

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ОПТИМИЗАЦИЯ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ И СТРУКТУРНЫЙ
АНАЛИЗ РЕАКТИВИРУЮЩЕГО ФАКТОРА *LUTEOCOCCUS*
JAPONICUS SUBSP. *CASEI*

© 2019 г. Е. А. Рогожин^{a, b}, Л. И. Воробьева^{c, *}, Е. Ю. Ходжаев^c, Е. С. Герасимов^c

^aИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, 117997 Россия

^bИнститут по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119435 Россия

^cМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Москва, 119192 Россия

*e-mail: livorobjeva@mail.ru

Поступила в редакцию 25.09.2018 г.

После доработки 20.11.2018 г.

Принята к публикации 30.11.2018 г.

Определена химическая структура внеклеточного реактивирующего фактора (РФ) *Luteococcus japonicus* subsp. *casei*, способствующего выживанию малочисленной субпопуляции клеток продуцента при летальных стрессорных воздействиях. Для очистки и выделения РФ был оптимизирован разработанный нами ранее метод выделения РФ из *Saccharomyces cerevisiae*. В результате, из культуральной жидкости *Luteococcus casei* было получено 15 фракций, у двух из которых (I и IV) обнаружена реактивирующая активность в отношении клеток, подвергнутых летальному стрессовому воздействию – УФ-облучению. Метод включал твердофазную экстракцию пептидов на гидрофобном сорбенте с фазой C₈ с их последующим многоступенчатым разделением и использованием аналитической ОФ-ВЭЖХ. С помощью масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF) были определены молекулярные характеристики фракции IV. Для фракции I не удалось получить эффективной ионизации. Для фракции IV масс-заряды составили 773.394 и 788.102 Да. Методом автоматического секвенирования по Эдману эти компоненты были идентифицированы как пептиды: Ala-Pro-Asn-Glu-Asn-Gln-Gly и Ala-Pro-Asn-Glu-Glu-Gln-Gly. По базам данных первичных структур полипептидов для них не выявлено сходства с известными полноразмерными функциональными пептидными молекулами. Предположительно, образование биологически активных пептидов *L. casei* связано с нематричным синтезом, возможно, с протеолизом крупного белка.

Ключевые слова: *Luteococcus japonicus* subsp. *casei*, реактивирующий фактор, стресс, структура, пептид, ОФ-ВЭЖХ

DOI: 10.1134/S0026365619020095

Изучение стрессовых реакций микроорганизмов и выяснение механизмов их формирования относятся к важнейшим аспектам фундаментальной биологии. Эволюционно выработанную устойчивость микроорганизмов к стрессорам различной природы рассматривают как основную причину растущей неэффективности антимикробной терапии. В природных условиях способность микроорганизмов противостоять стрессорным воздействиям за счет продуцирования внеклеточных соединений играет важную роль в формировании и поддержании гомеостаза микробных сообществ. В наших предыдущих исследованиях была продемонстрирована способность бактерий, архей и низших эукариот (дрожжей) продуцировать внеклеточные соединения пептидной природы, обладающие протекторным и реактивирующим действием в отно-

шении клеток как самих продуцентов, так и представителей других доменов, которые подвергались воздействию различных стрессоров, в том числе, УФ-облучению, нагреванию, действию окислителей, солей желчных кислот (Воробьева и соавт., 2013, 2015).

