

BİOLOGİYA

UDK: 581.19:577.157

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ ПРОДУЦИРОВАНИЯ
ЭНТЕРОЦИНА *ENTEROCOCCUS FAECIUM* S5
ИЗОЛИРОВАННОГО ИЗ АЗЕРБАЙДЖАНСКОГО СЫРА****Н.Ф.ГУСЕЙНОВА, А.А.КУЛИЕВ*****Бакинский Государственный Университет*
*biochem@mail.ru***

*Бактериоцин-продуцирующий штамм S5 изолирован из сыра, приобретенного в Сабирбаде. Идентификация штамма фенотипическими и молекулярными методами показала, что он относится к виду *Enterococcus faecium*. В этой части работы излагаются результаты экспериментов, которые были посвящены подбору оптимальных условий для максимального продуцирования энтероцина культурой *Enterococcus faecium* штамм S5 в условиях *in vitro*. Оптимальными значениями температуры, начальной плотности бактерий и концентрации хлористого натрия для максимального выхода энтероцина в культуральную жидкость являются 29°C, Log 7,8 КОЕ/мл и 2,5 %, соответственно. В этих условиях выход энтероцина, по сравнению с первоначальным значением увеличивался до 9 раз и составил 1900 ПЕ/мл.*

Ключевые слова. *Enterococcus faecium*, энтероцин, оптимальные условия, антимикробная активность

Молочнокислые бактерии широко применяются как безопасные и натуральные консерванты пищевых продуктов, что является одной из важных проблем пищевой промышленности. Это свойство молочнокислых бактерий связано с ихни антогонизмом по отношению к гнилостным и патогенным бактериям. Известно, что антагонистическое свойство молочнокислых бактерий связано с образованием таких метаболитов как молочная кислота, перекись водорода и антибиотические вещества разной природы (5; 8; 10).

В последнее десятилетия большое внимание уделяется изучению продуцирования антимикробных метаболитов у молочнокислых бактерий. К таким метаболитам, прежде всего, относятся бактериоцины и

бактериоциноподобные вещества. Эти вещества находятся в центре внимания многих исследований, вследствие возможного их применения в качестве натуральных пищевых консервантов и в приготовлении новых антимикробных лекарственных препаратов (2; 9; 13).

При проведении этих опытов мы преследовали две главные цели: во-первых, повысить эффективность самого процесса продуцирования энтероцина для получения большего количества естественного пищевого консерванта, что выгодно с экономической точки зрения. Как нам известно, для сохранения качества ферментированных пищевых продуктов в качестве консерванта либо используются сами стартовые активные культуры, вырабатывающие энтероцин, либо сам энтероцин в качестве пищевой добавки (3; 6). Во-вторых, увеличение концентрации энтероцина в культуральной жидкости облегчает задачу по ее выделению, дальнейшей очистке и определению биохимических и молекулярных свойств. Обе эти задачи, несомненно, требуют оптимизацию продуцирования энтероцинов, что зависит от многих специфических факторов (7; 11; 12).

Материалы и методы исследования

Для определения кинетики роста молочнокислых бактерий, 15 мл питательной среды М17 был инокулирован 1,5 мл культуральной жидкостью и инкубирован при температурах 8°, 37°, 40°, 45°, а также при присутствии 1,5% - 6,5% NaCl и при pH 9,6. В определенные интервалы времени (каждый час) рост клеток наблюдалась с помощью измерения оптической плотности при 600 нм и измерением значения pH. Каждый час в течение 24 часов 1 мл инокулята подвергался измерению ОП₆₀₀ и pH, после чего его pH доводился до 6,5 и центрифугировался. Методом пятен на агаре проверялась антимикробная активность для определения АЕ/мл (*L. bulgaricus* 340; *Listeria innocua* CIP).

