated UTI in a long run can lead to many complications such as pyelonephritis and renal damage. Although Enterococci is commonly isolated from UTI it is less often speciated. Speciation and antibiogram of enterococci is gaining relevance because of emerging antimicrobial resistance. The selection and identification of an enterocin produced by *Enterococcal* strain isolated from urine is of interest because it can be used as probiotic bacterium inhibit other bacterial pathogens (Gamal *et al.*, 2006 and Civamani *et al.*, 2014).

Many enterococci produce enterocins which are short peptide as a defense mechanism. Bacteriocins (enterocins) and are used bioactive peptides and most are cationic at physiological pH. This peptide is highly active against pathogenic bacteria and it plays a dual mode of action at high concentration, it produces localized holes in cell wall and cellular membrane which leads to leakage of macromolecule such as protein into external medium and cause death of pathogenic organism; at lower concentration; it modifies the ion permeability of the cells, dissipating both components of proton motive force (Minahk *et al.*, 2004). Enterocins have developed a great deal of interest as an approach to control food borne diseases to be used as starter culture and biopreservative in various food products. In some cases, enterocin are used as probiotics as a result of their protective effects in GIT (Khan *et al.* 2016)

Thus, considering all this, the study was undertaken to characterize enterocins from *E. hirae* & *E. faecalis* and to evaluate its inhibitory activity against indicator strain. The antimicrobial activity was measured in Arbitrary units (AU/ml). Molecular size was also determined along with its activity against heat, pH, proteolytic enzymes and storage conditions.

## MATERIAL AND METHODS

### STUDY DESIGN

A descriptive study was performed at Biochemistry Dept., Shri Shivaji College of Arts, Commerce and Science, Akola. The urine specimens were collected from government hospital, private hospital and pathology laboratory. Patients with complaints of fever, burning micturition and pain lower abdomen were included in the study. The urine samples were collected and processed in the laboratory by standard methods. The name, age, sex and date of onset of symptoms was noted. On isolation of enterococci, the organism was speciated and its activity was checked using different parameters. All the data obtained was recorded using MS Excel Software. The statistical analysis included statistics like frequency percentage, mean and standard deviation.

### BACTERIAL IDENTIFICATION

Total one hundred and eight urine samples were collected for Enterococcal isolation. Samples were collected in sterile broth medium and transferred immediately to laboratory for further processing. Samples were inoculated onto De Man, Rogosa and Sharpe broth for enrichment purpose and incubated at 30°C for 24-48 hrs. The enriched cultures were then analyzed for isolation of relevant organism. The isolation was performed by the routine microbiological procedure and inoculation was performed on selective and differential media viz Enterococcus Confirmatory Agar, De Man Rogosa, Sharpe Agar and Bile Esculin Agar. All plates were then incubated at 30°C for 24-48 hrs.

### SCREENING OF ENTEROCIN PRODUCING ISOLATES

All enterococcal isolates were screened for enterocin production by Agar-well diffusion method against indicator strain *S. aureus*. Enterococcal isolates were grown in Brain Heart Infusion broth and incubated at 37°C for 16-18h. For extraction of enterocins, bacterial cells were removed by centrifugation at 10,000x g, for 30min at 4°C. After centrifugation, the supernatant was adjusted to pH 7.0 with 0.1N NaOH. This is cell-free neutralized supernatant, also designated as crude preparation. Brain Heart infusion agar plates were overlaid with 3.0mL soft agar containing 0.1mL (approximately 1X-106 CFU/mL) of the indicator organism. Wells (5mm diameter) were cut and 100µL of cell-free neutralized supernatants of the test organism were poured into each well. Plates were incubated at 37°C for overnight. A clear zone surrounding the bacteriocin producer colonies after growth of the indicator strain was considered as bacteriocin positive. Inhibition zone around the wells were measured and recorded.

### PARTIAL PURIFICATION OF ENTEROCIN

#### Ammonium Sulfate Precipitation and Dialysis

Partial purification of enterocins was carried out by using ammonium sulphate precipitation method (Harris *et al.*, 1989) The enterocin producer isolates were grown in Brain Heart Infusion broth at 37°C for 16-18hrs. The bacterial cells were removed by centrifugation at 10,000x g, for 30min at 4°C and supernatant was collected. The ammonium sulfate was added slowly to the cell free neutralized supernatant with constant stirring (using magnetic stirrer) till the level of 80% saturation was achieved. The pellet obtained was then suspended in 20 mM sodium phosphate buffer in dialysis bag (Dialysis tubing D0405 Sigma Aldrich) and was dialysed for over-

night at 4°C with constant stirring. The system was held for overnight at 4°C and the precipitates were recovered by centrifugation (10,000x g, for 30 min at 4°C). The resulting pellet was solubilized in 20mM sodium phosphate buffer of pH6.8. The sample thus obtained was designated as crude preparation. The antimicrobial activity of this sample was assayed by using agar-well diffusion method and described in terms of AU/mL. One arbitrary unit (AU) of enterocin was defined as the reciprocal of the serial dilution that showing a clear inhibition zone, multiplied by a factor of 100 (to obtained AU/mL).

#### Quantitative Determination of Enterocin Activity

The agar well-diffusion method was performed, to determine antimicrobial activity of enterocin. Brain Heart Infusion Agar plates were pre-inoculated with 3.0ml soft agar containing (approximately  $1 \times 10^6$  CFU/ mL) of indicator organism and wells of 6 mm diameter were bored in it. Two-fold serial dilutions of cell-free neutralized supernatant in sterile phosphate buffer (pH 0.7) were made and 100 $\mu$ L of each two-fold dilution was pipetted into each well. The plates were incubated at 37°C + 2°C for 16-18hrs and diameter of zone of inhibition was measured in mm. The inhibitory strength was expressed as arbitrary unites or activity units/ mL. One arbitrary unit (AU) of enterocin was defined as the reciprocal of the serial dilution that showing a clear inhibition zone, multiplied by a factor of 100 (to obtained AU/mL).

#### Effect of Physicochemical Treatments on Enterocin Activity

**Thermo Stability Test:** -To evaluate the thermal stability, 1ml of enterocin preparations was exposed to different temperatures viz., 60°C for (60 min), 80°C for (40 min), 100°C for (30min), and 121°C for (15 min). Activity was checked by agar well diffusion assay (Iqbal *et al.*, 1999).

**Stability at Different pH Values:** Enterocin activity was also checked by placing it on wide range of pH. The supernatant pH levels were adjusted between 2.0 and 12.0 using 1 N HCl and 1 N NaOH. The pH stability was assayed at room temperature (25°C) after 1 and 24 hrs of incubation of partially purified enterocin solutions. After incubation, the tested supernatant was re-adjusted to neutral pH and assayed for activity. Untreated samples were used as the control.

**Effect of Proteolytic Enzymes:** Sensitivity of the enterocin to proteolytic enzymes trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, lipase, lysozyme and catalase was tested against partially purified enterocin samples. Each enzyme was dissolved in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and the solutions were added to the enterocin solution for a final concentration of 1 mg/ml following incubation at 37 °C for 2 hrs. Untreated samples were used as the control. The residual enterocin

activity was determined by agar-well diffusion method (Ahmad *et al.*, 2003). **Sensitivity to Chloroform:** To test for chloroform sensitivity the culture supernatant was mixed with an equal volume of chloroform and kept at room temperature for 4 hrs before assessing the antimicrobial activity. **Protein Quantitation:** Protein estimation from crude enterocin preparation was carried out by using Lowry method (Lowry *et al.*, 1951).

#### Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Profiling of Partially Purified Enterocin

Molecular weight of different enterocins were determined from fractions from ammonium sulfate precipitated fraction by performing 16% Tris-Tricin Sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Standard molecular weight marker procured from GeNei TM (GeNei™ 1500 - 10,000) was used as reference molecular weight marker. Partially purified enterocin solutions obtained from different isolates, were loaded on the gel. After electrophoresis, the gel was fixed with a solution containing 15% ethanol and 1% acetic acid. The gel was then washed with distilled water for 4 hrs. The gel was stained with solution containing 0.15% Coomassie brilliant blue R-250 in 40% ethanol and 7% acetic acid to identify the enterocin. The gel was then sequentially washed with phosphate buffered saline for 1hr and subsequently deionized water for 3 hrs. (Parbal 1988)

## RESULTS AND DISCUSSION

**Bacterial Isolation and Identification:** In the present study, total 108 urine samples were collected from UTI patients. Mean values in Table 1 states that maximum isolates obtained were from females as females are more prone to urinary tract infections. The figures related to standard deviation shows that heterogeneity is more in males of all age groups as compared to females with respect to their dietary habits, physical workout and mode of living. Morphological, physiological and biochemical identification of enterococcal isolates were carried out according to Standard microbiological technique. Out of 108 samples 40 enterococcal isolates were obtained and identified as *E. hirae* 14 (35%) and *E. faecalis* 26 (65%) Results were expressed in mean (standard deviation)

Max isolates (45.37%) were seen in 10-20yrs age group followed by 21-40 yrs age group (34.25%). 62.03% represents that max isolated from females as compared to 41 (37.96%) from males.

#### Preliminary screening of enterocin producing enterococci

Screening of enterocin producing enterococci was done by agar well diffusion method is summarized in table no.2

Age groups(yrs)	Male	Female	Total	Standard Deviation
10-20 yrs	20 (18.51%)	29 (26.85%)	49 (45.37%)	2.84
20-40 yrs	13(12.03%)	24(22.22%)	37 (34.25%)	5.13
40-60 yrs	8 (7.40%)	14(12.96%)	22 (20.37%)	3.56
Total	41(37.96%)	67(62.03%)	108 (100%)	
Standard Deviation	(13.16)	(12.50)	(12.71)	

Identified strains	No.of producer strains/ No.of tested strains	Frequency Percentage (%)
<i>E.hirae</i>	8/14	57.14
<i>E. faecalis</i>	18/26	69.23
Total	26/40	65

The obtained isolates were screened for their enterocinogenic potential against specific indicator strain of *S.aureus*. It was observed that out of 108 samples 40 enterococcal isolates were obtained showing strong inhibitory activity. Amongst these 40 isolates, 8 (57.14%)

out of 14 were found to be *E.hirae* and 18 (69.23 %) out of 26 of *E.faecalis* were found to be efficient producer of enterocin. For the assessment of antimicrobial activity shown by efficient enterocin producers six isolates were selected for further study. These were desig-

Sr. No.	Sample / Step	Volume (ml)	Activity units (AU/ml)	Total activity (AU)	Protein Conc. (mg/ml)	Total Protein (mg)	Specific activity	Activity recovered	Fold purification
1)	<i>E.hirae</i> EHE 8								
	Culture Supernatant	1000	160	160000	3.80	3800	42.10	100	1
	Ammonium sulphate precipitation 80%	100	640	640000	2.8	280	2285.71	400	54.29
2	<i>E. faecalis</i> EFE 9								
	Culture Supernatant	1000	160	160000	4.5	4550	35.16	100	1
	Ammonium sulphate precipitation 80%	100	640	640000	4.6	460	1391.30	400	39.57
3	<i>E.hirae</i> EHE 10								
	Culture Supernatant	1000	160	160000	3.6	3600	44.44	100	1
	Ammonium sulphate precipitation 80%	100	640	640000	4.2	420	1523.80	400	34.28
4	<i>E. faecalis</i> EFE 15								
	Culture Supernatant	1000	160	160000	4.7	4700	34.04	100	1
	Ammonium sulphate precipitation 80%	100	640	640000	4.3	430	1488.37	400	43.72
5	<i>E.hirae</i> EHE 18								
	Culture Supernatant	1000	160	160000	3.5	3500	45.07	100	1
	Ammonium sulphate precipitation 80%	100	640	640000	4.1	410	1560.97	400	34.63
6	<i>E.faecalis</i> EFE 21								
	Culture Supernatant	1000	160	160000	4.3	4300	37.20	100	1
	Ammonium sulphate precipitation 80%	100	640	640000	5.0	500	1280.00	400	34.40

Table 4: Effect of different temperature on Enterocin activity

Sr. No.	Enterocin	Temperature treatment			
		60°C for 60 min	80°C for 40 min	100°C for 30 min	121°C for 15 min
1	EHE 8	+	+	+	-
2	EFE 9	+	+	+	-
3	EHE 10	+	+	+	-
4	EFE 15	+	+	+	-
5	EHE 18	+	+	+	-
6	EFE 21	+	+	+	-

(+) - Activity retained (-) - Activity lost

Table 5: Effect of different pH on Enterocin activity

Sr. No.	Enterocin	pH treatment										
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	EHE 8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	EFE 9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	EHE 10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4	EFE 15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
5	EHE 18	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6	EFE 21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

(+) - Activity retained (-) - Activity lost

nated as *E.hirae* EHE8, *E.faecalis* EFE9 *E.hirae* EHE10 *E.faecalis* EFE15 *E.hirae* EHE18 *E.faecalis* EFE21. Their enterocins were named by adding enterocin to specific isolate number. One of the most important characteristic of enterocin is evaluation of susceptibility for different antibiotics. The obtained isolates were susceptible to commonly used antibiotics like ampicillin, amoxycilin while resistant to norfloxacin only. Thus stating its use as efficient and safe for clinico-medical sector (Khan et al. 2016)

Partial Purification of Enterocin: The partial purification of enterocin from cell free supernatant of *E.hirae*

and *E.faecalis* was done as mentioned in table no.3. The antibacterial activity was determined in terms of activity units AU/ml. The antibacterial activity for cell free neutralized supernatant and partially purified enterocin was found to be 160000 AU/ml and 640,000 AU/ml respectively. It was seen that the specific activity of enterocin EHE8 in cell free supernatant was 42.10 (AU/mg) which was increased upto 2285.71 (AU/mg) after ammonium sulphate precipitation and dialysis. Specific activity of all remaining enterocins were found as EFE9 1391.30 (AU/mg), EHE10 1523.80 (AU/mg), EFE15 1488.37 (AU/mg), EHE18 1560.97 (AU/mg) EFE21 1280 (AU/mg). Thus, spe-

Table 6: Effect of different Enzymes on Enterocin activity

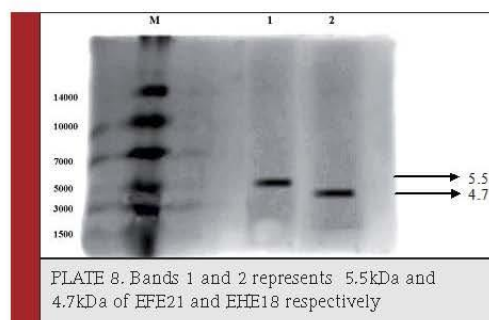
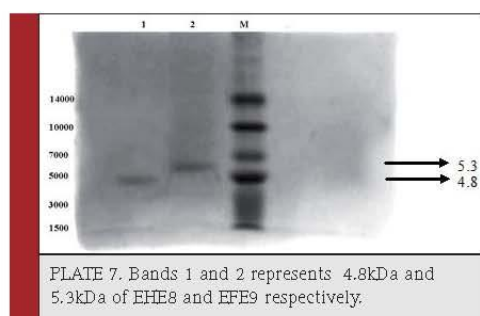
Sr. No.	Enterocin	Catalase	Trypsin	$\alpha$ -chymotrypsin	Lipase (pepsin A)	Lysozyme
1	EHE 8	+	-	-	+	+
2	EFE 9	+	-	-	+	+
3	EHE 10	+	-	-	+	+
4	EFE 15	+	-	-	+	+
5	EHE 18	+	-	-	+	+
6	EFE 21	+	-	-	+	+

(+) - Activity retained (-) - Activity lost  
 Abbreviations: Enterocin from respective isolates,  
 1.EHE 8- *E.hirae* EHE8, 2.EFE 9- *E.faecalis* EFE 9, 3.EHE 10- *E.hirae* EHE10  
 4.EFE 15- *E.faecalis* EFE 15, 5.EHE 18- *E.hirae* EHE18, 6 EFE 21- *E.faecalis* EFE 21

cific activity after ammonium sulphate precipitation and dialysis was found to be increase in all crude enterocins as compared to cell free supernatant.

Effect of physicochemical treatment on Enterocin activity: The effect of thermal treatment is as summarized in table no 4. All crude enterocins were stable following boiling for 30mins. The antimicrobial activity remained unaffected when heated at 100° C for 30min but activity gets reduced or lost beyond 121° C for 15min. All the tested enterocins were stable to wide range of pH from 2-8 as shown in table 5. Table 6 shows the effect of various enzymes on inhibitory activity of enterocins. It demonstrated sensitivity to proteolytic enzymes trypsin and  $\alpha$  chymotrypsin while treatment with catalase, lipase and lysozyme did not affect the activity of enterocin. Thus, the obtained data suggests that the loss of enterocin activity to proteolytic enzyme is due to the fact that enterocin contained an essential proteinaceous component while stability in presence of both lipase and lysozyme indicates that it lacked lipid or carbohydrate moieties. Similar enterocin activities to different physicochemical parameters were also seen in Cocolin *et al.*, (2007) Our results are also in accordance with the findings of Ahmad *et al.*, (2003) and Dezwaan *et al.* (2007).

SDS-PAGE Profiling of Partially Purified Enterocin: The crude enterocin obtained were further characterized by SDS PAGE analysis. The results of partial purification of obtained enterocin fraction from *E.hirae* and *E.faecalis* are depicted in plate 7 and plate 8. SDS-PAGE profiling revealed protein bands having molecular mass in range of approximately 4.5 to 5.5kDa. Bands were observed in lane 1 and 2 showed partially purified enterocin from cultures of *E.hirae* EHE8 and *E.faecalis* EFE 9 representing molecular mass approximately 4.8kDa and 5.3kDa in plate 7. Bands 1 and 2 in plate 8 represents molecular mass of bands from partially purified enterocins from cultures *E.faecalis* EFE21 and *E.hirae* EHE 18 as 5.5kDa and 4.7kDa respectively. In the present study the molecular weight observed is similar to those obtained



in earlier studies. Line *et al.*, also characterized enterocin by SDS-PAGE analysis which reveals 5.5kDa enterocin fraction. Similarly, Park *et al.*, identified partially purified bacteriocin produced by *E.faecium* JCM 5804<sup>T</sup>, enterocin A and enterocin B of molecular mass 4.5kDa approximately.

## CONCLUSION

The current study thus describes the biochemical characterization of enterocin from *E.hirae* and *E.faecalis* from urine samples. It was found that enterocin was heat stable and stable over wide range pH2-8 sensitive to proteolytic agents trypsin and  $\alpha$  chymotrypsin. Molecular size ranges 4.5-5.5kDa which states that obtained enterocin may belong to class IIa bacteriocin. Several enterocins have been characterized to date, many of which are produced by Enterococci which have potential to cover a very broad field of applications including both the food industry and clinico-medical sector.

## ACKNOWLEDGEMENT

The help rendered for performing statistical analysis by Dr. S.T.Khadakkar, Head Department of Statistics, Shri Shivaji College, Akola is acknowledged.