Тест-объектами, подвергавшимися летальным воздействиям, были грамположительные и грамотрицательные бактерии (Воробьева и соавт., 2010б; Воробьева и соавт., 2013), дрожжи различных физиологических и экологических групп (Воробьева и соавт., 2011), археи (Воробьева и соавт., 2013). Основным модельным организмом для изучения закономерностей образования реактивирующего фактора (РФ), его физико-химических характеристик, условий проявления биологической активности была бактерия *Luteo-*

coccus japonicus subsp. *casei* (*L. casei*). Выбор объекта был обусловлен его широкими адаптационными свойствами, что проявлялось в способности утилизировать разнообразные субстраты (Vorobjeva, 1999; Thorennoor et al., 2009) и распространении представителей рода *Luteococcus* в широком ареале окружающей среды. Штаммы *Luteococcus* sp. были выделены из почвы и воды (Tamura et al., 1994), молочных продуктов и сыра (Воробьева и соавт., 1983), образцов крови (Collins et al., 2003), глубоких морских осадков Тихого океана (Fan et al., 2014), активного ила стоков очистных сооружений целлюлозо-перерабатывающих предприятий (Thorennoor et al., 2009).

Штамм *L. japonicus* subsp. *casei* был выделен нами из сыра “Советский”. Молекулярно-биологические исследования, риботипирование, рестрикционный анализ 16S и 23S рДНК-фрагментов показали, что выделенный штамм в составе рода *Luteococcus* должен быть включен в семейство *Propionibacteriaceae* (Van Niewholtz, 1998; Vorobjeva, 1999). Ближайшим родственником штамма является *Propioniferax innocuum*. Ранее из культуральной жидкости *L. casei* нами был выделен реактивирующий фактор (РФ), обладающий протекторным и реактивирующим действием в отношении клеток, как продуцента, так и других организмов: бактерий, архей и дрожжей. Было показано, что РФ имеет пептидную природу и представлен комплексом, в состав которого входят две активные фракции (Воробьева и соавт., 2015). РФ синтезируется и экскретируется неповрежденными клетками в нормальных условиях роста в крайне низких концентрациях (Воробьева и соавт., 2013). Была установлена обратная зависимость между силой стрессорного воздействия и эффективностью РФ (уровнем выживаемости клеток микроорганизмов) (Воробьева и соавт., 2011, 2013). Таким образом, функционирование РФ имеет особое значение при стрессах летальной интенсивности. РФ не проявляет строгой видоспецифичности, что выражается в междоменном перекрестном действии препарата (Воробьева и соавт., 2013). Тип концентрационной зависимости, высокая скорость реактивирующего действия и устойчивость к стрессорным воздействиям предполагают сигнальный механизм действия пептидного РФ (Воробьева и соавт., 2009). С использованием сконструированного тестерного штамма *Escherichia coli*, несущего оперон *umuD-lacZ*, было установлено, что протекторное действие РФ не связано с индукцией SOS-ответа (Лойко и соавт., 2013) и, по-видимому, обеспечивается действием РФ сигнального типа на цитоплазматическую мембрану клеток.

Целью настоящей работы было идентифицировать структуру реактивирующего фактора пептидной природы *L. casei*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и условия культивирования. Объектом исследования была грамположительная бактерия *Luteococcus japonicus* subsp. *casei*, первоначально выделенная из сыра (Воробьева и соавт., 1983). Штамм выращивали в статических условиях при 32°C в колбах со 100 мл глюкозо-минеральной среды следующего состава (%): глюкоза – 1.0, (NH₄)₂SO₄ – 0.3, KH₂PO₄ – 0.1, NaH₂PO₄ – 0.2, MgSO₄ – 0.002, CaCl₂ – 0.002, NaCl – 0.002, дрожжевой экстракт – 0.1; pH 7.0. Культуру *L. casei* фазы линейного роста центрифугировали (10000 g, 20 мин), культуральную жидкость (КЖ) использовали для выделения РФ. Клетки *L. casei* дважды отмывали 0.05 М Na-фосфатным буферным раствором, pH 7.4, и суспендировали в том же буфере до клеточной плотности ОП₅₄₀ = 0.4–0.6. Клеточную суспензию использовали для определения биологической активности РФ.

Определение активности РФ. КЖ пропускали через нитроцеллюлозный мембранный фильтр диаметром 0.22 мкм (“Millipore”, США), адсорбированные на нем компоненты элюировали 3%-ным раствором NaCl с последующим пропусканием раствора через мембранный фильтр с низким сродством к белку (“Pall”, США) для полного удаления клеток.