После центрифугирования, нейтрализации и фильтрации (0.22 мкм) культуральной жидкости, определяли антимикробную активность, методом пятен в агаре. При этом методе антимикробный эффект измеряется арбитражными единицами (А.Е) и учитывается по зоне задержки роста микроорганизмов разбавленной культуры. Для определения арбитражных единиц культуральная жидкость подвергается разбавлению. Разбавление ведется в соотношении 1:2 со стерильным фосфатным буфером (Фосфатный буфер 20мМ pH 6.5) (серийное разбавление) после приготовления чашки Петри с питательной средой и индикатором (4). 10 μл разбавленной культуральной жидкости наносится на поверхность агара после затверждения последнего. Чашки Петри инкубируются при температуре 37°C в течение 16-24 ч. Антимикробная активность в арбитражных единицах определяется следующей формулой:

$$2^n \times 1.000 \text{ μл} / 10 \text{ μл} = \text{П.Е.} / \text{мл},$$

где n – степень разбавления культуральной жидкости, проявляющая зону ингибирования индикаторных штаммов более, чем на 2 мм.

Результаты и их обсуждение

С этой целью, для начала мы исследовали динамику роста, подкисления среды и продуцирования энтероцина при суточном выращивании культуры *Enterococcus faecium* штамм S5. Результаты этих исследований отражены на рис. 1. Из рисунка 1 видно, что динамика изменения оптической плотности штамма-продуцента подчиняется типичной кривой роста микроорганизмов. Конец логарифмической фазы роста наблюдается спустя 7 ч культивирования. В это время оптическая плотность суспензионной культуры достигала до отметки 3,85 значение, ее кислотность среды снизилась на 1,7 единиц и составило 5,4. После чего наступает стационарная фаза.

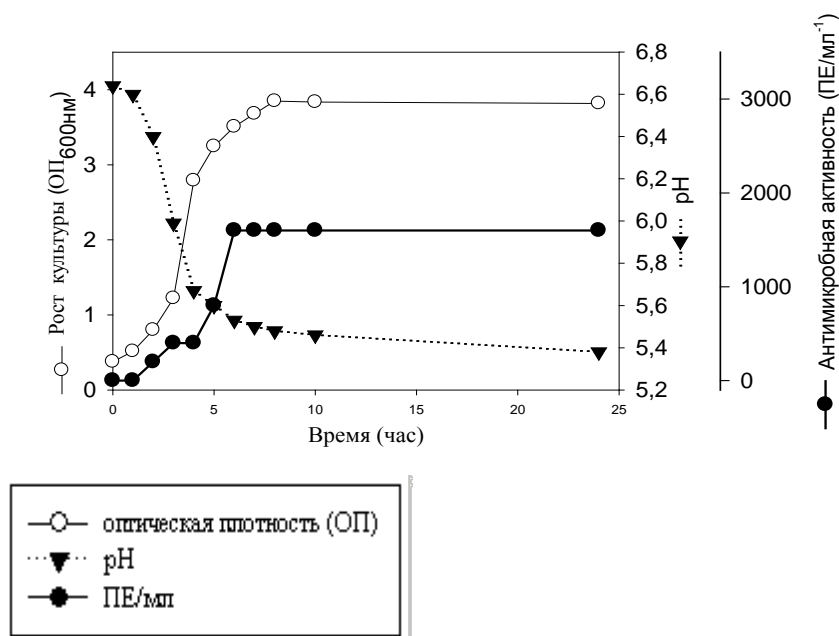


Рис. 1. Динамика роста (○), изменения pH среды (▼) и антимикробная активность (●) культуры *Enterococcus faecium* штамм S5 (тест культура *Lactobacillus bulgaricus* 340).

Из кривой, показывающей динамику образования энтероцина (по проявлению антимикробной активности) видно, что на третьем часу культивирования в культуральной жидкости уже появляются следы антимикробной активности, которая в логарифмической фазе роста, параллельно с оптической плотностью стремительно увеличивается и достигает своего максимального значения в начале стационарной фазы до отметки 180 ПЕ/мл⁻¹.