## REFERENCES

- Ahmad S., Alfred Iqbal & Sheikh Ajaz Rasool (2003). Bacteriocin like inhibitory substance (BLIS) from indigenous clinical streptococci : screening activity spectrum & biochemical Characterization. Pak.J.Bot.35(4): 499-506.
- Belguesmia Y, Choiset Y, Prevost H, Dalgalarondo M, Chobert J.M, and Drider D (2010). Partial Purification and Characterization of the Mode of Action of Enterocin S37: A Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* S37 Isolated from Poultry Feces J. of Env and Public Health. Vol 2010,1-8
- Civamani Deepa, Sreenivasan Srirangraj, Charles M V Praveen, Kali Arunava, Sivaraman Umadevi (2014). Speciation of *Ente-*

- rococci* as urinary pathogen with its resistance pattern: Research J. of Pharma Bio & Ch. Sci. 5(1) 137-143
- Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G. and Fortina, M. G. (2007). Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. Food Microbiol, 24 (7-8): 752-758
- Dezwaan Diane C, Meuo Micheal J, Litell Julia S, Jonathan Allen P, Rossbach Silvia & Pybus Vivien (2007). Purification and characterization of enterocin 62-6, a two-peptide bacteriocin produced by a vaginal strain of *Enterococcus faecium*: Potential significance in bacterial vaginosis Microb Ecol Health Dis 19(4): 241-250
- Enan, G., (2006). Behaviour of *Listeria monocytogenes* LMG 10470 in poultry meat and its control by the bacteriocin plantaricin UG 1. Int. J. Poult. Sci., 5: 355-359.
- Harries, E.L.V (1989). Concentration of the extract In: Protein purification methods a practical approach (Harris, E.L.V. and Angal, S.Eds.). IRL.Press.Oxford;125-172.
- Iqbal A., Ahmed S., Ali S.A. and Rasool S. A. (1999). Isolation and partial characterization of Bac201: a plasmid-associated bacteriocin-like inhibitory substance from *S.aureus* AB201. J. Basic. Microbiol.; 3960: 325-336
- Jamaly N., A. Benjouad R. Comunian E. Daga and M. Bouksaim, (2010). Characterization of *Enterococci* isolated from Moroccan dairy products. Afr. J. Microbiol. Res., 4: 1768-1774.
- Khan Z.H., Anandani J.H (2016) Evaluation of antibiotic susceptibility patterns of Enterococci isolated from UTI patients of Akola District. Ejbps vol.2 issue 3,371-375.
- Leroy F, Fouluie Moreno M. R.& De Vuyst L (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. Int. J. Food Microbiol., 88 : 235-240
- Line J. E., Svetoch E. A., Eruslanov B. V., Perelygin V. V., Mitsevich E. V., Mitsevich I. P., Levchuk V. P., Svetoch O. E., Seal B. S., Siragusa G. R., & Stern N. J. (2008). Isolation and purification of Enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother, 52(3): 1094-1100
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275
- Maki D. G & Agger W.A (1998). Enterococcal bacteremia : clinical features, the risk of endocarditis and management. Medicine Baltimore 67:248-269
- Manolopoulou E, Sarantinopoulos P, Zoidou E, Aktypis A, Moschopoulou E, Kandarakis I.G & Anifantakis E.M.(2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture & ripening. Int J Food Microbiol.82:153-16115.
- Minahk Carlos J, Dupuy Fernando and Morero Robert D. (2004) Enhancement of antibiotic activity by sub-lethal concentrations of enterocin CRL35. J. Antimicrob. Chemoth.; 53:240-246
- Parbal, B., (1988). Basic methods in molecular biology. In: A practical guideline to molecular cloning 2nd edition John and Wiley and Sons Inc.; pp. 11-35
- Park S.H, Itoh K, Fujisawa T. (2003). Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T J of Appl Microbio:95, 294-300
- Sawa N., T. Zendo, J. Kiyofuji, K. Fujita, K. Himeno, J. Nakayama and K. Sonomoto (2009). Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. Applied Environ. Microbiol., 75: 1552-1558.
- Telkar Anjana, Bagundi Mahesh C, Raghavendra V. P, Vishwanath G (2012). Urinary tract enterococcal infections & their antimicrobial resistance. Int J of Pharma & Bio Sci 3(3): B 90-96
- Wilaipun P., T. Zendo, M. Sanjindavong, S. Nitisinprasert, V. Leelawatcharamas, J. Nakayama and K. Sonomoto (2004). The two-synergistic peptide bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 isolated from Thai fermented fish (Pla-ra). Sci. Asia, 30: 115-122.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijantimicag](http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag)

## The safe enterocin DD14 is a leaderless two-peptide bacteriocin with anti-*Clostridium perfringens* activity

Delphine L. Caly<sup>a</sup>, Mickaël Chevalier<sup>a</sup>, Christophe Flahaut<sup>a</sup>, Benoit Cudennec<sup>a</sup>, Ahmed Khassaf Al Atya<sup>a</sup>, Gabrielle Chataigné<sup>a</sup>, Romain D'Inca<sup>b</sup>, Eric Auclair<sup>b</sup>, Djamel Drider<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université Artois, EA 7394, Institut Charles Violette (ICV), Université de Lille 1, Lille, France

<sup>b</sup> Phileo Lesaffre Animal Care, Société Industrielle Lesaffre, Marçay-en-Barœul, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 May 2016

Accepted 12 November 2016

#### Keywords:

*Clostridium perfringens*

*Enterococcus faecalis*

Bacteriocin

Cytotoxicity

### ABSTRACT

*Enterococcus faecalis* 14, a strain previously isolated from meconium, displayed activity against four *Clostridium perfringens* isolates when co-cultured on agar plates. The anti-*Clostridium* activity was ascribed to the production of enterocin DD14, which was subsequently purified. The minimum inhibitory concentration (MIC) of enterocin DD14 against one collection strain and one clinical *C. perfringens* strain was determined at 50 µg/mL. Furthermore, using the intestinal epithelial cell line IPEC-1, it was shown that *E. faecalis* 14 was not cytotoxic after 24 h of contact, and no cytotoxicity was observed when IPEC-1 cells were incubated with pure enterocin DD14 for 4 h. Enterocin DD14 was characterised using mass spectrometry and was shown to consist of two small proteins of 5200.74 Da and 5206.41 Da, respectively. The two peptides (DD14A and DD14B) have highly similar amino acid sequences and no signal peptide, which classifies enterocin DD14 as a class IIb leaderless two-peptide bacteriocin. The genes encoding DD14A and DD14B were sequenced and were shown to be 100% identical to other previously described enterocins MR10A and MR10B, in contrast to the producing strains, which are different. Consequently, the present in vitro study supports the potential of this *E. faecalis* 14 strain and/or its purified enterocin DD14 as putative anti-*C. perfringens* compounds in chickens.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

Necrotic enteritis (NE) is a severe disease caused by *Clostridium perfringens* that leads to high mortality in broiler chickens and causes dramatic economic losses for the poultry industry [1,2]. *Clostridium perfringens* is a Gram-positive, anaerobic pathogen frequently found in the gastrointestinal tract of humans and animals [3,4]. NE is caused by *C. perfringens* type A strains, which produce the  $\alpha$  and NetB toxins [5–7], in conjunction with predisposing factors such as coccidiosis [8].

In the past decade, the incidence of NE in poultry has increased, mostly due to the establishment of the 2006 European regulation (feed additives regulation 1831/2003/EC) to prevent the use of antibiotics as growth-promoting agents [9]. Moreover, the suddenness of death generally prevents its therapeutic treatment. Thus, there is an urgent need to develop alternative formulations to prevent NE in poultry. To this aim, several strategies have been

established, including action on predisposing factors and the direct targeting of *C. perfringens*.

The pathogenicity of *C. perfringens* can be controlled by preventing the growth of virulent strains or by interfering with their virulence factors, e.g. by affecting toxin production. A number of feed-additive alternatives to antibiotics have been investigated in the past 20 years and have proven efficient to prevent *C. perfringens* proliferation in vitro and in vivo. These include the use of enzymes [10], lysozyme [11], organic acids [12] or plants [13]. A large body of work has also focused on the use of molecules of microbial origin, such as yeast extract and antimicrobial peptides, and on the use of microorganisms as probiotics or competitive exclusion supplements [14]. Several feed additives are already available commercially, consisting mostly of lactic acid bacteria [14].

Whilst not yet used in commercial products for animal care, *Enterococcus* spp. have been shown to have anti-*C. perfringens* activity in vitro (*Enterococcus faecium* [15,16], *Enterococcus durans* [17] and *Enterococcus faecalis* [17,18]). Cao et al. showed that feeding an *E. faecium* culture to day-of-hatch chicks led to a reduction of *C. perfringens* counts and improved the establishment of beneficial flora [19]. Another study showed that a strain of *E. faecalis* that prevented *C. perfringens* proliferation in a chicken model inhibited  $\alpha$  toxin production when co-cultured with *C. perfringens* [20]. In most

\* Corresponding author. Institut Charles Violette, Université de Lille 1, Polytech Lille, Cité Scientifique, Avenue Paul Langevin, Villeneuve d'Ascq 59655, France.

E-mail address: [djamel.drider@univ-lille1.fr](mailto:djamel.drider@univ-lille1.fr) (D. Drider).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.016>

0924-8579/© 2017 Published by Elsevier B.V.

cases, the anti-*C. perfringens* effect was attributable to the production of bacteriocins [15,16,18]. Bacteria within the *Enterococcus* genus are known to produce structurally diverse bacteriocins, called enterocins, such as the well-characterised circular AS-48 enterocin produced by *E. faecium* and *E. faecalis* [21,22] and the *E. faecium* leaderless two-peptide enterocin L50 [23]. Remarkably, counterparts to enterocin L50 were also found in *E. faecalis* [24,25].

In this study, the antimicrobial activity of *E. faecalis* 14, a strain isolated from the meconium of healthy newborns [26], was investigated against four *C. perfringens* strains including a clinical isolate. *Enterococcus faecalis* 14 was previously shown to have broad-spectrum antimicrobial activity against Gram-negative pathogenic bacteria and to be a good probiotic candidate [26]. In this work, we narrowed the anti-*C. perfringens* activity of *E. faecalis* 14 to the production of a two-peptide bacteriocin (DD14), which was purified and characterised by mass spectrometry. We also showed that *E. faecalis* 14 and enterocin DD14 were not cytotoxic to IPEC-1 cells and thus could be used to prevent *C. perfringens* infections and NE in broiler chickens.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

*Enterococcus faecalis* strain 14 was isolated from the meconium of a newborn in France and was characterised in our laboratory [26]. *Clostridium perfringens* DSM756 corresponds to the type strain ATCC®13124™ (type A,  $\alpha$ +), *C. perfringens* NCTC6785 is an  $\alpha$  + type A strain of human origin [27] and *C. perfringens* NCTC8798 is a type A strain (CPE+,  $\alpha$ +) isolated from a food-poisoning outbreak [28]. The clinical isolate *C. perfringens* Clin1 was isolated from a chicken with NE (kindly provided by Dr Chemaly, ANSES, France). *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 was used as the target strain for the quantification of antimicrobial activity. *Clostridium perfringens* strains were grown on Mueller–Hinton agar supplemented with 5% sheep blood (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and in brain–heart infusion (BHI) broth (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) at 37 °C in anaerobic conditions. *E. faecalis* 14 was grown in de Man–Rogosa–Sharpe (MRS) broth (Sigma-Aldrich) or BHI broth at 37 °C. *K. rhizophila* CIP 53.45 was grown in BHI broth at 37 °C.

### 2.2. Anti-*Clostridium perfringens* activity assay

Screening assays were performed using the well diffusion assay. BHI plates were inoculated with target strains and were allowed to dry. Then, 10  $\mu$ L of a bacterial culture of the target strain or 100  $\mu$ L of culture supernatant was spotted on the plate and was incubated overnight at 37 °C in appropriate conditions. The radius of the zone of inhibition was measured from the edge of the well to the edge of the inhibition halo. Antibacterial activity was quantified using the Arbitrary Units (AU) method [29]. The activity of serial dilutions of culture supernatant or purification fractions was tested using the well diffusion assay. Activity was expressed in AU/mL, which corresponds to the inverse of the last active dilution multiplied by 10.

### 2.3. Cytotoxicity assays

The porcine intestinal epithelial cell line IPEC-1 (DSMZ, Braunschweig, Germany) was grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum, 4  $\mu$ M L-glutamine, 87 U/mL penicillin and 87  $\mu$ g/mL streptomycin (PAN-Biotech GmbH) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were grown for 78 h in two subsequent subcultures and were seeded in a 96-well tissue culture plate at a density of ca. 15,000 cells/well and were grown for an additional 48 h. For cytotoxicity assays with *E. faecalis* 14, bacterial

cultures were washed twice with phosphate-buffered saline and were diluted in DMEM and added to the IPEC-1 cells at the appropriate multiplicity of infection (MOI) (1, 50, 100 or 200 bacteria/cell) and were incubated for 24 h. For cytotoxicity assays with purified enterocin, 50  $\mu$ L of the appropriate concentration of enterocin DD14 was added to IPEC-1 cells and was incubated for 4 h and 24 h. The viability of IPEC-1 cells was assessed using the CCK-8 assay (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan) by adding to each well 15  $\mu$ L of CCK-8 reagent in 150  $\mu$ L of supplemented DMEM. Following 2 h of incubation, the absorbance of each well was measured at 450 nm in a spectrophotometer (SAFAS Xenius; SAFAS Monaco, Monaco). Results were expressed as a percentage of viability compared with non-treated cells (control). Statistical analyses were performed using SigmaPlot software (Systat Software Inc., Erkrath, Germany). Differences between the means of the sample and control groups were measured by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test. Differences were considered significant at a *P*-value of <0.05.

### 2.4. Minimum inhibitory concentration (MIC) determination

MICs were determined using the broth dilution method [30]. Briefly, *C. perfringens* or *K. rhizophila* strains were grown in BHI broth for 2–3 h until they had reached exponential phase and were then diluted to a concentration of  $1 \times 10^6$  CFU/mL per well. The inoculated growth medium was supplemented with different concentrations of pure enterocin DD14 or amoxicillin (Sigma-Aldrich) in a 96-well microtitre plate. Enterocin DD14 was added at concentrations ranging from 0.1  $\mu$ g/mL to 100  $\mu$ g/mL and amoxicillin at concentrations from 0.03  $\mu$ g/mL to 32  $\mu$ g/mL. Three separate assays were performed in duplicate; sterility and growth controls were performed for each assay.

### 2.5. Purification of enterocin DD14

A 2 L culture of *E. faecalis* 14 was grown for 8 h in BHI broth buffered with 50 mM sodium phosphate (pH 6.3) at 37 °C with 160 rpm shaking. The culture supernatant was harvested by centrifugation and was incubated overnight at 4 °C with CM Sephadex® C-25 (GE Healthcare Life Sciences, Milwaukee, WI). The resin was then washed with 5 bed volumes (BV) of 50 mM sodium phosphate (pH 6.3) and 5 BV of 0.5 M NaCl. The resin-bound bacteriocin was then eluted with 2 BV of 1.5 M NaCl. Enterocin DD14 was further purified by gel filtration using PD MidiTrap G-10 columns (GE Healthcare Life Sciences) in 50 mM sodium phosphate (pH 6.3) supplemented with 150 mM NaCl. Buffer exchange to Milli-Q® water (Merck Millipore, Billerica, MA) and concentration were performed using Vivacon® 500 (Sartorius, Göttingen, Germany) following the manufacturer's instructions. For the mass spectrometry analysis, the two peptides (DD14A and DD14B) were separated by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Vydac® 218TP C18 column (Grace, Columbia, MD) equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Peptides were eluted using a linear gradient of acetonitrile and isopropanol (2:1, v/v). After each purification step, protein concentration was measured using a bicinchoninic acid assay (Sigma-Aldrich) and antibacterial activity was assessed against the indicator strain *K. rhizophila*.

### 2.6. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS)

MALDI-TOF/MS analyses were performed on an autoflex™ speed (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) running flexControl 3.3 (Bruker Daltonics). MALDI-TOF mass spectrometer calibration over the 2000–16 000 mass range was performed using the bacterial test standard according to the recommendations of the manufacturer. The culture

supernatant and the HPLC-purified enterocins were loaded on the MALDI target according to the thin layer method using  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) [10 mg/mL in acetonitrile/water (50:50 v/v) containing 0.1% TFA] as matrix. Briefly, each MS spectrum was acquired in positive linear mode or positive reflectron mode by accumulating data from 5000 laser shots. MS spectra were processed using the flexAnalysis™ 3.4 software (Bruker Daltonics).

### 2.7. Peptide mass and peptide fragmentation fingerprints

The dried sample of HPLC-purified enterocin was resolubilised in 50  $\mu$ L of bicarbonate buffer [50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8.5)] containing 10 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich) and reduction was carried out at 55 °C during 45 min. Alkylation was then achieved by addition of 50  $\mu$ L of bicarbonate buffer containing 55 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature in the dark. Finally, the reduced, alkylated enterocin was proteolyzed overnight at 37 °C using sequencing-grade trypsin (Promega Corp., Charbonnières-Bains, France) by adding 20  $\mu$ L of bicarbonate buffer (pH 8.5) containing an enzyme/enterocin ratio 1:40 (w/w, final concentration). Peptides were analysed by MALDI-TOF/MS using 2,5-dihydroxybenzoic acid [20 mg/mL in acetonitrile/water (60:40 v/v) containing 0.1% TFA] as matrix (dried-droplet method). The MS (reflectron mode) and MS/MS (lift mode) measurements were manually performed. MS and MS/MS spectra were processed using the flexAnalysis™ 3.4 software, whilst database searches were performed using the web-available version of Mascot (Matrix Science Ltd., London, UK) and the UniProtKB Knowledgebase release 2014\_10. The relevance of protein identities was judged as a function of the probability-based MOWSE score, calculated with a  $P$ -value of 0.05 ( $P < 0.05$ ). The two peptides of enterocin DD14 were identified based on their amino acid sequences, manually deduced from the b- and y-fragment ions.

### 2.8. Amplification of enterocin genes and genetic relatedness of strains

Total genomic DNA of *E. faecalis* 14 was extracted using a Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp.). Genes coding for DD14A and DD14B were amplified using the forward primer DD14up\_F (3'-AATGATTGGAGGAGTTATATTATGGAG-5') and the reverse primer DD14B\_R (3'-TTAATGTCCT TTAGCCATT TTTCAATTTG-5') [24]. Primer DD14up\_F anneals 21 bp upstream of the start of the gene coding for DD14A and was designed based on the sequence of the L50 genes in *E. faecium* [23], and primer DD14B\_R

corresponds to a primer used to amplify *entAB* genes as previously described [24]. DD14A and DD14B genes were amplified using Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) with an initial denaturation at 98 °C for 30 s, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 50 °C for 20 s and 72 °C for 30 s, and a final elongation of 10 min at 72 °C.

The resulting PCR product was purified using a GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fischer Scientific) and was cloned into a pGEM®-T Easy Vector (Promega Corp.) according to the manufacturer's instructions. The DD14A and DD14B genes were sequenced using custom DNA Sanger sequencing services (Eurofins Genomics, Munich, Germany). Both PCR amplification and sequencing analysis were performed in duplicate. Sequences were analysed using the BioEdit Sequence Alignment Editor [31]. The genetic relatedness between *E. faecalis* 14 and MR10 strains was established using the repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR) approach and the experimental conditions previously reported [32]. Construction of phylogenetic trees was performed using DiversiLab® software (bioMérieux).