Численность клеток в суспензиях *L. casei*, различных штаммов дрожжей, молочнокислых и пропионовокислых бактерий определяли по титру колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) после посева 10^N-кратно разведенных суспензий на соответствующие плотные среды с 2% агаром. Использовали микрометод посева с внесением аликвот суспензий объемом 5 мкл в шестикратной повторности для каждого разведения.

Выделение и определение структуры реактивирующего фактора. В настоящем исследовании использовали разработанную ранее схему фракционирования и очистки полипептидных компонентов, секретируемых *L. casei* в культуральную жидкость (Воробьева и соавт., 2015). Культуральную жидкость обессоливали, концентрировали и фракционировали методом аффинной хроматографии на колонке Нераpin HiTrap Sepharose (“GE Healthcare”, Швеция). Несвязавшуюся с сорбентом анионную суммарную фракцию рехроматографировали методом аналитической обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ на колонке Vydac C₁₈ Protein & Peptide 4.6 × 250 мм (“GraceVydac”, США). Хроматографию осуществляли, используя линейный градиента растворителя Б (80%-ый CH₃CN, 0.1% ТФУ) относительно растворителя А (0.1% ТФУ) от 0 до 50% в течение 50 мин при скорости потока мобильной фазы 1 мл/мин. Пептиды детектировали по поглощению при длине волны 214 нм. Молекулярные массы активных компонентов из-

меряли на MALDI-масс-спектрометре Ultraflex ("Bruker Daltonics", Германия), оснащенном УФ-лазером (337 нм) в режиме положительных ионов. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту. На мишени смешивали равные объемы (1 мкл) образцов и матрицы (20 мг матрицы/мл в 80% водном CH₃CN, 0.1% ТФУ в деионизованной воде MQ), полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры анализировали с помощью программы FlexAnalysis for TOF. Ошибка измерения составляла 2 ppm. Первичную структуру биологически активного пептида определяли методом автоматической ступенчатой деградации по методу Эдмана на автоматическом секвенаторе белков и пептидов PPSQ-33A ("Shimadzu Corp.", Япония) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Полученные экспериментальные данные интерпретировали с помощью программного обеспечения LabSolutions ("Shimadzu Corp.", Япония). Поиск гомологий аминокислотных последовательностей проводили по базам данных UniProt/SwissProt и trEMBL с применением алгоритма BLASTP, поиск транслированных последовательностей осуществляли на основании аннотированного генома *L. casei*, любезно предоставленного V. Loux (Collective Genomes Gbk 17320. contigs final gbk).

Определение биологической активности РФ. В качестве стрессорных факторов использовали УФ-облучение, соли желчных кислот и окислительный стресс. Источником УФ-облучения служила установка из двух параллельно-смонтированных ламп БУВ-15 (Россия) мощностью 30 Вт, основная часть эмиссии которых приходилась на область 253.7 нм. В предварительных экспериментах была установлена зависимость "доза-ответ". При дозе облучения 81 Дж/м² выживаемость облучаемых клеток составляла 0.01–0.03%. Для определения целевой активности суспензию клеток до или после стрессорного воздействия инкубировали с РФ в течение 10 и 15 мин соответственно. Реактивирующий эффект оценивали сравнением жизнеспособных клеток (КОЕ), выросших на плотной среде (2% агара) в опытном и контрольном вариантах; в последний при облучении не вносили реактивирующий фактор. Выживаемость бактерий в опытных и контрольных вариантах выражали в процентах по отношению к необлученному контролю. В качестве тест-объектов использовали клетки продуцента РФ, *Luteococcus casei*, а также клетки молочнокислых бактерий из музея кафедры микробиологии (МГУ, биологический факультет): *Lactobacillus acidophilus* (*Lb. acidophilus*), *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*). Пропионовокислые бактерии *Propionibacterium freudenreichii* (№ 1857), *P. acidipropionici* (№ 1859) получены из Чешской коллекции микроорганизмов (ССМ). Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1200 – из Всероссийской коллекции

промышленных микроорганизмов. Суспензии клеток тестерных штаммов получали, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологическая характеристика РФ. Бактерия *L. casei* – факультативный анаэроб, представлен неподвижными, неспорообразующими крупными шарообразными клетками, которые образуют оранжевые колонии на поверхности агара. Основными продуктами брожения являются пропионовая и уксусная кислоты, в незначительных количествах образуются каприловая, изокапроновая, масляная, капроновая, муравьиная кислоты (Воробьева и соавт., 2014). Ранее было показано, что кратковременная (10–15 мин) пред- или постынкубация клеток *L. casei* с фракцией внеклеточных пептидных метаболитов различной степени очистки, подвергнутых УФ-облучению и нагреванию, увеличивает численность выживаемых бактерий (Воробьева и соавт., 2003).

Фракция внеклеточных пептидов, именуемая РФ (реактивирующий фактор), выделенная из КЖ *L. casei*, оказывала защитное действие в отношении подвергнутых стрессу клеток не только продуцента, но и других объектов прокариотной и эукариотной природы.

Пептидные экзометаболиты с антистрессовыми свойствами образуются и выделяются клетками в среду в условиях, благоприятных для нормального роста микроорганизмов, и накапливаются в среде к началу стационарной фазы роста (табл. 1).

РФ проявляет универсальность защитного действия в отношении клеток, подвергаемых неродственным стрессам: УФ-облучению, нагреванию, действию окислителей, солей желчных кислот (табл. 1).

Установлена обратная зависимость эффективности защитного (протекторного) и реактивирующего действия РФ и степени выживаемости стрессированных клеток. Наиболее высокий антистрессовый эффект экзометаболита проявляется при чрезвычайно низкой численности выживаемых после летального воздействия клеток (0.01–0.1%). При этом протекторный эффект (предынкубация с РФ) был в разы больше выражен, чем реактивирующий (постынкубация с РФ), проявляемый после летального воздействия (Воробьева и соавт., 2003). Отмечено также, что эффективность реактивации клеток *L. casei* стационарной фазы была в 2 раза ниже, чем клеток логарифмической фазы роста (Воробьева и соавт., 2009).

Универсальность биологического действия РФ проявлялась в отношении микроорганизмов различных таксонов, включая пробиотические, в условиях действия на них стрессорных факторов различной природы (табл. 1).

Таблица 1. Реактивирующее действие РФ *L. casei* на подвергнутые стрессу клетки микроорганизмов

Тест-объект, стрессорное воздействие	Численность клеток, КОЕ/мл		
	до стресса (К1) (%)	после стресса (К2) (%)	после стресса и инкубации с РФ (%)
<i>L. casei</i> экспоненциальная фаза, УФ-облучение*	175×10^5 (100)	0.12×10^5 (0.07)	0.47×10^5 (0.27)
<i>L. casei</i> стационарная фаза, УФ-облучение*	200×10^5 (100)	0.012×10^5 (0.06)	0.22×10^5 (0.11)
<i>L. casei</i> , H ₂ O ₂ **	212×10^6 (100)	25×10^6 (11.8)	182×10^6 (85.8)
<i>S. cerevisiae</i> , УФ-облучение*	130×10^5 (100)	0.012×10^5 (0.009)	0.050×10^5 (0.038)
<i>Lb. casei</i> , желчные соли***	50×10^6 (100)	0.042×10^6 (0.084)	0.554×10^6 (1.11)
<i>Lb. acidophilus</i> , желчные соли***	160×10^6 (100)	0.441×10^6 (0.275)	1.880×10^6 (1.175)
<i>P. freudenreichii</i> , желчные соли***	130×10^6 (100)	0.014×10^6 (0.011)	0.032×10^6 (0.025)
<i>P. acidipropionici</i> , желчные соли***	100×10^6 (100)	0.031×10^6 (0.031)	0.064×10^6 (0.064)

* Доза УФ-облучения составляла для *L. casei* – 108 Дж/м², для *S. cerevisiae* – 81 Дж/м².