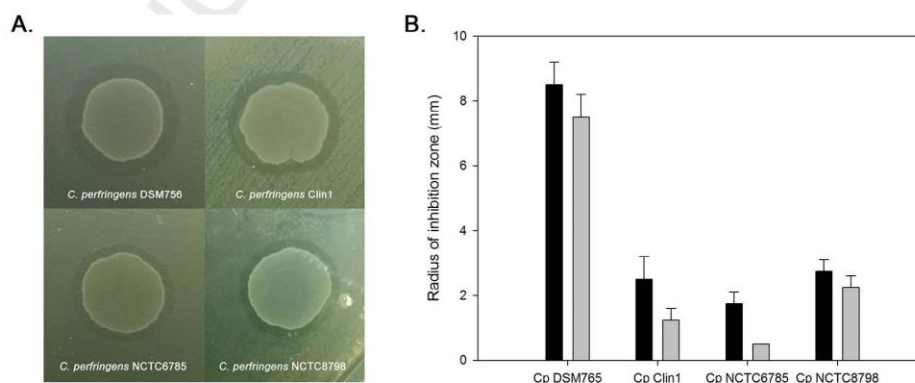
## 3. Results

### 3.1. Enterococcus faecalis 14 presents anti-Clostridium perfringens activity

*Enterococcus faecalis* 14 displayed antimicrobial activity against the four *C. perfringens* isolates tested when co-cultured on agar plates (Fig. 1A). When testing the antimicrobial activity of the supernatant of a 7-h culture of *E. faecalis* 14, antimicrobial activity was observed against all *C. perfringens* isolates tested (Fig. 1B). The type strain DSM756 showed the highest sensitivity to neutralised supernatant, and the collection strain NCTC6785 was the least sensitive, with observed inhibition zone radii of  $7.5 \pm 0.71$  mm and  $0.5 \pm 0.00$  mm, respectively. Whilst some of the anti-*C. perfringens* activity of the supernatant was ascribed to the presence of acids (Fig. 1B, black bars), most of the activity remained after neutralisation of the supernatant (Fig. 1B, grey bars). Using different protease treatments, the activity was shown to be due to the presence of a molecule of proteinaceous nature in the culture supernatant.

### 3.2. Purification of enterocin DD14 and minimum inhibitory concentration determination

Enterocin DD14 was purified using a protocol inspired by the method developed by Abriouel et al. for the purification of enterocin

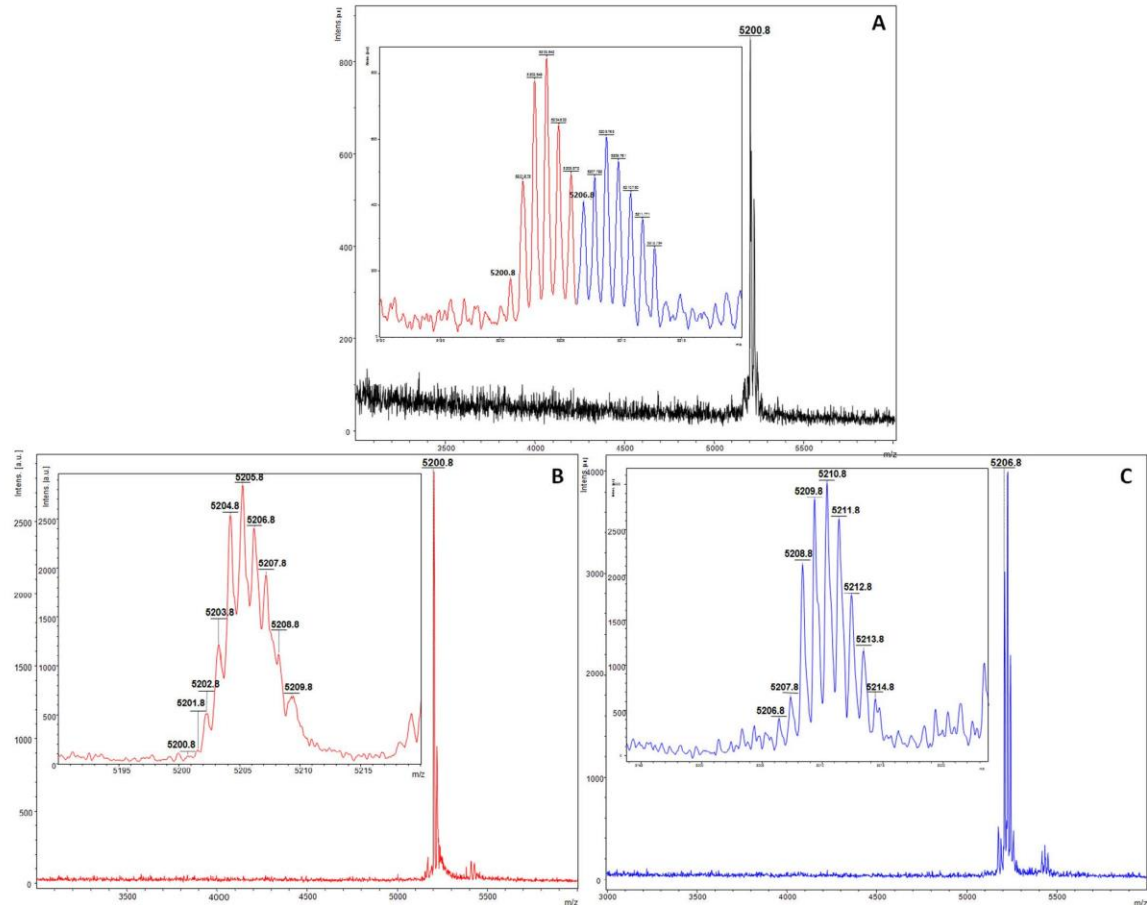


**Fig. 1.** Anti-*Clostridium* activity of *Enterococcus faecalis* 14. (A) Activity when co-cultured on agar plates (10  $\mu$ L spotted on an overlay of the target strain) and (B) activity of the supernatant (in black) and the neutralised supernatant (in grey), shown as the radius of the zone of inhibition.

309  
310  
311  
312  
313  
314**Table 1**  
Purification of enterocin DD14 from a 2 L culture by cation-exchange (CEX) and size-exclusion (SEC) chromatography.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (AU)	Specific activity (AU/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Supernatant	11 880	400 000	33.67	100	1
CEX	69	200 000	2898.55	50	86.08
SEC	0,699	6400	9155.94	1.6	271.93

315



**Fig. 2.** Cytotoxicity to IPEC-1 cells of (A) *Enterococcus faecalis* 14 after 24 h and (B) purified enterocin after 4 h (light grey) and 24 h (dark grey) of contact, respectively. Means without a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test. Comparison of data was performed group by group including the control group. MOI, multiplicity of infection.

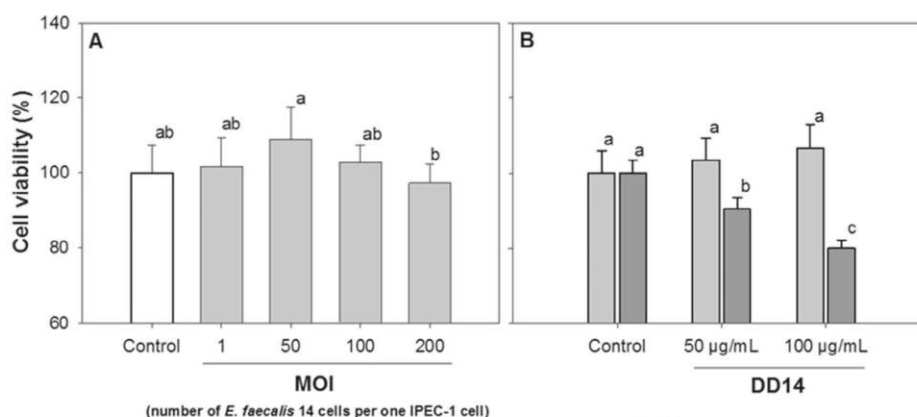
319

AS-48 [33]. From a 2 L culture, 0.7 mg of enterocin DD14 was recovered, with a high degree of purity (Table 1; Fig. 2). The two-step purification process yielded a highly active enterocin preparation with the specific activity increasing from 33.67 AU/mg in the culture supernatant to 9153.32 AU/mg after size-exclusion chromatography. Despite low purification yields, sufficient amounts of enterocin DD14 were obtained and were used to determine the MIC of the purified enterocin against two of the *C. perfringens* strains and the reference target strain *K. rhizophila* CIP 53.45. The MIC of enterocin DD14 was shown to be 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  against both the type strain *C. perfringens* DSM756 and the clinical isolate Clin1 (Table 2). The same MIC was determined against *K. rhizophila* CIP 53.45. The MICs of

**Table 2**  
Minimum inhibitory concentrations (MICs) of enterocin DD14 and amoxicillin (positive control) against various target strains.

Compound	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>a</sup>		
	<i>Clostridium perfringens</i> DSM756	<i>Clostridium perfringens</i> Clin1	<i>Kocuria rhizophila</i> CIP 53.45
Enterocin DD14	50.00 $\pm$ 0.00	50.00 $\pm$ 0.00	50.00 $\pm$ 0.00
Amoxicillin	0.25 $\pm$ 0.00	0.19 $\pm$ 0.06	1.50 $\pm$ 0.50

<sup>a</sup>  $n = 6$ .332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341



**Fig. 3.** Positive reflectron matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) spectra obtained from (A) the semi-purified enterocin DD14 and (B,C) from high-performance liquid chromatography (HPLC)-purified bacteriocins DD14A and DD14B, respectively. The isotopic distributions of bacteriocins are depicted in the insets. The  $m/z$  ratio of DD14A and DD14B are 5200.740 and 5206.414, respectively.

amoxicillin were  $0.25 \pm 0.00 \mu\text{g/mL}$  and  $0.19 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$  for *C. perfringens* DSM756 and Clin1, respectively, which correspond to expected levels of efficacy for this antibiotic, which was used as a positive control.

### 3.3. Enterococcus faecalis 14 and DD14 are non-cytotoxic to IPEC-1 cells

The cytotoxicity both of *E. faecalis* 14 and the purified DD14 enterocin were tested with the intestinal epithelial cell line IPEC-1. Biologically relevant contact times of 4 h for the enterocin and 24 h for the strain were chosen for this experiment. After 24 h of contact between *E. faecalis* 14 and IPEC-1 cells, no apparent cytotoxicity was observed at a MOI of 1:1, 50:1, 100:1 or 200:1 compared with the control group (Fig. 3A). After 4 h of contact with the purified DD14 enterocin, no reduction in cell viability was observed at concentrations of 50  $\mu\text{g/mL}$  and 100  $\mu\text{g/mL}$  in comparison with untreated cells. However, a slight increase ( $6.5 \pm 6.3\%$ ) was observed following incubation with concentrations of enterocin DD14 at  $2 \times \text{MIC}$ , a difference that was significant but with a  $P$ -value very close to the 0.05 cut-off value ( $P = 0.047$ ). After 24 h of contact with enterocin DD14, a dose-dependent decrease of IPEC-1 cell viability was observed in comparison with untreated cells, with reductions of 9.6% and 20% at concentrations of 50  $\mu\text{g/mL}$  and 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Fig. 3B). Overall these results show that neither the strain nor its enterocin appeared to be cytotoxic to the animal intestinal cell line tested.

### 3.4. Enterocin DD14 consists of two polypeptides

Enterocin DD14 was easily detected from the culture supernatant at a mass-over-charge ratio ( $m/z$ ) close to 5203 using positive linear MALDI-TOF/MS. As illustrated through the isotopic distribution obtained in positive reflectron mode (Fig. 2A, inset), enterocin DD14 is, in fact, composed of two polypeptides showing an overlap of their isotopic distribution. HPLC separation of the two polypeptides of enterocin DD14 was performed and DD14A and DD14B eluted at the end of the acetonitrile/isopropanol (2:1, v/v) gradient with elution times of 49 min and 48.5 min, respectively (data not shown). The two HPLC-purified polypeptides of enterocin DD14 were newly subjected to a positive reflectron MALDI-TOF/MS analysis to accurately characterise the monoisotopic  $m/z$  (Fig. 2B,C) of

each enterocin polypeptide. The polypeptides DD14A and DD14B displayed  $m/z$  at 5200.740 and 5206.414, respectively.

Identification of DD14A and DD14B polypeptides was carried out from each purified polypeptide by reduction/alkylation and proteolysis. The trypsin-generated peptides issued from DD14A and DD14B were analysed in positive reflectron mode. Fig. 4A shows the peptide mass fingerprint corresponding to DD14B, and the mass list was created using the flexAnalysis™ 3.4 software. Fifteen masses were online subjected to the research and identification algorithm of peptides (MASCOT). Unfortunately, MASCOT returned no significant polypeptide identification. Two peptide-intense ions ( $m/z = 1387.775$  and 1089.609) were then selected and subjected to in-source fragmentation. Fig. 4B (inset) illustrates the MS fragmentation pattern obtained from the peptide ions at  $m/z$  1387.775 and shows the manually deduced amino acid sequence: IGQGWTDIQIEK.

### 3.5. Gene sequencing analysis and strain DNA genotyping

Following the mass spectrometry identification of a fragment of DD14B amino acid sequence, a search using the blastp tool of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server yielded 100% identity with chain A of enterocin 7B (PDB\_ID: 2M60\_A) [34], which is similar to the well-described *E. faecium* enterocin L50. Based on this alignment, primers were designed to amplify the genes coding for DD14A and DD14B in *E. faecalis* 14 (DD14up\_F and DD14B\_R). The reverse primer was used as previously described to amplify the genes coding for enterocins 7A and 7B [24], and the forward primer was designed to match a sequence directly upstream of the *dd14A* gene to prevent annealing to the 5' end of the *dd14B* gene. A 287-bp fragment was amplified and sequenced. The *dd14A* and *dd14B* genes translate into 44 and 43 amino acid-long peptides of predicted molecular weights of 5172.91 and 5178.83 Da, respectively (Fig. 5), with no signal peptide. Both peptides had highly similar amino acid sequences, with a percentage of identity of 71% and a similarity percentage of almost 90% as measured using the Blossum62 similarity matrix. The translated amino acid sequences of DD14A and DD14B were shown to be 100% identical to the previously described enterocins 7A and 7B and MR10A and MR10B [24,25]. Enterocin DD14 thus belongs to the well-known class IIb leaderless two-peptide enterocins, which consist of two peptides of high sequence similarity with synergic but also separate activities. However, rep-PCR analysis and interpretation (Fig. 6)

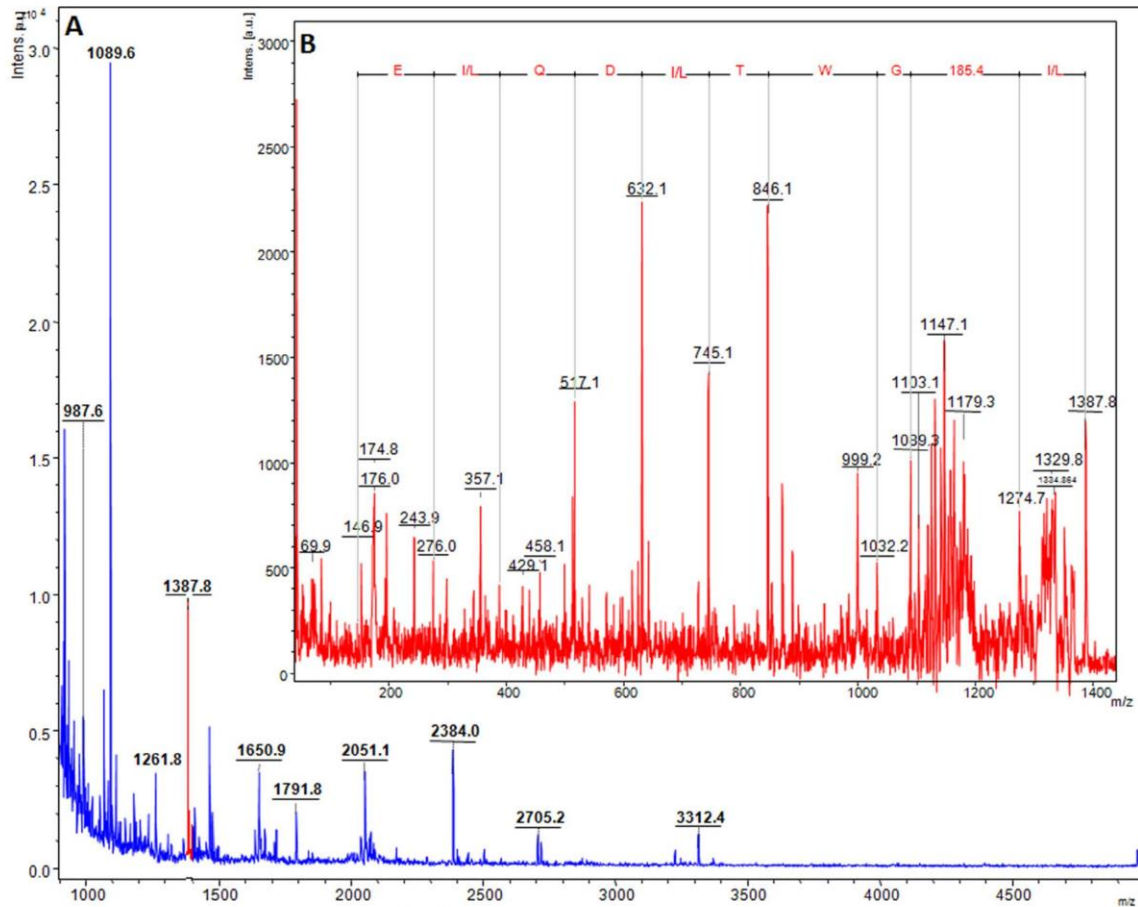


Fig. 4. Peptide mass fingerprint obtained by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) (positive reflectron mode) after reduction/alkylation and overnight proteolysis using sequencing-grade trypsin (A) of high-performance liquid chromatography (HPLC)-purified DD14B polypeptide. Peptide fragmentation fingerprint obtained by MALDI-TOF/MS (positive LIFT mode) from ions at  $m/z$  1387.75 (inset B). The amino acid sequence found using flexAnalysis™ 3.4 from y-fragments is mentioned in the top of the inset.

430  
431  
432  
433  
434

delineated clear differences between *E. faecalis* DD14 and *E. faecalis* MR10A.

#### 4. Discussion

*Enterococcus faecalis* 14 has antimicrobial activity against *C. perfringens* and is therefore a good candidate to develop a probiotic-based formulation to prevent *C. perfringens* proliferation and NE in broiler chickens. Importantly, *E. faecalis* 14 was active not only against collection strains but also against a strain isolated from a chicken with NE. Moreover, the strain displayed no cytotoxicity against IPEC-1 cells after 24 h of contact, delineating its potential for probiotic use.