** Концентрация H₂O₂ – 600 мМ.

*** Конечная концентрация смеси Na-солей холата и дезоксихолата (1 : 1) – 2 г/л.

Обнаруженные и перечисленные закономерности проявления биологической активности РФ предполагают, что его эффекты связаны с образованием малочисленной субпопуляции стрессоустойчивых клеток-персистеров. Возможно, РФ индуцирует фенотипический переход регулярных вегетативных клеток в персистеры, что объясняет его существенно больший эффект в вариантах предынкубации культуры до стрессорного воздействия, по сравнению с вариантом постынкубации (до 10 раз). Однако нельзя исключить также возможного действия РФ на стадии индукции обратного перехода персистеров к вегетативному росту. В этом случае большая эффективность РФ при предынкубации может объясняться повышением его биологической активности за счет УФ-облучения. Этому объяснению не противоречат данные о повышении эффективности РФ при его облучении (в составе очищаемой фракции) до действия на клетки в варианте постынкубации (Воробьева и соавт., 2010а)

Определение структуры внеклеточного РФ *L. casei*. Для выделения внеклеточного РФ из культуральной жидкости *L. casei* был использован оптимизированный протокол, включающий твердофазную экстракцию (обессоливание) концентрата КЖ на гидрофобном сорбенте с фазой C₈, с последующим упариванием, лиофилизацией и разделением путем аффинной хроматографии в ступенчатом градиенте увеличения концентрации NaCl от 0 до 1 М. Всю суммарную не связавшуюся фракцию без этапа разделения методом аналитической градиентной анионообменной хроматографии разделяли путем ОФ-ВЭЖХ, в результате чего были собраны 15 преобладающих фракций, обозначенных I–XV (рис. 1). Эти фракции были

лиофилизированы для удаления остаточных количеств ТФУ. Результаты тестирования фракций на искомый реактивирующий эффект показали его наличие только в двух компонентах (I и IV). Для определения структурной характеристики обе фракции были проанализированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Для фракции I не удалось получить эффективной ионизации и, соответственно, сигналов масс-спектра, в то время как для компонента IV масс-заряды составили 773.394 и 788.102 Да. Дальнейшая идентификация данной активной фракции проводилась методом автоматического ступенчатого секвенирования по Эдману, в результате чего были установлены полные аминокислотные последовательности двух пептидов, находящихся в составе компонента IV: ¹Ala-Pro-Asn-Glu-Asn-Gln-Gly⁸ (пептид IV-1) и ¹Ala-Pro-Asn-Glu-Glu-Gln-Gly⁸ (пептид IV-2). Следовательно, оба пептида высоко гомологичны и различаются единственной аминокислотной заменой Asn5Glu. Их образование, по-видимому, не связано с матричным синтезом, т.к. такие последовательности не обнаружены в геноме *L. casei* (V. Loux, Collective Genomes Gbk). Поиск гомологий по базам данных первичных структур полипептидов не выявил сходства с какими-либо известными полно-размерными функциональными пептидными молекулами. Однако, на основании полученных данных, можно с некоторой значимой долей вероятности утверждать, что этот пептид является фрагментом частичного протеолиза более крупного белка. Характерно, что, согласно геномным данным, этот белок может содержать уникальный повторяющийся мотив типа APNENQCAPNENQCAPNENQC, который в дальнейшем под-

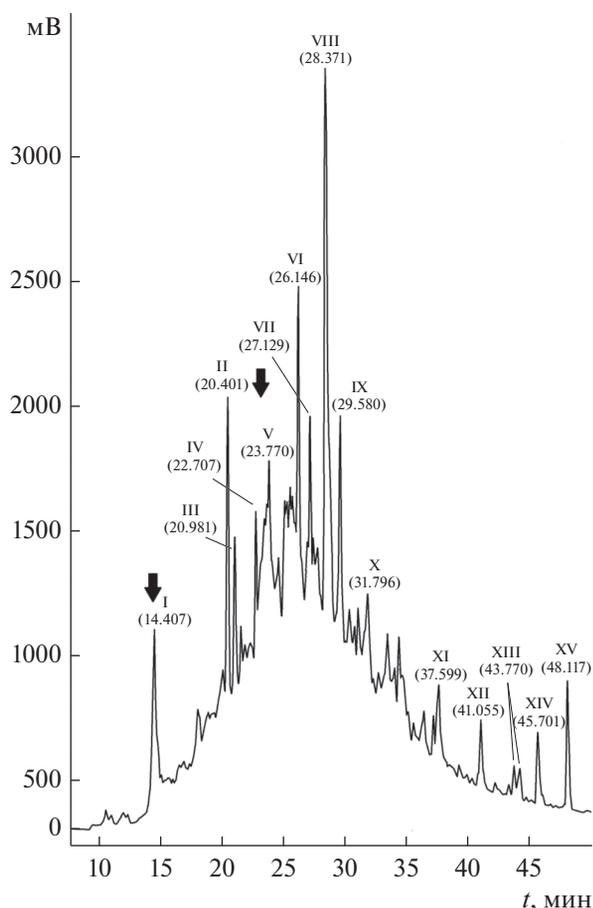


Рис. 1. ОФ-ВЭЖХ-профиль фракционирования несвязавшейся фракции после разделения обессоленного концентрата внеклеточной жидкости *L. japonicus* методом аффинной хроматографии в ступенчатом градиенте. Собранные фракции обозначены римскими цифрами (I–XV), времена их удерживания на колонке подписаны. Черными стрелками указаны пики, продемонстрировавшие наличие реактивирующего эффекта.

вергается ограниченному протеолизу с образованием коротких последовательностей с сигнальной функцией. Кроме того, дополнительным аргументом в пользу протеолизного происхождения РФ может являться частичное совпадение данной короткой последовательности с отдельными участками ряда бактериальных белков по данным (GenBank reference sequence IDs: WP_012104305.1, WP_007615369.1, WP_020569836.1). Идентифицированные пептиды не имеют никакой гомологии с определенными ранее РФ, обладающим функциями стрессового “реактиватора” из пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*) (Воробьева и соавт., 2017), однако близкие физико-химические свойства, а также схожие предсказанные элементы вторичной структуры по типу “random coil”, свидетельствуют в пользу присутствия в филогенетически удаленных живых организмах, принадлежащих к