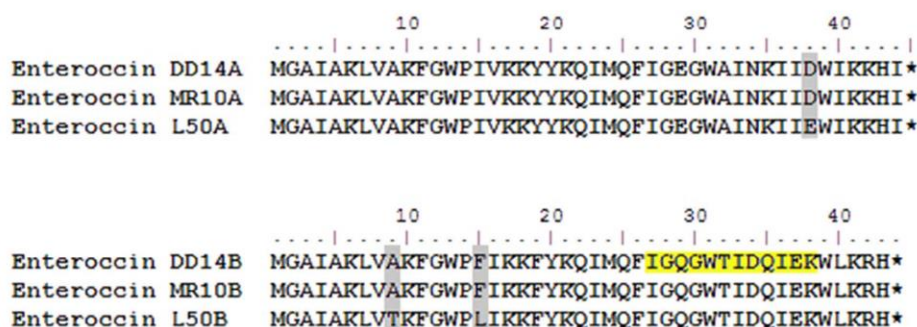
The anti-*C. perfringens* activity of *E. faecalis* 14 was ascribed to the production of a two-peptide bacteriocin, which could be purified and had a MIC of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  against *C. perfringens*. Enterocin DD14 was not cytotoxic against IPEC-1 cells when used at concentrations of  $2 \times \text{MIC}$  after 4 h of contact. Nevertheless, intestinal cell viability was reduced ca. 20% at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Interestingly, the lantibiotics nisin A and gallidermin decreased by 50% the Caco-2 cell viability (MTT assays) at concentrations of

385  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 456  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively [35]. It is highly conceivable to develop a feed-additive formulation for broiler chickens using only the purified enterocins, which would provide a more efficient and targeted action. Indeed, enterocins are safe bacteriocins [36] and are highly stable.

Enterocin DD14 was produced at low levels in the conditions tested, which yielded low amounts of purified product. It is thus necessary to optimise production conditions in order to be able to consider large-scale industrial production. Modifying the growth medium would be a first optimisation step; indeed, it has been previously shown that bacteriocins were produced at higher levels when strains were cultured in suboptimal growth conditions [37]. The use of heterologous expression systems could be considered to obtain higher purification yields. Several recombinant bacteriocins, such as the two-peptide enterocin L50, have been successfully expressed and purified from *Pichia pastoris* [38].

The DD14A and DD14B polypeptides were shown to be identical to previously described enterocins 7 and MR10 [24,25], which are, interestingly, produced by strains isolated from highly different ecosystems (i.e. meat and the uropygial gland of a bird) to that

455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474



475 **Fig. 5.** Amino acid sequence alignment of DD14A with MR10A and L50A and of DD14B with MR10B and L50B. The differences between DD14/MR10 and L50 are high-  
 476 lighted in grey, and the sequence identified by fragmentation is shown in yellow. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred  
 477 to the web version of this article.)

478

479 of *E. faecalis* 14. Interestingly, the experimental monoisotopic masses  
 480 of DD14A (5200.74 Da) and DD14B (5206.41 Da) do not match with  
 481 the theoretical ones (5172.91 and 5178.83 Da, respectively). This  
 482 discrepancy could be attributed to oxidation in the methionine resi-  
 483 dues during the purification process or to other alterations [39].  
 484 Indeed, Liu et al. recently provided evidence that both Ent7A and  
 485 Ent7B are N-formylated on the N-terminal methionine residue [24].  
 486 Here, the mass difference close to 28.03 Da suggests that DD14A  
 487 and DD14B are N-formylated.

488 Whilst the genes coding for polypeptides DD14A and DD14B have  
 489 been sequenced, their genome location remains to be deter-  
 490 mined. It was reported that many enterocin-coding genes are located  
 491 on plasmids [23], but the strain producing enterocins MR10A and  
 492 MR10B were shown to be plasmid-free [25]. Interestingly, enterocins  
 493 DD14 and MR10 are identical, but the strains producing these pep-  
 494 tides exhibited DNA fingerprint discrepancies.

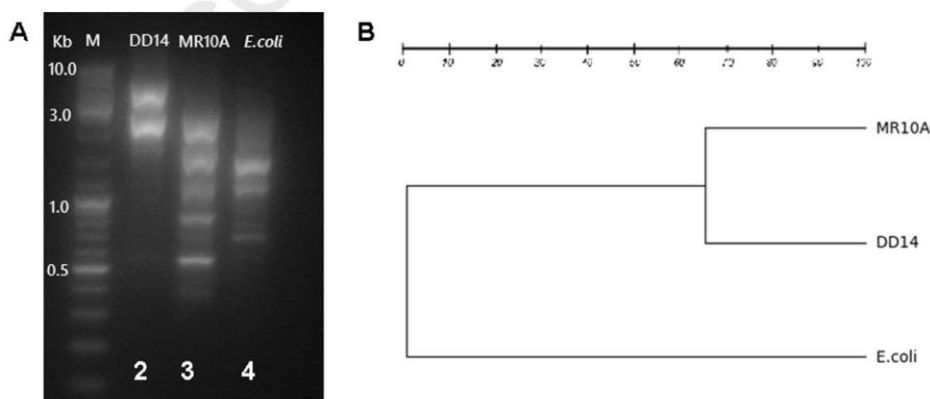
495 Moreover, enterocin DD14 was shown to potentialise antibiot-  
 496 ics, such as colistin, against *Escherichia coli* strains of swine origin  
 497 [40]. Its activity in conjunction with antibiotics used to treat NE-  
 498 affected chickens, e.g. amoxicillin, could be tested and is very likely  
 499 to yield promising results.

To conclude, *E. faecalis* 14, which is antagonistic and not cyto-  
 toxic, presents encouraging characteristics for use in feed additives  
 to prevent *C. perfringens* proliferation and NE in broiler chickens.  
*Enterococcus faecalis* is known to carry antibiotic resistance genes  
 and some strains are considered pathogenic, which are detrimental  
 attributes for its use in human and animal health. However,  
*E. faecalis* 14 was shown to be non-cytotoxic to IPEC-1 cells and was  
 previously shown to be sensitive to most antibiotics used for the  
 treatment of enterococcal infections [26]. Use of the purified bac-  
 teriocins as feed additives could also be considered based on their  
 anti-*C. perfringens* effects, which would first warrant optimisation  
 of production and purification.

#### Acknowledgments

The authors are indebted to Prof. Georges Daube and Dr Mari-  
 anne Chemaly for providing the *C. perfringens* strains, to Prof. Hikmate  
 Abriouel for valuable advice for enterocin purification, and to Prof.  
 Eva Valdivia for the gift of *E. faecalis* MR10.

**Funding:** This work was supported by Phileo Lesaffre Animal  
 Care (Marcq-en-Barœul, France). The MALDI-TOF/MS profiling



500

501 **Fig. 6.** (A) Repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprints registered on 1.0% agarose gel. (B) Resulting dendrogram of the rep-PCR from total DNA of  
 502 *Enterococcus faecalis* DD14, *E. faecalis* MR10A and *Escherichia coli*. In (A), lane M shows DNA markers (GeneRuler™ DNA) 10 kb (5  $\mu$ L) and lanes 2–4 show rep-PCR finger-  
 503 prints gathered from total DNA of *E. faecalis* DD14, *E. faecalis* MR10A and *E. coli* CIP 7624, respectively. Each lane contains 3  $\mu$ L of rep-PCR product, 7  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O and 2  $\mu$ L of  
 504 loading dye.

Please cite this article in press as: Delphine L. Caly, et al., The safe enterocin DD14 is a leaderless two-peptide bacteriocin with anti-*Clostridium perfringens* activity, International Journal of Antimicrobial Agents (2017), doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.016

experiments were performed on the REALCAT platform issued from French governmental subvention administrated by the French National Research Agency (ANR) program [ANR-11-EQPX-0037].

Competing interests: None declared.  
Ethical approval: Not required.

## References

- [1] Kaldhusdal M, Løvland A. The economical impact of *Clostridium perfringens* is greater than anticipated. *World Poultry* 2000;16:50–1.
- [2] Lee KW, Lillehoj HS, Jeong W, Jeoung HY, An DJ. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poult Sci* 2011;90:1381–90.
- [3] Popoff MR. *Clostridium*. In: Drider D, Salvat G, editors. *Sécurité Sanit. des Aliments. Épidémiologie lutte contre les Contam. zoonotiques*. Paris, France: Economica; 2013. p. 165–89.
- [4] Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:216–34.
- [5] Parish WE. Necrotic enteritis in the fowl. II. Examination of the causal *Clostridium welchii*. *J Comp Pathol* 1961;71:394–404.
- [6] Cooper KK, Songer JG. Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe* 2009;15:55–60.
- [7] Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog* 2008;4:e26.
- [8] Baba E, Wakeshima H, Fukui K, Fukata T, Arakawa A. Adhesion of bacteria to the cecal mucosal surface of conventional and germ-free chickens infected with *Eimeria tenella*. *Am J Vet Res* 1992;53:194–7.
- [9] Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:159–61.
- [10] Engberg RM, Hedemann MS, Steinfeldt S, Jensen BB. Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. *Poult Sci* 2004;83:925–38.
- [11] Liu D, Guo Y, Wang Z, Yuan J. Exogenous lysozyme influences *Clostridium perfringens* colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. *Avian Pathol* 2010;39:17–24.
- [12] Timbermont L, Lanckriet A, Dewulf J, Nollet N, Schwarzer K, Haesebrouck F, et al. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathol* 2010;39:117–21.
- [13] Engberg RM, Grevsen K, Ivarsen E, Frette X, Christensen LP, Højberg O, et al. The effect of *Artemisia annua* on broiler performance, on intestinal microbiota and on the course of a *Clostridium perfringens* infection applying a necrotic enteritis disease model. *Avian Pathol* 2012;41:369–76.
- [14] Caly DL, D'Inca R, Auclair E, Drider D. Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: a microbiologist's perspective. *Front Microbiol* 2015;6:1–21.
- [15] Shin MS, Han SK, Ji AR, Kim KS, Lee WK. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. *J Appl Microbiol* 2008;105:2203–12.
- [16] Chen YS, Yanagida F, Sriannon S. Characteristics of bacteriocin-like inhibitory substances from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821 and D081833. *Lett Appl Microbiol* 2007;44:320–5.
- [17] Stark JM. Antibiotic activity of haemolytic enterococci. *Lancet* 1960;1:733–4.
- [18] Bottone E, Allerhand J, Pisano MA. Effects of a bacteriocin produced by *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* (E1) on susceptible microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1974;40:385–92.
- [19] Cao GT, Zeng XF, Chen AG, Zhou L, Zhang L, Xiao YP, et al. Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poult Sci* 2013;92:2949–55.
- [20] Fukata T, Hadate Y, Baba E, Arakawa A. Influence of bacteria on *Clostridium perfringens* infections in young chickens. *Avian Dis* 2015;35:224–7.
- [21] Joosten HM, Nunez M, Devreese B, Van Beeumen J, Marugg JD. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:4220–3.
- [22] Martínez-Bueno M, Maqueda M, Galvez A, Samyn B, Van Beeumen J, Coyette J, et al. Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J Bacteriol* 1994;176:6334–9.
- [23] Cintas LM, Casasa P, Holo H, Hernandez PE, Nes IF, Havarstein LS. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J Bacteriol* 1998;180:1988–94.
- [24] Liu X, Vederas JC, Whittall RM, Zheng J, Stiles ME, Carlson D, et al. Identification of an N-terminal formylated, two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 710C. *J Agric Food Chem* 2011;59:5602–8.
- [25] Martín-Platero AM, Valdivia E, Ruiz-Rodríguez M, Soler JJ, Martín-Vivaldi M, Maqueda M, et al. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl Environ Microbiol* 2006;72:4245–9.
- [26] Al Atya AK, Drider-Hadiouche K, Ravallec R, Silvain A, Vachée A, Drider D. Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium. *Front Microbiol* 2015;6:227.
- [27] Gale EF, Brown GL, MacIntosh FC, White B. Production of amines by bacteria: the decarboxylation of amino-acids by organisms of the groups *Clostridium* and *Proteus* with an addendum by G. L. Brown, F. C. Macintosh and P. Bruce White. *Biochem J* 1941;35:66–80.
- [28] Hobbs BC, Smith ME, Oakley CL, Warrack GH, Cruickshank JC. Clostridium welchii food poisoning. *J Hyg (Lond)* 1953;51:75–101.
- [29] Galvez A, Maqueda M, Valdivia E, Quesada A, Montoya E. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can J Microbiol* 1986;32:765–71.
- [30] Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008;3:163–75.
- [31] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95–8.
- [32] Al Kassaa I, Hamze M, Hober D, Chihib NE, Drider D. Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon. *Microb Ecol* 2014;67:722–34.
- [33] Abriouel H, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M, Galvez A. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J Microbiol Methods* 2003;55:599–605.
- [34] Lohans CT, Towle KM, Miskolzie M, McKay RT, Van Belkum MJ, McMullen LM, et al. Solution structures of the linear leaderless bacteriocins enterocin 7A and 7B resemble carnocyclin A, a circular antimicrobial peptide. *Biochemistry* 2013;52:3987–94.
- [35] Maher S, McClean S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 2006;71:1289–98.
- [36] Belguesmia Y, Madi A, Sperandio D, Merieau A, Feuilloley M, Prévost H, et al. Growing insights into the safety of bacteriocins: the case of enterocin S37. *Res Microbiol* 2011;162:159–63.
- [37] Aasen IM, Mørseth T, Katla T, Axelsson L, Storø I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;53:159–66.
- [38] Basanta A, Gomez-Sala B, Sanchez J, Diep DB, Herranz C, Hernandez PE, et al. Use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:3314–24.
- [39] Cintas LM, Casasa P, Herranz C, Havarstein LS, Holo H, Hernández PE, et al. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J Bacteriol* 2000;182:6806–14.
- [40] Al Atya AK, Abriouel H, Kempf I, Jouy E, Auclair E, Vachée A, et al. Effects of colistin and bacteriocins combinations on the in vitro growth of *Escherichia coli* strains from swine origin. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2016;8:183–90.

## RESEARCH ARTICLE

## Open Access

Anticancer and antimicrobial potential of enterocin 12a from *Enterococcus faecium*Preeti Sharma<sup>1</sup>, Sumanpreet Kaur<sup>1</sup>, Bhupinder Singh Chadha<sup>1</sup>, Raminderjit Kaur<sup>2</sup>, Manpreet Kaur<sup>3</sup> and Sukhraj Kaur<sup>1\*</sup> **Abstract**

**Background:** Increase in the number of infections caused by Gram-negative bacteria in neutropenic cancer patients has prompted the search for novel therapeutic agents having dual anticancer and antimicrobial properties. Bacteriocins are cationic proteins of prokaryotic origin that have emerged as one of the most promising alternative antimicrobial agents with applications as food preservatives and therapeutic agents. Apart from their antimicrobial activities, bacteriocins are also being explored for their anticancer potential.

**Results:** In this study, a broad-spectrum, cell membrane-permeabilizing enterocin with a molecular weight of 65 kDa was purified and characterized from the culture supernatant of vaginal *Enterococcus faecium* 12a. Enterocin 12a inhibited multidrug-resistant strains of various Gram-negative pathogens such as *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* and Gram-positive, *Listeria monocytogenes*, but had no activities against different strains of gut lactobacilli. The mass spectrometric analysis showed that the enterocin 12a shared partial homology with 4Fe-4S domain-containing redox protein of *E. faecalis* R712. Further, enterocin 12a selectively inhibited the proliferation of various human cancer cell lines in a dose-dependent manner but not that of normal human peripheral blood mononuclear cells. Enterocin 12a-treated cancer cells showed apoptosis-like morphological changes.

**Conclusion:** Enterocin 12a is a novel bacteriocin that has anticancer properties against human cell lines and negligible activity towards non-malignant cells. Therefore, it should be further evaluated for its anticancer potential in animal models.

**Keywords:** Bacteriocin, Enterocin, *Enterococcus faecium*, Anticancer, Commensal, Antimicrobial

**Background**

Cancer is the second most prevalent cause of death worldwide that accounted for 9.6 million deaths, and 18.1 million new cases in 2018 [1]. Conventional cancer chemotherapeutic agents are mostly non-selective to cancer cells that result in serious side-effects such as organ toxicity, immunosuppression, and also contribute to the development of drug resistance in cancer cells. Immunosuppression due to anticancer drug regimen

and breakdown in the mucosal barrier due to the use of invasive devices in cancer patients make them susceptible to bacterial infections that require long-term prophylactic antibiotic regimens [2]. Further, the effectiveness of antibiotic regimen to treat infections in cancer patients is compromised due to the emergence of drug-resistant Gram-negative bacterial pathogens that predominates in neutropenic patients [3]. Therefore, novel anticancer agents that specifically inhibit cancer cells and have dual anticancer and antimicrobial activities are expected to act as prophylaxis against bacterial infections along with inhibiting the growth of tumors in cancer patients [4].

\* Correspondence: [drsukhrajkaur@gmail.com](mailto:drsukhrajkaur@gmail.com)<sup>1</sup>Department of Microbiology, Guru Nanak Dev University, Amritsar, Punjab 143005, India

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Exploration for novel antimicrobials to treat bacterial infections has led to renewed interest in the search for bacteriocins [5]. Bacteriocins are cationic proteins secreted by bacteria that kill the target bacteria mainly by forming pores in their cell membrane or in some cases by inhibiting protein synthesis and DNA replication [6]. Bacteriocins derived from lactic acid bacteria (LAB) have GRAS (Generally regarded as safe) status and therefore they are considered safe. Two such bacteriocins, nisin and pediocin have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for use as food preservatives [7]. Bacteriocins are also being considered as potential new generation therapeutic agents that can be employed as stand-alone drugs [6] or as adjuncts to conventional antibiotics [8, 9]. In healthcare studies, nisin was shown to successfully treat mastitis in humans [10] and cows [11].

Along with the antimicrobial activities, a few bacteriocins of LAB origin such as nisin [12], pediocin, and plantaricin have demonstrated anti-proliferative effects against human cancer cell lines, in in vitro and mice experiments [13]. This indicates their potential for use as both antimicrobial and anticancer agents. However, bacteriocins purified from LAB generally have narrow-spectrum antimicrobial activities as they are known to inhibit Gram-positive bacteria only [5, 14]. Therefore, bacteriocins that inhibit Gram-negative pathogens along with Gram-positive are expected to have wider applications. Thus, this study was focused on studying the anticancer potential of a broad-spectrum enterocin purified from the culture supernatant (CS) of *E. faecium* 12a. Further, the mode of anticancer activity and toxicity of the enterocin was also studied.