различным царствам, схожих механизмов генерации сигнальных пептидов в ответ на стрессорные воздействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воробьева Л.И., Турова Т.П., Краева Н.И., Алексеева М.А. Пропионовокислые кокки и их систематическое положение // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 465–471.
- Vorob'eva L.I., Turova T.P., Kraeva N.I., Alekseeva A.A. Propionic acid cocci and their systematic position // Microbiology (Moscow). 1983. V. 52. P. 368–374.
- Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М. Внеклеточный белок *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* реактивирует клетки, инактивированные ультрафиолетовым облучением и нагреванием // Микробиология. 2003. Т. 72. № 4. С. 482–487.
- Vorobjeva L.I., Khodzhaev E.Yu., Ponomareva G.M. The extracellular protein of *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* reactivates cells inactivated by UV-irradiation or heat shock // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 482–487.
- Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Мулюкин А.Л., Торопыгин И.Ю. Механизм действия реактивирующего фактора *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 5. С. 544–549.
- Vorobjeva L.I., Khodzhaev E.Yu., Mulyukin A.L., Toropygin I.Yu. The mechanism of action of reactivating factor from *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. P. 489–493.
- Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю. Протекторное и реактивирующее действие белкового экзометаболита на клетки дрожжей, инактивированные ультрафиолетовым излучением // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 2. С. 191–197.
- Vorobjeva L.I., Khodzhaev E.Yu. Protective and reactivating effect of the protein exometabolite on yeast cells inactivated by the ultraviolet irradiation // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 177–183.
- Воробьева Л.И., Федотова А.В., Ходжаев Е.Ю. Защитное действие реактивирующего фактора *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* на инактивированные УФ-светом клетки репарационных мутантов *Escherichia coli* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 617–623.
- Vorobjeva L.I., Fedotova A.V., Khodzhaev E.Yu. Protective action of reactivating factor of *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* toward cells of *Escherichia coli* reparation mutants inactivated with UV-light // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 567–573.
- Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Вустин М.М. Перекрестная антистрессовая защита УФ-облученных клеток дрожжей при участии внеклеточных пептидных факторов // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 291–296.
- Vorobjeva L.I., Khodzhaev E.Yu., Vustin M.M. Extracellular protein metabolite of *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* reactivates cells subjected to oxidative stress // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. P. 264–269.
- Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Новикова Т.М., Мулюкин А.Л., Чудинова Е.М., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. Стресс-защитное и перекрестное действие внеклеточ-

- ного реактивирующего фактора микроорганизмов доменов бактерий, архей и эукариот // *Микробиология*. 2013. Т. 82. № 5. С. 588–594.
- Vorobjeva L.I., Khodzhaev E.Yu., Novikova T.M., Mulyukin A.L., Chudinova E.M., Kozlova A.N., El'-Registan G.I. Stress-protective and cross action of the extracellular reactivating factor of the microorganisms of the domains bacteria, archaea, and eukaryota // *Microbiology (Moscow)*. 2013. V. 82. P. 594–599.
- Воробьева Л.И., Рогожин Е.А., Ходжаев Е.Ю., Николаев И.В., Турова Т.П. Реактивирующий фактор *Luteococcus japonicus* subsp. *casei*: выделение и характеристика // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2015. Т. 51. № 1. С. 37–45.
- Vorob'eva L.I., Rogozhin E.A., Khodzhaev E.Yu., Nikolaev I.V., Turova T.P. Reactivating factor of *Luteococcus japonicus* subsp. *casei*: isolation and characterization // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. V. 51. P. 44–51.
- Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Рогожин Е.А., Самойленко В.А., Харченко Н.В. Структурная характеристика и защитное действие внеклеточных пептидных метаболитов *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* на пробиотические бактерии // *Микробиология*. 2015. Т. 84. № 4. С. 438–449.
- Vorobjeva L.I., Khodzhaev E.Yu., Rogozhin E.A., Samoilenko V.A., Kharchenko N.V. Structural characterization of the extracellular peptide metabolites of *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* and their protective effect on probiotic bacteria // *Microbiology (Moscow)*. 2015. V. 84. P. 502–511.
- Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Рогожин Е.А., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Характеристика и стрессозащитное действие внеклеточных пептидных факторов дрожжей в отношении пробиотических молочнокислых бактерий // *Микробиология*. 2016. Т. 85. № 4. С. 393–402.
- Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Rogozhin E.A., Cherdynseva T.A., Netrusov A.I. Characterization of extracellular yeast peptide factors and their stress-protective effect on probiotic lactic acid bacteria // *Microbiology (Moscow)*. 2016. V. 85. № 4. P. 411–419.
- Воробьева Л.И., Рогожин Е.А., Ходжаев Е.Ю., Володяшкин Р.А., Самойленко В.А. Характеристика и стрессозащитное действие внеклеточных пептидных факторов *Saccharomyces cerevisiae* на пропионовокислые бактерии // *Микробиология*. 2017. Т. 86. № 6. С. 684–695.
- Vorob'eva L.I., Rogozhin E.A., Khodzhaev E.Yu., Volodyazhkin R.A., Samoilenko V.A. Characterization and stress-protective action of *Saccharomyces cerevisiae* extracellular peptide factors on propionic acid bacteria // *Microbiology (Moscow)*. 2017. V. 86. P. 698–707.
- Лойко Н.Г., Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Козлова А.Н., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Действие реактивирующего фактора *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* на экспрессию генов SOS-ответа // *Микробиология*. 2013. Т. 82. № 2. С. 139–146.
- Loiko N.G., Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Kozlova A.N., Gal'chenko V.F., El' Registan G.I. Effect of the reactivating factor of *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* on the expression of SOS response genes // *Microbiology (Moscow)*. 2013. V. 82. P. 126–132.
- Collins M.D., Hitson R.A., Nikolaitchouk N., Nyberg A., Folsen E. *Luteococcus sanguinis* sp. nov., isolated from human blood // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. P. 1889–1891.
- Fan X., Zhang Z., Zhang X.H. *Luteococcus sediminum* sp. nov., isolated from subseafloor sediment of the South Pacific Gyre // *Int. J. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 2522–2527.
- Tamura T., Takauchi M., Yokota A. *Luteococcus japonicus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive coccus with LL-diaminopimelic acid in the cell wall // *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 44. P. 348–356.
- Thorenoor N., Kim Y., Lee C., Yu M.H., Engesser K.H. A previously uncultured papermill *Propionibacteria* is able to degrade O-aryl alkyl ethers and various aromatic hydrocarbons // *Chemosphere*. 2009. V. 75. P. 1287–1293.
- Van Niewholtz J.A. A taxonomic re-evaluation of *Propionibacterium coccoides* // Ph.D. Dep. of Microbiol. Biochemistry. University of Orange Free State, Bloemfontein. South Africa. 1998.
- Vorobjeva L.I. *Propionibacteria*. Kluwer Academic Publishers, 1999. 248 p.