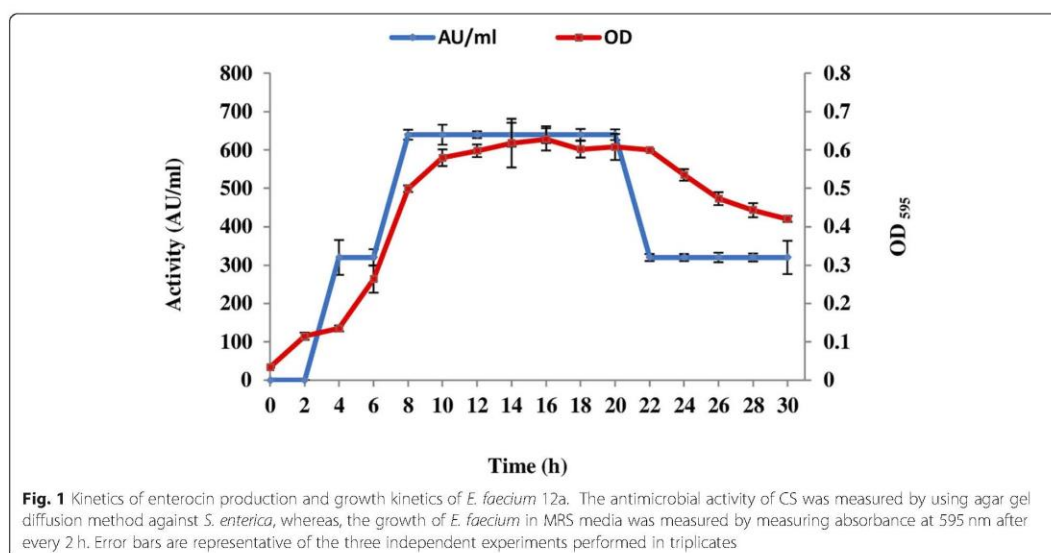
## Results

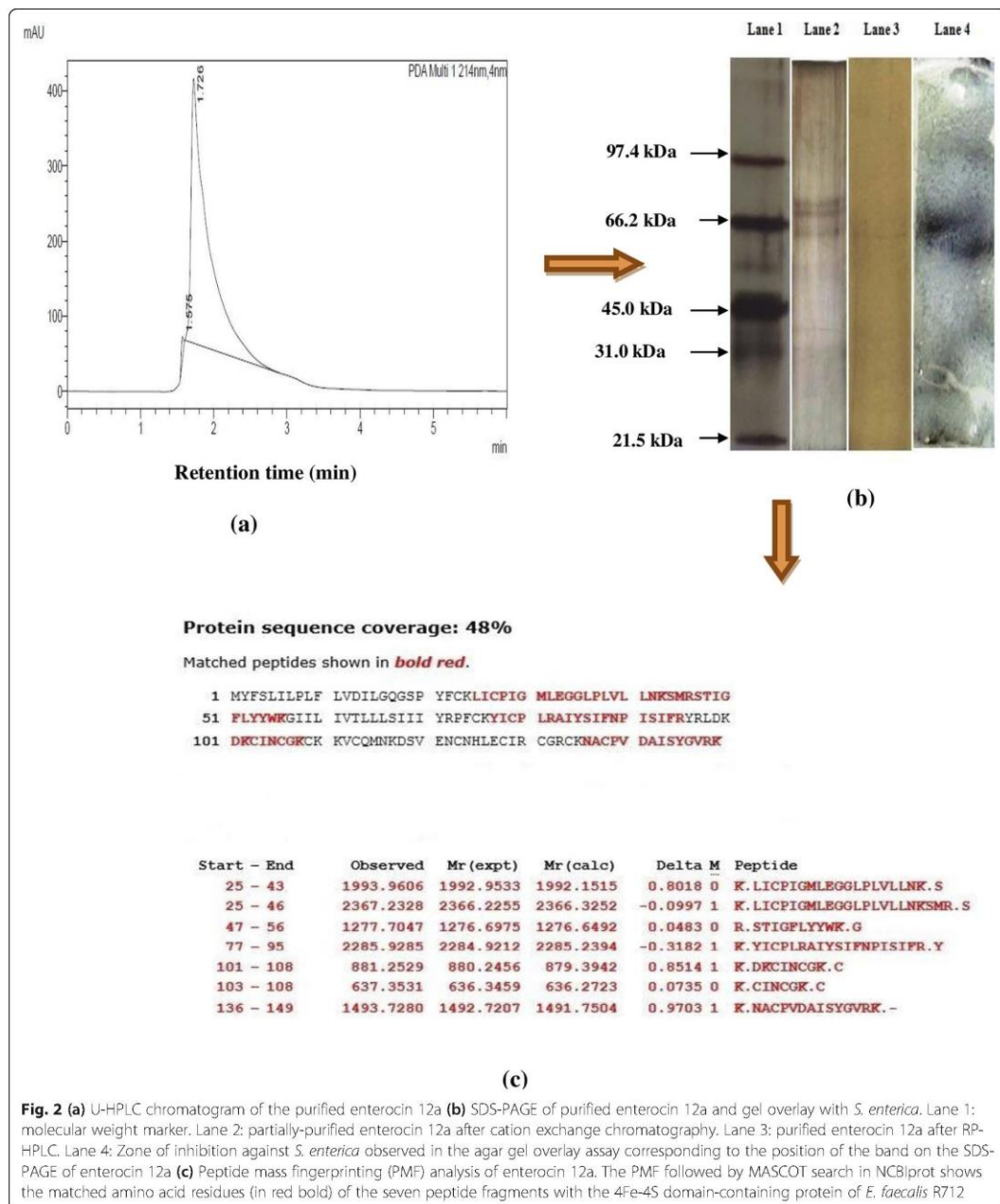
### Cumulative production kinetics of the antimicrobial substance in the CS

Before the purification of enterocin 12a, its production kinetics was studied in De Man Rogosa and Sharpe medium (MRS) broth. As shown in Fig. 1, enterocin 12a appeared in the CS 4 h after the inoculation of *E. faecium* 12a in MRS broth. The concentration of 12a peaked (640 arbitrary units per ml, AU/ml) at 8 h after which it plateaued till 20 h. After 20 h, there was a 50% decrease in the antimicrobial activity of the CS. The production of the antimicrobial substance was growth-associated as it peaked in the early log phase and plateaued in the stationary phase.

### Purification and identification of enterocin 12a

For the purification of antimicrobial compound from the CS, ammonium sulfate precipitation, cation-exchange chromatography and reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was carried out. Purified enterocin fraction yielded a single peak on the chromatogram at the retention time of 1.72 min (Fig. 2a). After RP-HPLC, a 10.11 fold increase in the specific activity of enterocin was observed and the final yield percentage was 1.6 (Table 1). SDS-PAGE analysis of the purified fraction showed a single band with a molecular weight of 65 kDa (Fig. 2b; Supplementary Fig. 1, Supplementary Fig. 2). Further, to test the antimicrobial activity of the 65 kDa band, gel overlay assay was performed against *Salmonella enterica* as the indicator pathogen, and a clear zone corresponding to the band was obtained (Fig. 2b; Supplementary Fig. 3). The band was cut





**Fig. 2** (a) U-HPLC chromatogram of the purified enterocin 12a (b) SDS-PAGE of purified enterocin 12a and gel overlay with *S. enterica*. Lane 1: molecular weight marker. Lane 2: partially-purified enterocin 12a after cation exchange chromatography. Lane 3: purified enterocin 12a after RP-HPLC. Lane 4: Zone of inhibition against *S. enterica* observed in the agar gel overlay assay corresponding to the position of the band on the SDS-PAGE of enterocin 12a (c) Peptide mass fingerprinting (PMF) analysis of enterocin 12a. The PMF followed by MASCOT search in NCBIprot shows the matched amino acid residues (in red bold) of the seven peptide fragments with the 4Fe-4S domain-containing protein of *E. faecalis* R712

and subjected to MALDI TOF/TOF MS/MS analysis. Protein identification by MASCOT search in NCBIprot showed that the peptide fragments of enterocin 12a shared similarity with 48% of 4Fe-4S domain-containing

protein of *E. faecalis* R712 with significant ( $p < 0.05$ ) coverage score of 121 (Fig. 2c). The seven peptides that matched the 4Fe-4S domain-containing protein of *E. faecalis* R712 are listed in Fig. 2c.

**Table 1** Steps of purification and percent yield of enterocin 12a purified from *E. faecium* 12a

Purification step	Total volume (ml)	Activity (AU/ml)	Total activity <sup>a</sup>	Total Protein (mg)	Specific activity <sup>b</sup>	Fold-Increase in the specific activity	Percent Yield
CS	1000	68,266	6.8 × 10 <sup>7</sup>	625	108,800	1	100
Ammonium sulphate ppt.	200	136,528	2.7 × 10 <sup>7</sup>	215	125,581	1.15	39.7
Cation-exchange fraction	30	273,056	8.1 × 10 <sup>6</sup>	33	245,455	2.26	11.9
Reverse-phase chromatography	2	546,112	1.1 × 10 <sup>6</sup>	1	1,100,000	10.11	1.6

<sup>a</sup>Total activity = Activity × Total volume of sample

<sup>b</sup>Specific activity = Total activity/ Total protein

The antimicrobial activities of both CS and purified enterocin 12a were determined against various pathogens and commensal lactobacilli strains. Results showed that both crude and purified enterocin 12a inhibited Gram-negative pathogenic strains such as *S. enterica*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, and *Vibrio cholerae* but did not inhibit Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and lactobacilli spp., except *Listeria monocytogenes*. Further, CS also inhibited *Mycobacterium smegmatis* but purified enterocin 12a had no activity against *M. smegmatis* (Table 2).

The zone of inhibition (mm) of CS and enterocin 12a against indicator bacterial strains was determined by using agar gel diffusion assay. The results are the mean ±

standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicates.

#### Physico-chemical characteristics of purified enterocin 12a

The thermostability of purified enterocin 12a was determined at different temperatures. As shown in Table 3, the antimicrobial activity of enterocin 12a remained stable at temperatures 60 and 80 °C; however, the enterocin was completely inactivated beyond 30 min exposure to a temperature of 100 °C. Further, the pH sensitivity of enterocin 12a was determined. Results showed that enterocin 12a remained active in the pH range 2–10 and exhibited maximum activity at pH 4 (Table 3). Further, the antimicrobial activity of enterocin 12a was stable to the action of various solvents such as methanol, chloroform, and acetonitrile (Table 3).

The effect of various enzymes on the stability of enterocin 12a was tested. It was observed that all three proteases resulted in complete abrogation of the antimicrobial activity of enterocin 12a, thereby showing its proteinaceous nature (Table 3). On the other hand, lipase treatment did not affect the antimicrobial activity of enterocin 12a (Table 3).

Zones of inhibitions (mm) of enterocin 12a were measured by using agar gel diffusion assay against *S. enterica*. The results are the mean ± SD of three independent experiments performed in triplicates.

#### Effect of enterocin 12a on membrane permeability

The effect of enterocin 12a on cell membrane permeability of *S. enterica* cells was determined by staining the cells with the fluorescent dye, propidium iodide (PI). Histograms (Fig. 3a) show that in the absence of enterocin 12a, *S. enterica* cells exhibited 13.5% fluorescence. Whereas, in the presence of enterocin 12a, the fluorescence of *S. enterica* cells increased to 71.7 and 91.7% after 15 and 30 min, respectively (Fig. 3b and c). Simultaneously, the confocal microscopy images (Fig. 4) of enterocin 12a-treated *S. enterica* cells stained with PI showed an exponential increase in the number of

**Table 2** Antimicrobial activity of the CS and enterocin 12a against various indicator bacterial strains

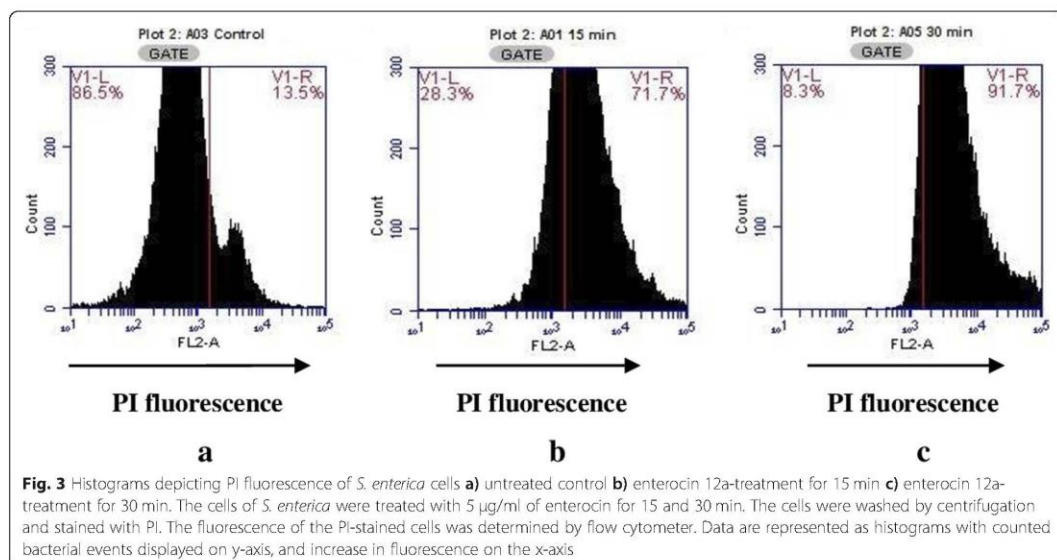
Indicator bacteria	Zone of inhibition (mm)	
	CS	Enterocin 12a
<i>S. enterica</i> MTCC 733	16 ± 0.1	15 ± 0.1
<i>Esc. coli</i> MTCC 119	13 ± 0.2	13 ± 0.2
<i>Sh. flexneri</i> MTCC 1457	15 ± 0.2	15 ± 0.2
<i>List. monocytogenes</i> MTCC 657	14 ± 0.3	13 ± 0.3
<i>V. cholerae</i> MTCC3906	13 ± 0.3	12 ± 0.3
<i>M. smegmatis</i> MTCC6	14 ± 0.2	*
<i>St. pyogenes</i> MTCC 1927	–	–
<i>Staph. aureus</i> MTCC 96	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 741	–	–
<i>Lactobacillus plantarum</i> L12	–	–
<i>L. plantarum</i> L14	–	–
<i>L. paracasei</i> L32	–	–
<i>L. pentosus</i> S45	–	–
<i>L. fermentum</i> L13	–	–
<i>L. fermentum</i> L18	–	–
<i>L. casei</i> S49	–	–

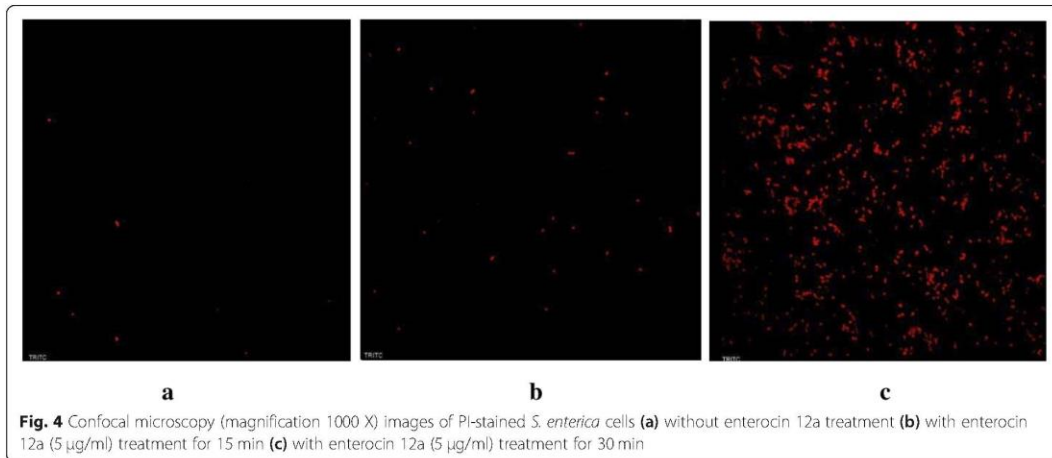
\*No zone of inhibition observed

**Table 3** Physico-chemical characterization of enterocin 12a

Physico-chemical parameters	Treatments	Residual activity of enterocin 12a in terms of zone of inhibition (mm)
Temperature	Untreated control	15±0.11
	60 °C (30 min)	15±0.12
	60 °C (60 min)	15±0.20
	80 °C (30 min)	14±0.20
	80 °C (60 min)	13±0.11
	100 °C (15 min)	8±0.15
	100 °C (30 min)	*-
	121 °C (15 min)	-
pH	2	13±0.14
	4	14±0.12
	6	13±0.15
	8	12±0.13
	10	11±0.12
Solvents (50%v/v)	Chloroform	14±0.11
	Methanol	15±0.11
	Acetonitrile	15±0.11
Enzymes (1 mg/ml)	Proteinase K	-
	Pepsin	-
	Trypsin	-
	Lipase	15±0.12

\*-No zone of inhibition observed





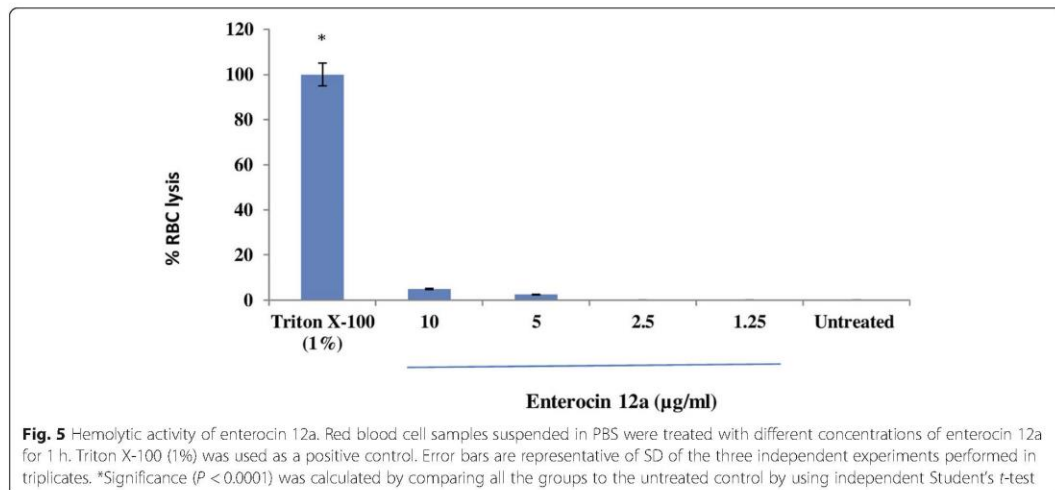
fluorescent cells with an increase in the treatment time as compared to the untreated cells (Fig. 4).

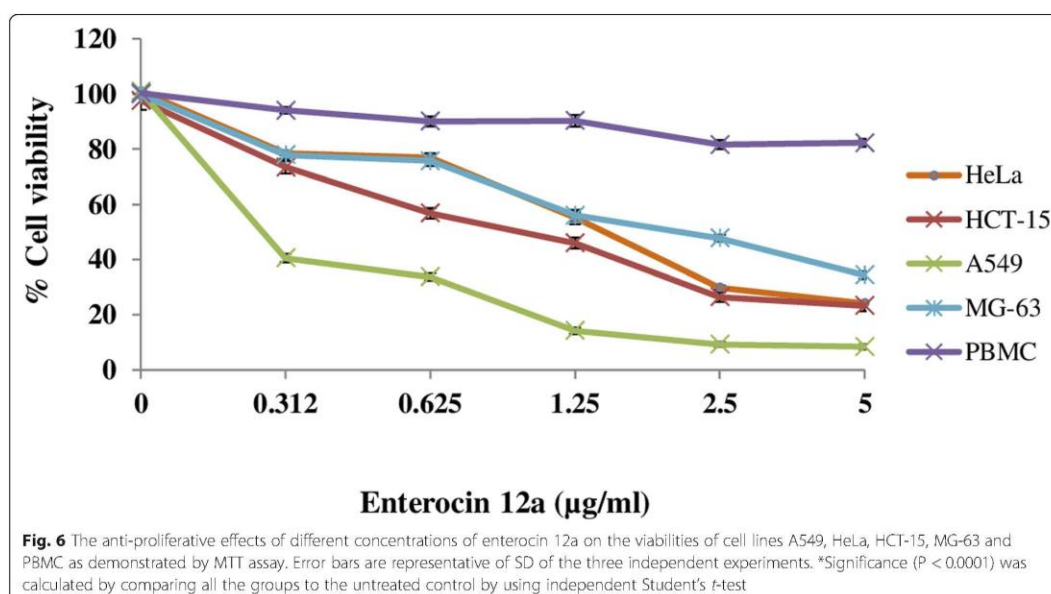
**Hemolytic activity of enterocin 12a**

The toxicity of enterocin 12a was determined by testing its hemolytic activity against human red blood cells (RBCs). Results (Fig. 5) showed that the treatment of RBCs with 2-fold dilutions of enterocin did not result in hemolysis. The percent RBC lysis observed after treatment with 10 and 5 µg/ml of enterocin was 4.5 and 2.5%, respectively which was not significant ( $p < 0.0001$ ) as compared to the untreated RBCs. On the other hand, treatment with 1% Triton X-100 resulted in complete RBC lysis (Fig. 5).

**Anti-proliferative activity of enterocin 12a**

Evaluation of the antiproliferative activities of purified enterocin 12a on the cancer cell lines such as cervical cancer cell line, HeLa; colonic epithelial cell line, HCT-15; lung cancer cell line, A549 and osteosarcoma cell line, MG-63 was done using MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium) assay. Enterocin 12a inhibited the growth of all the cell lines in a dose-dependent manner (Fig. 6). At the highest dose of 5 µg/ml, enterocin 12a reduced the viabilities of A549, HeLa, HCT-15, and MG-63 to 8.4, 24.1, 23.2 and 34.3% respectively (Fig. 6). The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values of the enterocin 12a for A549, HeLa, HCT-15, and MG-63 cell lines was calculated as 0.08, 1.54, 1.07 and 2.1 µg/ml, respectively. The antiproliferative





effect of enterocin 12a against normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was also determined. The residual viability of PBMCs after treatment with enterocin 12a was 82.2% that was not significant ( $p < 0.05$ ) as compared to the untreated control (Fig. 6).

#### Microscopic detection of morphological changes in the CS-treated cell lines

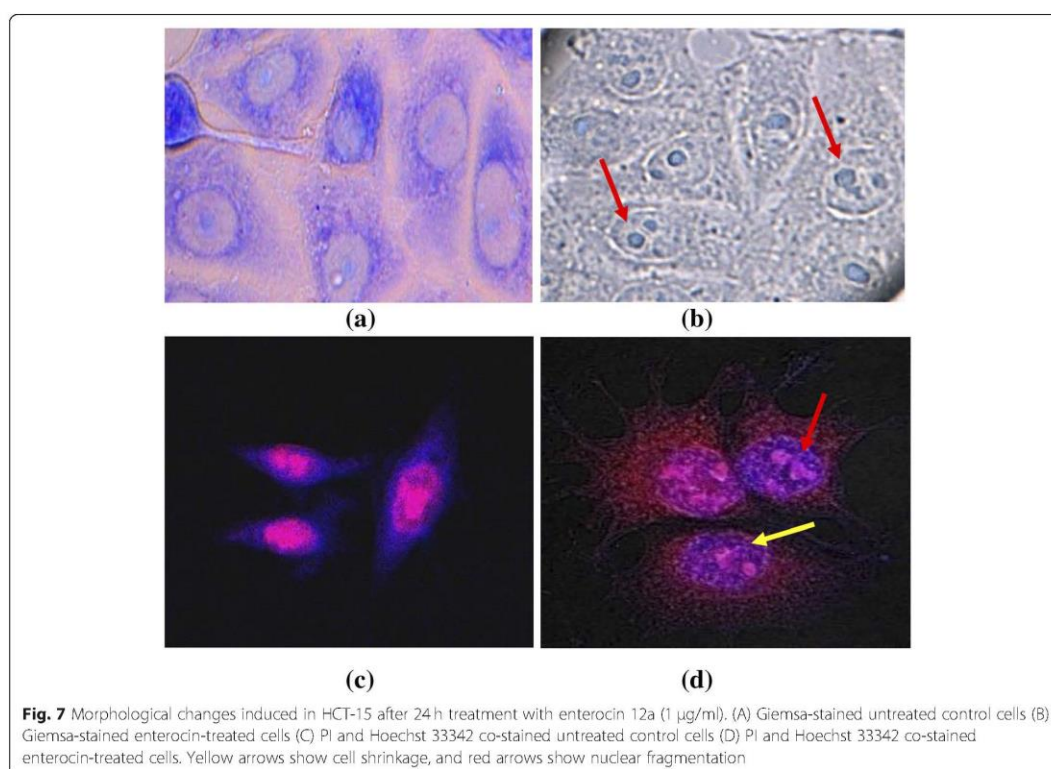
Further, to study the mode of antiproliferative activity of enterocin 12a, morphological changes of enterocin 12a-treated HCT-15 cells were studied by bright field and fluorescent microscopy. Most of the cells in the control untreated sample remained viable with normal cell morphology having a clear outline of the cell membrane and nucleus (Fig. 7a and c). On the other hand, cells treated with enterocin 12a showed morphological changes typical of apoptosis (Fig. 7b and d). Enterocin 12a-treated and Giemsa-stained cells (Fig. 7b) showed chromatin condensation and nuclear fragmentation. Similarly, cells stained with fluorescent dyes, PI and Hoechst 33342 (7D) showed cell shrinkage and nuclear fragmentation.

#### Discussion

Eighty percent of the patients with hematologic malignancies and 10–15% of the patients with solid tumors develop infections associated with neutropenia following more than one chemotherapy cycle [15]. Many studies have shown the benefits of using antimicrobials in conjunction with anticancer agents in reducing the mortality

rate in cancer patients [3]. Thus, in this study, a novel enterocin 12a having selective anticancer activities against malignant cells was purified and characterized. *E. faecium* 12a was selected for the purification of enterocin as it possessed broad-spectrum antimicrobial activity, good probiotic properties, and did not harbor genes for known virulence factors as shown in our previous study [16]. Enterocin 12a was characterized as a novel high molecular weight protein that inhibited several Gram-negative pathogens but had no activities against Gram-positive bacteria such as *St. pyogenes*, *Staph. aureus* and commensal lactobacilli, except *L. monocytogenes*. Among the already known enterocins of *E. faecium*, enterocin E-760 [17], T1 [18], enterocin A and B [19] were known to exhibit antimicrobial activities against Gram-negative bacteria; however, all of them had molecular weights of less than 10 kDa. Secondly, their antimicrobial spectrum differed from enterocin 12a, as they all inhibited *Staph. aureus*. Enterocins A and B also inhibited several strains of lactobacilli. Other enterocins of *E. faecium* such as AS48 and enterocin P [20] inhibited Gram-positive bacteria only. AS48 was shown to inhibit Gram-negative bacteria only in combination with treatments that disrupted the outer membrane of Gram-negative bacteria such as the use of EDTA, tripolyphosphate, polymyxin B, or pulsed electric fields [21].

Further, both the CS and the purified enterocin inhibited *S. enterica*, *Sh. flexneri*, *Esc. coli*, and *V. cholerae*, all of which cause serious food or waterborne gut infections such as enteric fever and diarrhea [22]. However, in the



case of *M. smegmatis*, the CS but not the purified enterocin exhibited the antimicrobial activity. This indicated that non-proteinaceous substances present in the CS might be responsible for the antimicrobial activity against *M. smegmatis*. The antibiotic sensitivity profiles of the pathogenic indicator strains such as *S. enterica* (Supplementary Table 1), *Esc. Coli* (Supplementary Table 2), *Sh. flexneri* (Supplementary Table 3) and *V. cholerae* (Supplementary Table 4) used in the study revealed that all the four isolates were multi-drug resistant (MDR) pathogens as they exhibited resistance to at least one antibiotic in more than one antibiotic class [23]. Thus, considering the paucity of new antimicrobials against the MDR strains of Gram-negative pathogens [24], both *E. faecium* 12a and its enterocin should be further tested for their clinical efficacies in vivo infection models.

The kinetics of cumulative production of enterocin produced by *E. faecium* 12a in the MRS media was studied. Like other bacteriocins, enterocin 12a followed primary metabolite production kinetics [25], as it appeared in the CS in the early logarithmic phase and peaked in the late-log phase. Its concentration in the CS remained

stable till 20 h, after which it decreased by 2-fold. The decrease in the antimicrobial activity of CS may be due to the expression of transmembrane immunity proteins that inactivate enterocin and protects the producer cells from autolysis as observed in the case of enterocin P [20] and cytolysin [26].

The physicochemical characterization of enterocin 12a showed that it completely lost its antimicrobial activity on treatment with all the 3 proteolytic enzymes, thereby showing its proteinaceous nature. Further, the exposure of enterocin 12a to the temperature of 100 °C for more than 15 min resulted in complete abrogation of its antimicrobial activity. As most of the heat-stable enterocins are resistant to temperatures as high as 121 °C, enterocin 12a can be considered heat-labile. Owing to its heat-labile nature and high molecular weight, enterocin 12a may be classified as class IV enterocin [27]. Enterocin 12a was also found to be resistant to pH ranging between 2 and 10, and all the tested organic solvents.

High molecular weight enterocins were earlier reported from various strains of *E. faecalis* viz., enterolysin A 34 kDa [28], bacteriocin 41 64.5 kDa [29], EF478 45 kDa [30]; and anti-*Candida* protein 43 kDa [31].

However, in the case of *E. faecium*, a single report showed the production of two high molecular weight bacteriocins (55 and 65 kDa) from the strain *E. faecium* ICIS<sub>7</sub>. The enterocins of *E. faecium* ICIS<sub>7</sub> were shown to bear no similarities with the previously reported proteins in the protein databases [32]. In this study, the characterization of enterocin 12a by using mass spectrometry revealed that it shared homology with 48% of 4Fe-4S domain-containing protein of *E. faecalis* R712. Bacterial ferredoxin i.e., 4Fe-4S cluster-containing proteins are mostly acidic proteins that possess a high negative redox potential. They use iron-sulfur clusters as electron distributors in various metabolic pathways [33]. Another study reported the purification of ferredoxin-domain-containing bacteriocins, pectocins M1 and M2 from *Pectobacterium* spp. [34]. Pectocins were shown to be natural modular proteins containing a cytotoxic domain fused to a ferredoxin-like protein that binds to the ferrichrome transporter and causes pore formation in the target cell membrane [35]. Similar natural modular bacteriocins that bind to ferrichrome transporter and cause cytotoxicity of target strains were also reported from *Pseudomonas* spp. [36]. Thus, enterocin 12a might resemble such natural modular antimicrobial proteins reported only in Gram-negative bacteria till date. *E. faecium* in particular are known to possess a high rate of gene recombination [37] that might explain the presence of such natural modular enterocin in *E. faecium* 12a. Furthermore, enterocin 12a appeared to be a membrane-bound protein as it was released in the CS only in the presence of Tween 80-containing MRS media or after low-frequency ultrasonication (120 kHz) of *E. faecium* cells cultured in MRS media without Tween 80 (data not shown). A previous study has also shown that the use of Tween 80 in the broth media resulted in an 8-fold increase in the concentration of lacticin RM in the CS [38].

Further, the mode of the antimicrobial activity of enterocin 12a was studied by flow cytometry. Results showed that the treatment of *S. enterica* cells with the purified enterocin rapidly killed the cells by altering their cell membrane permeability as evidenced by 71.7 and 91.7% increase in PI fluorescence within 15 and 30 min, respectively. These results are similar to those reported for other bacteriocins such as nisin [39] and lacticin F [40].

Enterocin 12a inhibited the proliferation of all the tested cancer cell lines in a dose-dependent manner. Another enterocin i.e., enterocin A was earlier shown to reduce the viabilities of human cancer cell lines viz., HeLa, HT-29, AGS, and Caco-2 selectively by 60% at the maximum dose of 120 µg/ml [41]. However, as compared to enterocin-A, 12a appeared to be more potent as it reduced the viabilities of all the tested cell lines in the range 64–90% at a maximum dose of 5 µg/ml. Other

purified bacteriocins such as pediocin PA-1 [42], plantaricin A [43], nisin ZP [44], and nisin [45] purified from LAB genera were also shown to inhibit the in vitro proliferation of human cancer cells. Nisin was shown to selectively inhibit cancer cell lines and not the normal cells [42]. Another redox bacteriocin, azurin, secreted by *P. aeruginosa* was shown to have antiproliferative effects against murine [46] and human cancer cell lines [47]. A non-toxic fragment of azurin, p28 was approved by the FDA for the treatment of malignant brain tumor, glioma [48].

Enterocin 12a was found to have negligible antiproliferative effects against human PBMCs and membranolytic effects on RBCs at the same tested doses as that of cancer cells. The selective anti-proliferative activity could be explained based on the differences between the cell membrane of cancer cells from that of normal cells. As compared to the normal cells, cancer cells are known to have increased cell membrane negative charge [49, 50], higher membrane fluidity [51], and the number of microvilli [52] which may result in enhanced binding of bacteriocins to the cell surface of the cancer cells. An attempt to study the mechanism of anticancer activity of enterocin 12a by using confocal microscopy revealed that the treatment of all the tested cancer cell lines with enterocin 12a resulted in apoptosis-like morphological changes as evident by cell shrinkage, chromatin condensation, and nuclear fragmentation [53]. Similar morphological effects on cancer cells were reported in the case of other bacteriocins such as nisin ZP [44] and azurin [54]. Cancer cells are known to possess increased amounts of negatively charged phospholipids [49, 50] on their outer cell membrane leaflet. Therefore, the anticancer effects of the enterocin 12a might be due to its cell membrane-permeabilizing effect similar to other bacteriocins [43]. However, the exact molecular mechanism of anticancer activity is under investigation.

In conclusion, these results suggest that human vaginal commensal *E. faecium* 12a secreted a novel enterocin 12a that inhibited the MDR strains of Gram-negative pathogens and also selectively inhibited the proliferation of cancer cell lines. Bacteriocin-secreting enterococci were shown to have a survival advantage in the gut, for example, bacteriocin 21-producing *E. faecalis* strain was able to persist for a longer time in the gut of mice by successfully replacing the indigenous enterococci including vancomycin-resistant strains, as compared to the strain that lacked the bacteriocin gene [55]. Thus, the therapeutic potential of both *E. faecium* 12a and its enterocin for the treatment of MDR strains of Gram-negative pathogens needs further investigation. Further, the study highlighted the functional property of a human vaginal commensal *E. faecium* that might play a role in protection against cervical cancer. Thus, the role of *E. faecium* 12a and its enterocin in protection against cancer in various in vivo models should also be explored.

## Methods

### Bacterial strains

*E. faecium* 12a used for the purification of enterocin 12a was isolated from the vaginal swab sample of the healthy pre-menopausal woman and characterized in the previous study [15]. *Lactobacillus* spp. of fecal origin used in the study was gifted by one of the authors (Sukhraj Kaur). The LAB strains were cultured in MRS media and incubated at 37 °C in anaerobic jars for growth. The bacterial growth media and the chemicals used in the study were mostly (except where mentioned), purchased from HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India.

The pathogenic bacterial strains used in this study were procured from Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of Microbial Technology, Chandigarh, India. The indicator pathogenic bacteria such as *Esc. coli* MTCC 119, *P. aeruginosa* MTCC 741, *Sh. flexneri* MTCC 1457, *V. cholerae* MTCC 3906, *S. enterica Typhimurium* MTCC 733, *Lis. monocytogenes* MTCC 657, *St. pyogenes* MTCC 1927 and *Staph. aureus* subsp. *aureus* MTCC 96 were cultured in Brain Heart Infusion (BHI) broth at 37 °C under aerobic stationary conditions. Whereas, *M. smegmatis* MTCC 6 was cultured in Middlebrook 7H9 broth supplemented with bovine serum albumin fraction V and Tween 80 under aerobic conditions at 37 °C.

### Agar gel diffusion assay

The antimicrobial activities of CS and purified enterocin 12a were determined against various pathogenic and commensal lactobacilli strains by agar gel diffusion assay [56]. To prepare the CS, the overnight grown culture of *E. faecium* 12a was centrifuged (Benchtop Refrigerated centrifuge; Sigma 3 K30), at 9000×g for 10 min at 4 °C. The supernatant obtained was filter-sterilized by passing through a 0.22 µm filter, and the antimicrobial activity of the CS was determined after adjusting its pH to 6.5.

### Growth curve and kinetics of production of antimicrobial substance

To study the growth curve and kinetics of bacteriocin production by *E. faecium* 12a, MRS media was inoculated with 2% overnight grown culture of *E. faecium* and incubated at 37 °C in anaerobic jars. The growth of the culture was measured by reading its absorbance at 595 nm after every 2 h. Simultaneously, the antimicrobial activity of the CS was determined by agar gel diffusion assay against the indicator bacteria *S. enterica* MTCC 733. The antimicrobial activity of CS was expressed in AU/ml, which is defined as the reciprocal of the highest dilution showing inhibition of the indicator lawn.

### Purification of enterocin 12a

Enterocin 12a was purified from the ammonium sulfate precipitates of the CS of *E. faecium* 12a by cation-exchange and RP-HPLC methods. For ammonium sulphate precipitation, 1 l of MRS broth was inoculated with overnight grown culture (2%) of *E. faecium* 12a and incubated at 37 °C for 16 h in anaerobic jars. The culture was centrifuged (9000×g) at 4 °C to obtain CS, and the enterocin was precipitated using 80% (w/v) saturated ammonium sulfate with continuous stirring at 4 °C for 18 h. Precipitated protein pellets were collected by centrifugation (9000×g) and dissolved in sodium acetate buffer (20 mM; pH 4.5). The dissolved precipitates were desalted by passing through Biogel PD-10 column (GE HealthCare, USA), equilibrated and eluted with sodium acetate buffer (20 mM; pH 4.5). The pooled desalted fractions were loaded onto SP-Sepharose Fast Flow cation-exchange column (50×10 mm; GE Healthcare) and eluted with a linear salt gradient of 0.1 to 1 M NaCl in sodium acetate buffer (20 mM; pH 4.5). The active fractions obtained from SP-Sepharose were pooled, lyophilized, resuspended in HPLC grade water, filtered (0.2 µm pore size) and loaded on the C<sub>18</sub> HPLC column (Shimadzu Microsorb MV, 100×10 mm ID, 10 µm). Fractions were eluted with 0.01% trifluoroacetic acid-containing solution of water and acetonitrile in the ratio 30:70 (v/v). The flow rate was maintained at 3 ml/min, and the eluted fractions were monitored by a photodiode array detector at 214 nm. Fractions were collected, concentrated using rotavapour (Buchi, USA) and dissolved in MilliQ water. The antimicrobial activities and protein concentration [57] of the purified fractions were determined after each step of enterocin purification. For all the experiments HPLC fractions were concentrated, pooled and dissolved in appropriate solvent before using.

### Determination of molecular weight and gel overlay assay

To determine the molecular weight of the purified enterocin, denaturing polyacrylamide gel electrophoresis was carried out by using 6% stacking and 15% (w/v) separating gel [58]. The samples and the molecular weight marker (BioRad, USA) were loaded into the wells of the gel. Electrophoresis was carried out at 120 V and lanes of the gel were cut. One lane of the gel was stained with silver nitrate (SRL, India) and the other lane of the gel was used for the overlay assay against *S. enterica* [59]. For the gel overlay assay, BHI soft agar inoculated with *S. enterica* was overlaid onto the lane of the gel, incubated at 37 °C for 24 h, and the zone of inhibition was observed.