Optimized Fractioning and Structure Analysis of the Reactivating Factor from *Luteococcus japonicus* subsp. *casei*

E. A. Rogozhin^{1,2}, L. I. Vorob'eva^{3,*}, E. Yu. Khodzhaev³, and E. S. Gerasimov³

¹Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

²Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119435 Russia

³Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119192 Russia

*e-mail: livorobjeva@mail.ru

Received September 25, 2018

Revised November 20, 2018

Accepted November 30, 2018

The chemical structure of the extracellular reactivating factor (RF) from *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* was determined; this factor promotes survival of a small subpopulation of the producer cells under lethal stress impact. For the isolation and purification of this RF, the previously developed method for RF isolation from *Saccharomyces cerevisiae* was optimized. A total of 15 fractions were obtained from the culture liquid of *Luteococcus casei*, two of which (I and IV) exhibited reactivation activity against the cells subjected to a lethal

stress impact (UV irradiation). The method included solid-phase extraction of the peptides on a hydrophobic sorbent with the C₈ phase and subsequent multistage separation using RP-HPLC. Mass spectral analysis (MALDI-TOF) was used to determine the molecular characteristics of fraction IV. Efficient ionization was not achieved for fraction I. Mass charges for fraction IV were 773.394 and 788.102 Da. Edman automatic sequencing was used to identify these components as peptides: Ala-Pro-Asn-Glu-Asn-Gln-Gly and Ala-Pro-Asn-Glu-Glu-Gln-Gly. No similarity to any known full-size functional peptide molecules in the databases on polypeptide primary structures was revealed. Formation of biologically active peptides by *L. casei* may be associated with nonmatrix synthesis and probably involves proteolysis of a large protein.

Keywords: *Luteococcus japonicus* subsp. *casei*, reactivating factor, stress, structure, peptide, RP-HPLC