### MALDI TOF/TOF mass spectrometry (MS)

For characterization of enterocin, silver-stained gel bands were destained, trypsinised and extracted before

subjecting to MALDI-TOF/TOF-Proteomics Analyzer (UltrafleXtreme mass spectrometer; Bruker Daltonics Inc. Germany). Positive ion reflector mode with a mass range from 700 to 3500 Da was used for recording the TOF spectra. For each spectrum 500 shots were accumulated. Two most abundant peptide ions were then subjected to fragmentation analysis. A combined search (MS + LIFT-MS/MS) was performed in database of protein using BioTools 3.0 software (Bruker Daltonics Inc. Germany) and MASCOT (Version 2.1, Matrix Science, London, UK), and searched against all entries in the NCBI nr protein databases. The parameters used for the search were as follows: taxonomy, Firmicutes; enzyme, trypsin; the fixed modification, carbamidomethyl (C); the variable modification, Glu->pyro-Glu (N-term Q) and oxidation (M); parent ion mass tolerance at 50 ppm and MS/MS mass tolerance of 0.7 Da; one missed cleavage allowed. The identified proteins among the top hit on the search report with individual ions scores > 44 indicated identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).

#### Physico-chemical characterization of purified enterocin 12a

The physico-chemical characterization of purified enterocin 12a (1 µg/ml) dissolved in MilliQ water was carried out. The thermostability of enterocin 12a was determined by incubating it at different temperatures for various time intervals and then determining the residual antimicrobial activity by agar gel diffusion assay. The pH sensitivity of enterocin was determined by setting its pH to values ranging from 2 to 10 and incubating at 37 °C for 1 h. The pH was again set to 6.5 before determining the residual antimicrobial activity. The stability of enterocin 12a to different solvents was determined by incubating it with various organic solvents at 50% v/v for 1 h at ambient temperature. The solvents were removed by vacuum concentration on a rotavapour before determining the residual antimicrobial activity. To study the effect of enzymes on enterocin activity, purified enterocin 12a (1 µg/ml) was treated with different enzymes (proteinase K, pepsin, trypsin, and lipase; Sigma Aldrich, India) at the final concentration of 1 mg/ml for 1 h at 37 °C. The enzymes proteinase K and lipase were dissolved in 100 mM tris-HCL buffer (pH 8.0); whereas for pepsin and trypsin treatment of enterocin, the enzymes were dissolved in 1 mM HCl and enterocin was dissolved in 100 mM tris-HCL buffer (pH 8.0) and the enzyme to protein solution were mixed in the ratio 1:100. After 1 h, enzymes trypsin, pepsin were deactivated by heating at 60 °C for 10 min and the enzymes proteinase k and lipase were inactivated at the temperature of 80 °C for 10 min. The residual antimicrobial activity of enterocin 12a was then determined.

#### Effect of enterocin 12a on the cell membrane permeability

Cell permeabilising effects of enterocin 12a on *S. enterica* cells was determined by using flow cytometry with slight modifications [60]. Briefly, *S. enterica* cells suspended in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml were treated with Enterocin 12a (5 µg/ml) dissolved in MilliQ water for different time intervals. Following incubation, the cell suspensions were centrifuged, washed and suspended in PBS and thereafter stained with PI (1.0 µg/ml) by incubating for 15 min at 4 °C in the dark. The changes in the fluorescence of the cells was detected by using Flow cytometer (Accuri C6 Flow Cytometer) in the FL2 channel and the data were analyzed using C Flow Plus software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Simultaneously, ten microlitres of PI-stained cell suspension were placed on glass slides in duplicates and fixed with 5 µl Fluorimount solution (Sigma). The fixed cells on the glass slides were viewed under a confocal microscope (Nikon, A1R).

#### Safety evaluation by hemolytic activity

Hemolytic activity of enterocin 12a dissolved in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) was measured spectrophotometrically by hemoglobin release assay [61]. RBCs were isolated from the blood of healthy individuals above the age of 18 yrs. after taking their written informed consent. The protocol was approved by the Institutional Human Ethics Committee of Guru Nanak Dev University, Amritsar, and performed by following the guidelines of the Ethics Committee. Briefly, RBC cell suspension was incubated with different concentrations of enterocin 12a at 37 °C for 1 h. RBC treated with 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich), and PBS were used as positive and negative controls, respectively. Hemoglobin release was monitored in the cell supernatant by taking absorbance at 415 nm. The percentage RBC lysis was calculated by using the equation:  $(A_T - A_C) / (A_X - A_C) \times 10$ ; Where  $A_T$  is the absorbance of wells containing enterocin 12a-treated RBC,  $A_C$  is the absorbance of negative control well having PBS treated-RBC, and  $A_X$  is the absorbance of positive control well containing 1% Triton X100- treated RBC.

#### Assessment of antiproliferative activity of enterocin 12a

MTT assay was used to determine the anti-proliferative activity of enterocin 12a against human cancer cell lines such as HeLa, HCT-15, A549, MG-63, and normal human PBMCs. All the cell lines were procured from National Centre for Cell Science, Pune, India. PBMCs were isolated from the blood of healthy individuals above the age of 18 yrs. after taking their written informed consent. The protocol was approved by the Institutional Human

Ethics Committee of Guru Nanak Dev University, Amritsar, India, and performed by following the guidelines of the Ethics Committee. To isolate the PBMCs, density-gradient centrifugation of the blood was done by using Ficoll hypaque [62].

MTT assay was performed according to the protocol described previously [16, 63]. Briefly, cells diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum were seeded at the concentration  $4 \times 10^5$  cells/ml in 96-well microtitre plate and incubated for 48 h at 37 °C; 5% CO<sub>2</sub>. Two-fold serial dilutions of purified enterocin 12a dissolved in filter sterilised (0.2 µ pore size) DMEM at concentrations ranging between 5.0 to 0.312 µg/ml were added to the wells and the plate was again incubated for 24 h. The cells were then treated with 100 µl of 0.5 mg/ml MTT (Sigma Aldrich) for 4 h at 37 °C. MTT-containing medium was discarded and 100 µl of dimethyl sulfoxide was added to the wells to dissolve the formazan crystals. The absorbance of the wells was measured at 570 nm on 96-well microplate reader (Synergy™ HT, Bio-Tek Instruments, Inc.). The cells without enterocin were used as controls. The percentage viability of cells was assessed according to the following formula:

$$\text{Percentage cell viability} = \frac{\text{Absorbance of enterocin-treated wells}}{\text{Absorbance of untreated control wells}} \times 100$$

#### Apoptosis detection by colorimetric and fluorescent staining

Apoptosis of eukaryotic cells is characterized by morphological changes such as cell shrinkage, chromatin condensation, and nuclear fragmentation [64]. Thus, to study the effect of enterocin 12a on cell morphology,  $1.2 \times 10^6$  HCT-15 cells were cultured on coverslips placed in 6-well tissue culture plate (Costar, USA) at 37 °C; 5% CO<sub>2</sub>. After 24 h, the cells were treated with 1 µg/ml of enterocin 12a and again incubated at 37 °C; 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. After that, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, washed with PBS (pH 7.2) and co-stained with Hoechst 33342 (1 µg/ml; Sigma Aldrich) and PI (5 µg/ml) for 15 min. Separate sets of wells were stained with Giemsa (1:9; Merck, Darmstadt, Germany) for 20 min. The stained cells on the coverslips were viewed under the confocal microscope (Nikon, A1R).

#### Statistical analysis

Data in all the experiments are representative of three experiments performed in triplicates. Data were analyzed by independent Student's *t*-test by using SPSS17.0. Significant differences of means were compared through independent Student's *t*-test by using SPSS17.0. Individual *p* values for each data set are indicated in each figure.

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02086-5>.

**Additional file 1 Supplementary Fig. 1.** Silver-stained SDS-PAGE gel showing the bands of partially purified enterocin 12a obtained after SP Sepharose cation-exchange chromatography.

**Additional file 2 Supplementary Fig. 2.** Silver-stained SDS-PAGE gel showing a single band of purified enterocin 12a obtained after reverse phase- HPLC

**Additional file 3 Supplementary Fig. 3.** Agar gel overlay assay of SDS-PAGE gel containing purified enterocin 12a band.

**Additional file 4 Supplementary Table 1:** Antibiotic susceptibility profile of *S. enterica* MTCC 733

**Additional file 5 Supplementary Table 2.** Antibiotic susceptibility profile of *Esc. coli* MTCC119

**Additional file 6 Supplementary Table 3.** Antibiotic susceptibility profile of *Sh. flexneri* MTCC1457

**Additional file 7 Supplementary Table 4:** Antibiotic susceptibility profile of *V. cholerae* MTCC 3906

#### Abbreviations

CS: culture supernatant; MRS: de Man Rogosa and Sharpe medium; RBCs: red blood cells; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PI: propidium iodide; MDR: multi-drug resistant; PBS: phosphate-buffered saline; AU/ml: arbitrary units per ml; RP-HPLC: reverse-phase high-performance liquid chromatography; U-HPLC: ultra-high-performance liquid chromatography

#### Acknowledgements

Dr. Preeti Sharma is thankful to the University of Potential for Excellence scheme of UGC for the fellowship. Dr. Sumanpreet Kaur is thankful to UGC for the fellowship.

#### Authors' contributions

SK conceived the idea and supervised the experiments. PS and SK designed the experiments and PS performed all of the experiments except MTT assay. RK and MK designed and performed the MTT assay. SPK performed cell line staining and confocal microscopic experiments. BSC designed the purification experiments. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

This work was supported by a research grant (grant number: 42-478/2013 SR) sponsored by University Grants Commission (UGC), New Delhi, India. The funding bodies had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

#### Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

#### Ethics approval and consent to participate

For RBCs isolation, the blood of healthy individuals above 18 yrs. of age was drawn after taking their written informed consent. The protocol was approved by the Institutional Human Ethics Committee, Guru Nanak Dev University, and performed in accordance with the guidelines of the Ethics Committee.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Guru Nanak Dev University, Amritsar, Punjab 143005, India. <sup>2</sup>Department of Molecular Biology and Biochemistry, Guru

Nanak Dev University, Amritsar, Punjab, India. <sup>3</sup>Department of Human Genetics, Guru Nanak Dev University, Amritsar, Punjab, India.

Received: 20 August 2020 Accepted: 10 January 2021  
Published online: 04 February 2021

## References

- International Agency of Research on Cancer [IARC]. World Cancer report. Geneva: World-Health-Organisation; 2018.
- Holland T, Fowler VG Jr, Shelburne SA III. Invasive gram-positive bacterial infection in cancer patients. Clin Infect Dis. 2014;59(Suppl 5):S331–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu598>.
- Alibek K, Bekmurzayeva A, Mussabekova A, Sultankulov B. Using antimicrobial adjuvant therapy in cancer treatment: a review. Infect Agent Cancer. 2012;7(1):33. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-7-33>.
- Rodrigues G, Silva GG, Buccini DF, Duque HM, Dias SC, Franco OL. Bacterial proteinaceous compounds with multiple activities toward cancers and microbial infection. Front Microbiol. 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01690>.
- Cavera VL, Arthur TD, Kashtanov D, Chikindas ML. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. Int J Antimicrob Agents. 2015;46(5):494–501.
- Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. Front Microbiol. 2014;5:683. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for 18 h for food preservation. Int J Food Microbiol. 2001;71:1–20.
- Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocin-antimicrobial synergy: a medical and food perspective. Front Microbiol. 2017;8:1205.
- Hols P, Ledesma-García L, Gabant P, Mignolet J. Mobilization of microbiota commensals and their bacteriocins for therapeutics. Trends Microbiol. 2019; <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.003>.
- Fernández L, Delgado S, Herrero H, Maldonado A, Rodríguez JM. The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of *Staphylococcal* mastitis during lactation. J Hum Lact. 2008;24:311–6. <https://doi.org/10.1177/0890334408317435>.
- Wu J, Hu S, Cao L. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:1313–5.
- Joo NE, Ritchie K, Kamarajan P, Miao D, Kapila YL. Nisin, an apoptosis-inducing bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. Cancer Med. 2012;1:295–05.
- Kaur S, Kaur S. Bacteriocins as potential anticancer agents. Front Pharmacol. 2015;6:272.
- Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. Microb Cell Fact. 2014;13:53. [doi.org/https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-53](https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-53).
- Klastersky J. Management of fever in neutropenic patients with different risks of complications. Clin Infect Dis. 2004;39(Suppl 1):S32–7.
- Sharma P, Kaur S, Kaur R, Kaur M, Kaur S. Proteinaceous secretory metabolites of probiotic human commensal *Enterococcus hirae* 20c, *E. faecium* 12a and L12b as antiproliferative agents against cancer cell lines. Front Microbiol. 2018;9:948.
- Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Pereygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR, Stern NJ. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:1094–100.
- Liu H, Zhang L, Yi H, Han X, Gao W, Chi C, Song W, Li H, Liu C. A novel enterocin T1 with anti-*Pseudomonas* activity produced by *Enterococcus faecium* T1 from Chinese Tibet cheese. World J Microbiol Biotechnol. 2016; 32:21.
- Casaus P, Nilsen T, Cintas L, Nes I, Hernández P, Holo H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin a. Microbiology. 1997;143:2287–94.
- Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS, Hernández PE, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl Environ Microbiol. 1997;63:4321–30.
- Grande Burgos MJ, Pulido RP, López Aguayo DCM, Gálvez A, Lucas R. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. Int J Mol Sci. 2014;15:22706–27.
- Petri WA, Miller M, Binder HJ, Levine MM, Dillingham R, Guerrant RL. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. J Clin Invest. 2008;118:1277–90.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmell Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18:268–81.
- WHO. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including *Mycobacterium tuberculosis*. 2017. WHO/EMP/IAU/2017.11Geneva:WHO.
- De Vuyst L, Callewaert R, Crabbé K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. Microbiology. 1996;142:817–27.
- Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. Toxins. 2013;5:895–911.
- Franz CM, Van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiol Rev. 2007;31:293–310.
- Nilsen T, Nes IF, Holo H. Enterolysin a, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Appl Environ Microbiol. 2003;69:2975–84.
- Kurushima J, Nakane D, Nishizaka T, Tomita H. Bacteriocin protein Bac1 of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala2-cross-bridged peptidoglycan. J Bacteriol. 2015;197:286–95.
- Phumisantiphong U, Siripanchgon K, Reamtong O, Diraphat P. A novel bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 478 exhibits a potent activity against vancomycin-resistant enterococci. PLoS One. 2017;12:e0186415.
- Shekh RM, Roy U. Biochemical characterization of an anti-*Candida* factor produced by *Enterococcus faecalis*. BMC Microbiol. 2012;12:132.
- Vasilchenko AS, Vasilchenko AV, Valyshev AV, Rogozhin EA. A novel high-molecular-mass bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*: biochemical features and mode of action. Probiotics Antimicrob Proteins. 2018;1–8.
- Lill R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. Nature. 2009;460: 831–8.
- Grinter R, Milner J, Walker D. Ferredoxin containing bacteriocins suggest a novel mechanism of iron uptake in *Pectobacterium* spp. PLoS One. 2012;7: e33033.
- Grinter R, Josts I, Zeth K, Roszak AW, McCaughey LC, Cogdell RJ, Milner JJ, Kelly SM, Byron O, Walker D. Structure of the atypical bacteriocin pectocin M2 implies a novel mechanism of protein uptake. Mol Microbiol. 2014;93: 234–46.
- Ghequire MG, Kerland L, Anoz-Carbonell E, Buchanan SK, De Mot R. A natural chimeric *Pseudomonas* bacteriocin with novel pore-forming activity parasitizes the ferrichrome transporter. MBio. 2017;8:e01961–2016.
- de Been M, van Schaik W, Cheng L, Corander J, Willems RJ. Recent recombination events in the core genome are associated with adaptive evolution in *Enterococcus faecium*. Genome Biol Evol. 2013;5:1524–35.
- Keren T, Yarmus M, Halevy G, Shapira R. Immunodetection of the bacteriocin lactacin RM: analysis of the influence of temperature and tween 80 on its expression and activity. Appl Environ Microbiol. 2004;70:2098–04.
- Weeks ME, von Caron GN, James DC, Smales CM, Robinson GK. Monitoring changes in nisin susceptibility of *Listeria monocytogenes* Scott a as an indicator of growth phase using FACS. J Microbiol Methods. 2006;66:43–55.
- Dalmou M, Maier E, Mulet N, Vinas M, Benz R. Bacterial membrane injuries induced by lactacin F and nisin. Int Microbiol. 2002;5:73–80.
- Ankaiah D, Esakkiraj P, Perumal V, Ayyanna R, Venkatesan A. Probiotic characterization of *Enterococcus faecium* por1: cloning, over expression of Enterocin-a and evaluation of antibacterial, anticancer properties. J Funct Foods. 2017;38:280–92.
- Villarante KI, Elegado FB, Iwatani S, Zendo T, Sonomoto K, de Guzman EE. Purification and characterization and *in vitro* cytotoxicity of the bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* K2a2-3 against human colon adenocarcinoma (HT29) and human cervical carcinoma (HeLa) cells. World J Microbiol Biotechnol. 2011;27:975–80.
- Sand SL, Nissen-Meyer J, Sand O, Haug TM. Plantaricin a, a cationic peptide produced by *Lactobacillus plantarum*, permeabilizes eukaryotic cell membranes by a mechanism dependent on negative surface charge linked

- to glycosylated membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1828;2013:249–59.
44. Kamarajan P, Hayarni T, Matte B, Liu Y, Danciu T, Ramamoorthy A, Worden F, Kapila S, Kapila Y, Nisin ZP, a bacteriocin and food preservative, inhibits head and neck cancer tumorigenesis and prolongs survival. *PLoS One*. 2015; 10:e0131008.
  45. Joo NE, Ritchie K, Kamarajan P, Miao D, Kapila YL, Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHACT1. *Cancer Med*. 2012;1:295–05.
  46. Yamada T, Goto M, Punj V, Zaborina O, Kimbara K, Gupta TD, Chakrabarty AM. The bacterial redox protein azurin induces apoptosis in J774 macrophages through complex formation and stabilization of the tumor suppressor protein p53. *Infect Immun*. 2002;70:7054–62.
  47. Yang DS, Miao XD, Ye ZM, Feng J, Xu RZ, Huang X, Ge FF. Bacterial redox protein azurin induce apoptosis in human osteosarcoma U2OS cells. *Pharmacol Res*. 2005;52:413–21.
  48. Chakrabarty AM. Bacterial azurin in potential cancer therapy. *Cell Cycle*. 2016;15:1665–7.
  49. Dobrzyńska I, Szachowicz-Petelska B, Figaszewski Z, Sulkowski S. Changes in electric charge and phospholipid composition in human colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2005;276:113–9.
  50. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochem Biophys Acta*. 2008;1778:357–75.
  51. Sok M, Sentjurs M, Schara M. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer Lett*. 1999;139:215–20.
  52. Chaudhary J, Munshi M. Scanning electron microscopic analysis of breast aspirates. *Cytopathology*. 1995;6:162–7.
  53. Leite M, Quinta-Costa M, Leite PS, Guimarães JE. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death-study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. *Anal Cell Pathol*. 1999;19:139–51.
  54. Punj V, Bhattacharyya S, Saint-Dic D, Vasu C, Cunningham EA, Graves J, Yamada T, Constantinou AI, Christov K, White B, Li G. Bacterial cupredoxin azurin as an inducer of apoptosis and regression in human breast cancer. *Oncogene*. 2004;23:2367–78.
  55. Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, Chakraborty R, Hayward M, Simpson P, Cao Y, Bousounis P, Kristich CJ, Salzman NH. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*. 2015;526:719–22.
  56. Geis A, Singh J, Teuber M. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl Environ Microbiol*. 1983;45:205–11.
  57. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
  58. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.
  59. Dezwaan DC, Mequio MJ, Littell JS, Allen JP, Rossbach S, Pybus V. Purification and characterization of enterocin 62-6, a two-peptide bacteriocin produced by a vaginal strain of *Enterococcus faecium*: potential significance in bacterial vaginosis. *Microb Ecol Health Dis*. 2007;19:241–50.
  60. Chopra L, Singh G, Jena KK, Sahoo DK. Sonorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Sci Rep*. 2015; 5:13412.
  61. Paiva AD, de Oliveira MD, de Paula SO, Baracat-Pereira MC, Breukink E, Mantovani HC. Toxicity of bovicin HCS against mammalian cell lines and the role of cholesterol in bacteriocin activity. *Microbiology*. 2012;158:2851–8.
  62. Hesse C, Andersson B, Wold AE. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun*. 2000;68:3581–6.
  63. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63.
  64. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495–16.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

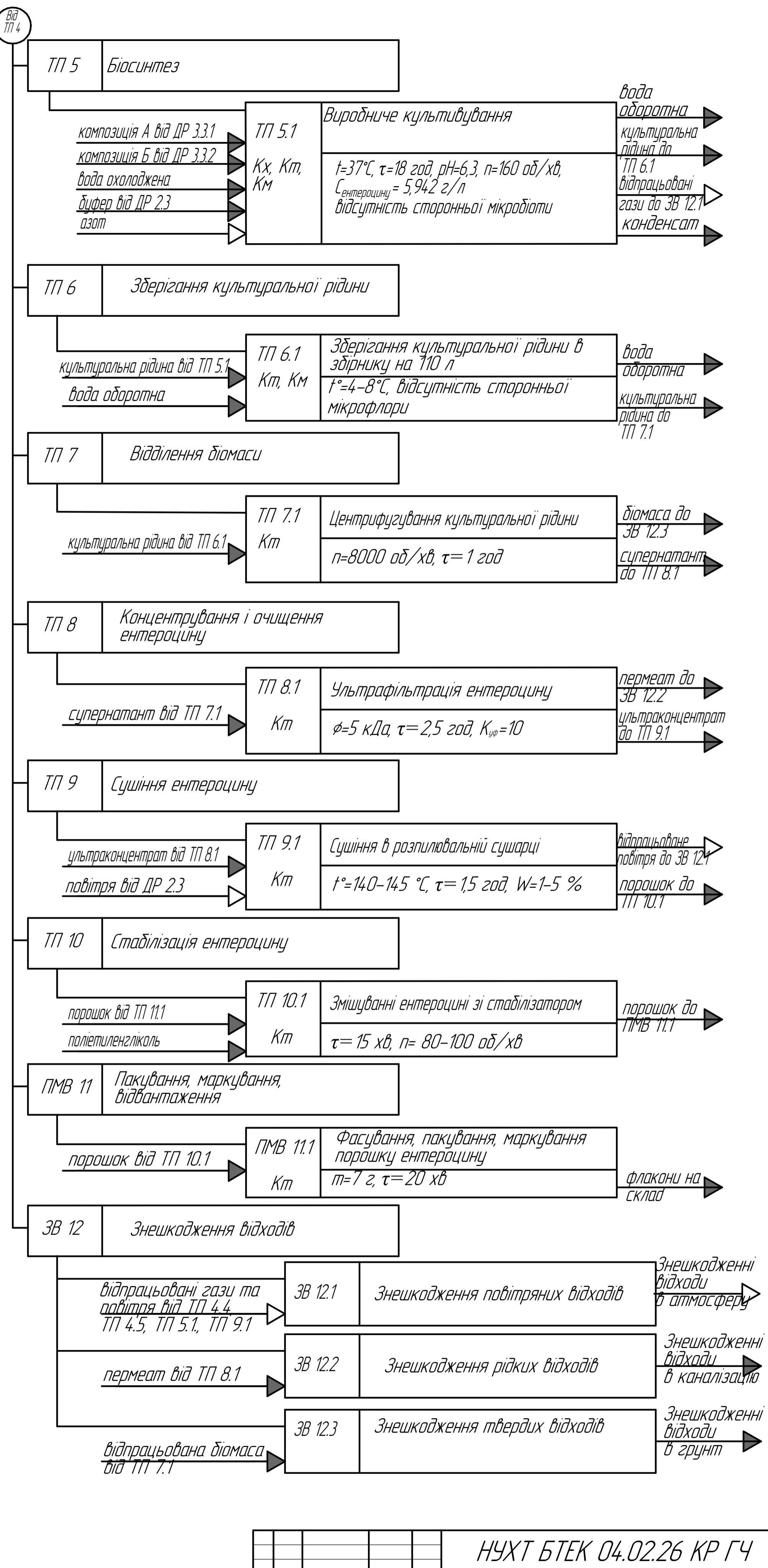
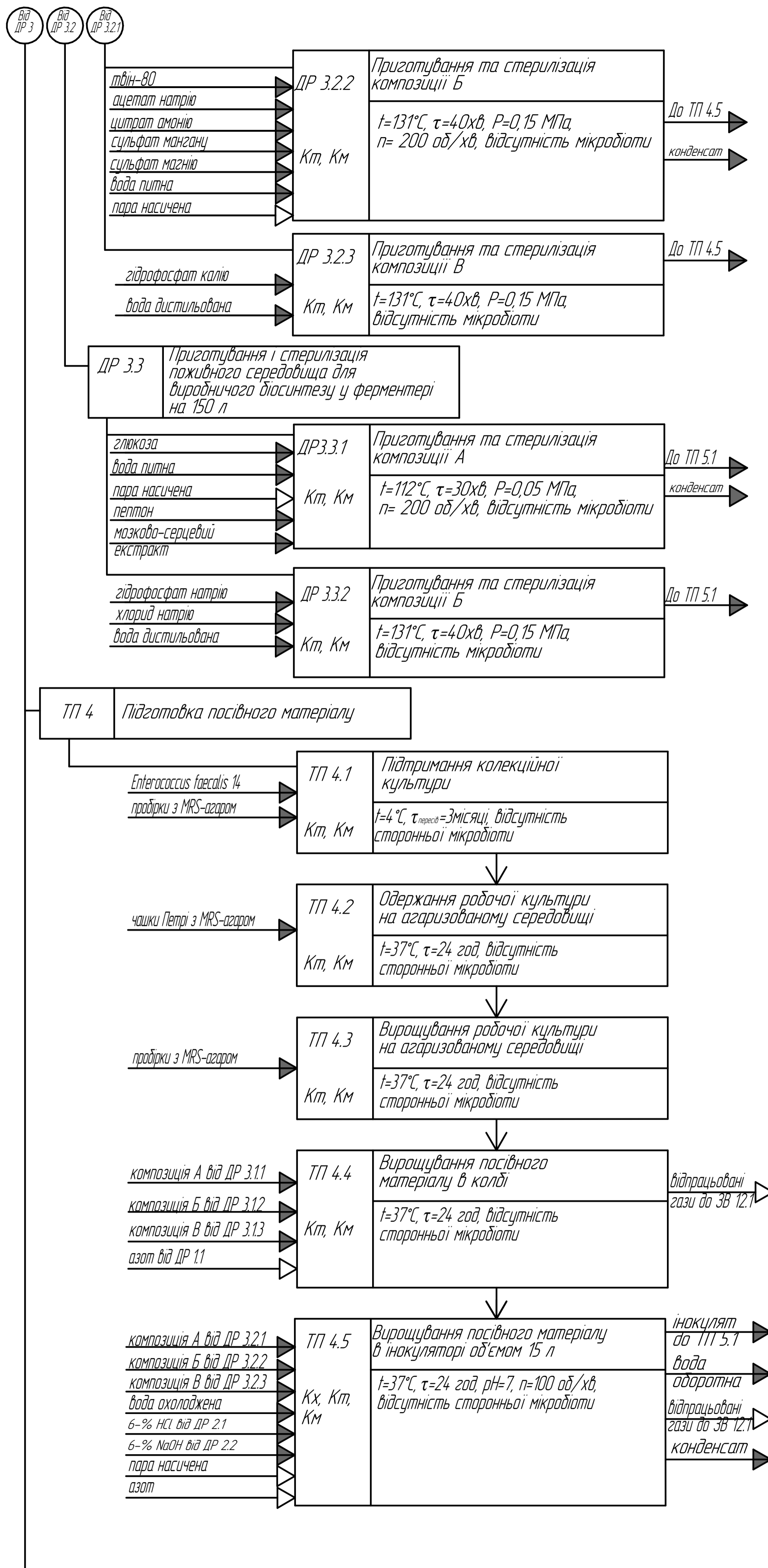
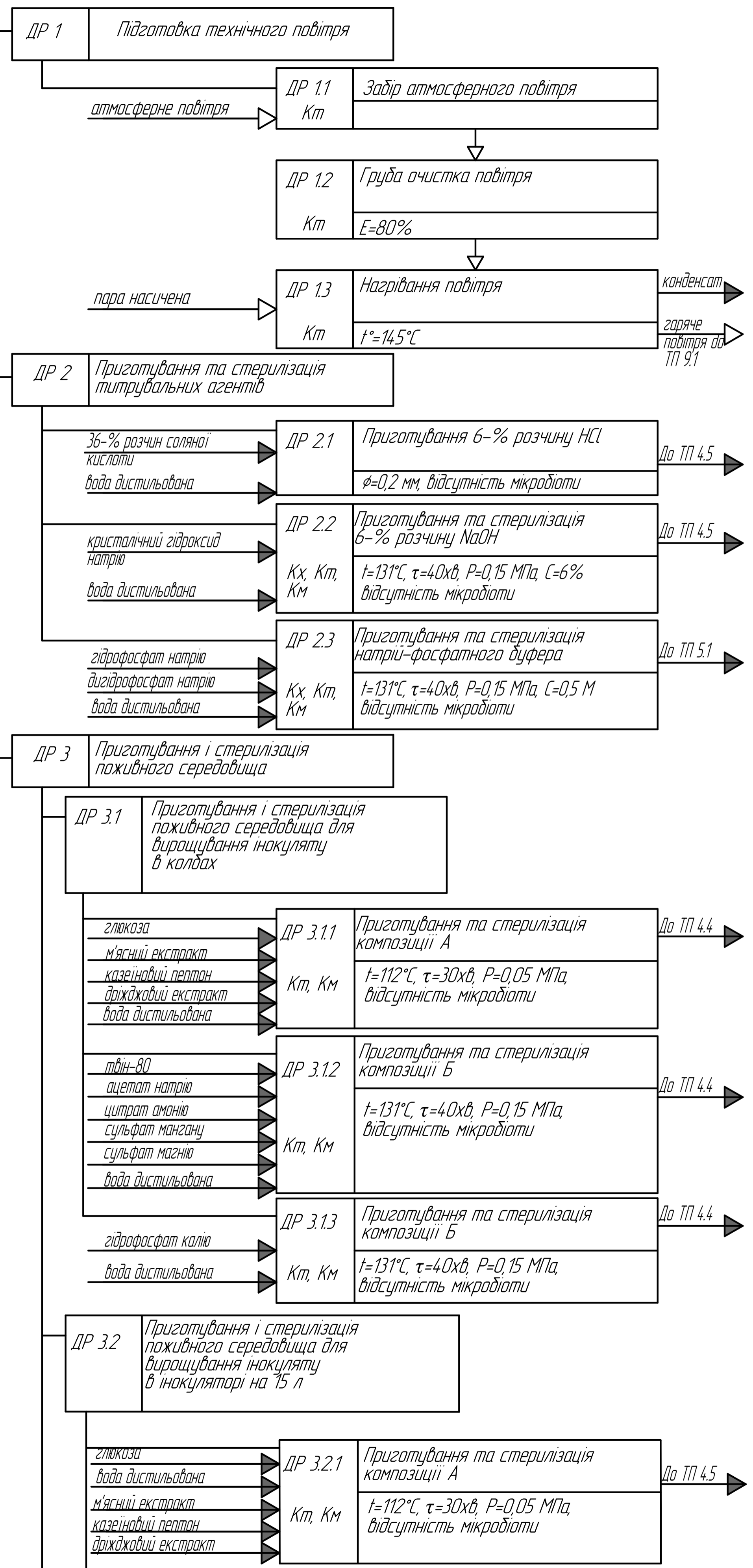
**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)

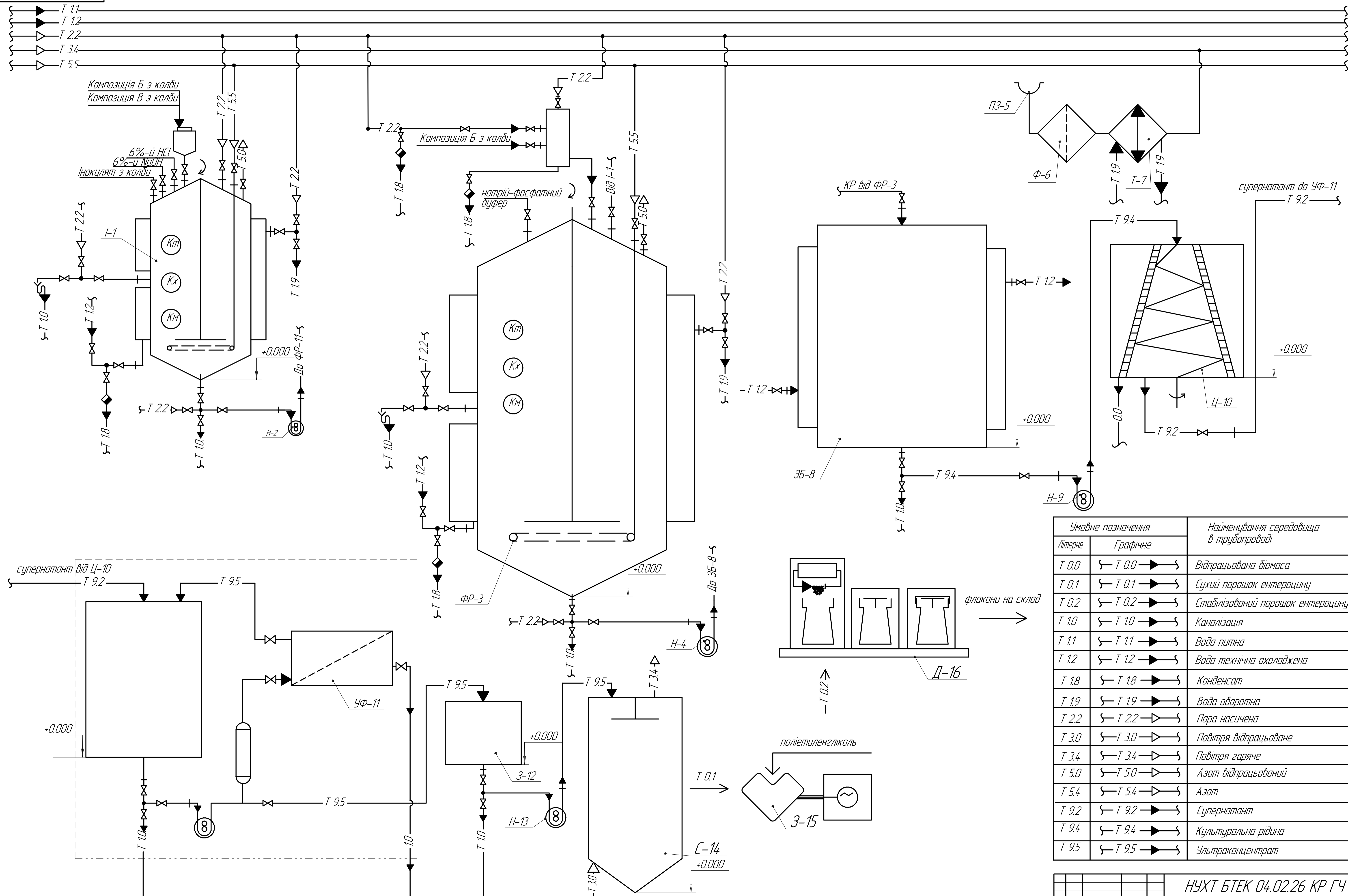




Лист, приміч.  
 Стор. №  
 Листів у діалогі  
 Листів у діалогі  
 Листів у діалогі

До ТП 4, До DR 3.3, До DR 3.2.2

До ТП 5



Умовне позначення		Найменування середовища в трубопроводі
Літерне	Графічне	
T 0.0	↔ T 0.0 ↔	Відпрацьована біомаса
T 0.1	↔ T 0.1 ↔	Сухий порошок ентероцину
T 0.2	↔ T 0.2 ↔	Стабілізований порошок ентероцину
T 10	↔ T 10 ↔	Каналізація
T 11	↔ T 11 ↔	Вода питна
T 12	↔ T 12 ↔	Вода технічна охолоджена
T 18	↔ T 18 ↔	Конденсат
T 19	↔ T 19 ↔	Вода оборотна
T 2.2	↔ T 2.2 ↔	Пара насичена
T 3.0	↔ T 3.0 ↔	Повітря відпрацьоване
T 3.4	↔ T 3.4 ↔	Повітря гаряче
T 5.0	↔ T 5.0 ↔	Азот відпрацьований
T 5.4	↔ T 5.4 ↔	Азот
T 9.2	↔ T 9.2 ↔	Супернатант
T 9.4	↔ T 9.4 ↔	Культуральна рідина
T 9.5	↔ T 9.5 ↔	Ультраконцентрат

НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ГЧ

Одержання ентероцинів культивуванням *Enterococcus faecalis*

Апаратурна схема Кафедра БТМ

Лист	№ док.м.	Подп.	Дата	Лист	Масштаб
Разроб.	Кодшар. ІЗ.				δ/м
Проб.	Стабнкоб. ВП.			Лист	Листов 1
Т.контр.					
Н.контр.					
Утв.	Лірог Т.П.				Формат А1

Лист № 1  
Лист № 2  
Лист № 3  
Лист № 4  
Лист № 5  
Лист № 6  
Лист № 7  
Лист № 8  
Лист № 9  
Лист № 10  
Лист № 11  
Лист № 12  
Лист № 13  
Лист № 14  
Лист № 15  
Лист № 16  
Лист № 17  
Лист № 18  
Лист № 19  
Лист № 20  
Лист № 21  
Лист № 22  
Лист № 23  
Лист № 24  
Лист № 25  
Лист № 26  
Лист № 27  
Лист № 28  
Лист № 29  
Лист № 30  
Лист № 31  
Лист № 32  
Лист № 33  
Лист № 34  
Лист № 35  
Лист № 36  
Лист № 37  
Лист № 38  
Лист № 39  
Лист № 40  
Лист № 41  
Лист № 42  
Лист № 43  
Лист № 44  
Лист № 45  
Лист № 46  
Лист № 47  
Лист № 48  
Лист № 49  
Лист № 50