Появление антимикробного агента в составе первичных метаболи-

тов указывает на то, что этот агент не является антибиотиком в классическом смысле слов, которые обычно синтезируются на более поздних фазах роста (как вторичный метаболит) штамма-продуцента.

В конце эксперимента значение рН в суспензионной культуре понизилась еще на 0,3 единицы и составило 4,5. Это значение является еще одним доказательством родовой принадлежности штамма – продуцента к роду *Enterococcus*, представители которого понижает рН среды до предела 4,2-4,6.

По литературным данным, значение рН среды играет важную роль в процессах формирования морфофизиологических и биохимических свойств бактерий, включая и интенсивность синтеза и секреции метаболитов, в том числе и антимикробных агентов. В следующей серии экспериментов мы изучали рост и продуцирование энтероцина культурой *Enterococcus faecium* штамм S5 в зависимости от исходных контролируемых значений рН среды. В кислой среде клетки изучаемого штамма растут слабо. По мере увеличения значения рН среды до нейтральных значений повышается также и интенсивность роста культуры. Максимальная оптическая плотность суспензионной культуры в этих экспериментах наблюдалась при рН 6 и при рН 7. В обеих этих областях кислотности среды значение оптической плотности составило 1,82 единицы. Увеличение значения рН еще на одну единицу отрицательно повлияло на рост культуры, и значение оптической плотности снизилось до отметки 1,62. Что касается максимальной активности, то ее значение носило коррелятивный характер с интенсивностью роста продуцента почти во всех значениях рН среды.

Однако наибольшей антимикробной активностью обладала культура, растущая при поддержании нейтрального значения рН среды – при рН 7.0. При этом между значениями оптических плотностей культур, растущих при рН 6.0 и при рН 7.0, не были обнаружены особых различий.

Таким образом, судя по результатам этих первичных опытов, оптимальным значением рН для максимального продуцирования энтероцина штаммом *Enterococcus faecium* S5 является значение рН 7.0.

Далее мы изучали влияние температуры культивирования на рост культуры и антимикробную активность. Мы следили эти показатели при различных значениях температуры в пределах от 10°C до 45°C с интервалом 5°C. Как и следовало ожидать, при низких значениях температуры (10°C и 15°C) интенсивность роста культуры носила слабый характер. При комнатной температуре и выше на 5°C, наблюдается более интенсивный, но одинаковый рост культуры. При этих температурных условиях, а также при 35°C значение оптической плотности суспензионной культуры было идентичным и составило 1,8 единиц, что на 0,7 единиц больше по сравнению с аналогичным значением, наблюдаемым при 15°C. Наиболее интенсивный рост культуры наблюдался при 30°C. При более высоких температурных условиях наблюдали замедление роста клеток. Самое слабое

значение оптической плотности наблюдалось при 45°C. Судя по диаграмме, это значение почти не менялось по сравнению с изначальным значением суспензионной культуры. Однако в этой культуре обнаружили следы антимикробной активности. Интересно отметить, что процесс образования энтероцина оказался очень чувствительным к температурным условиям среды. Например, при одинаковой интенсивности роста культуры при трех разных температурных условиях значения максимальной антимикробной активности значительно отличались друг от друга. Так, при 20°C оно составило 180 ПЕ/мл, а при 25°C и 35°C - соответственно, 330 ПЕ/мл и 380 ПЕ/мл. Наиболее активной оказалась культура, растущая при 30°C. Максимальная активность при этом достигала до отметки 410 ПЕ/мл.

Таким образом, оптимальным значением температуры, при котором культура *Enterococcus faecium* штамм S5 проявляет максимальную антимикробную активность, является 30°C.

Для каждого параметра мы брали два значения. Комбинации каждого значения повторяли трижды (2³). После установления оптимального значения в дальнейшем исключили двух параметров.

Было установлено, что два из этих параметров – температура и концентрация хлористого натрия оказывают значительное влияние на продуцирование энтероцина. При повышении значений этих параметров активность снижалась и наоборот, пониженные температурные условия и концентрации хлористого натрия способствуют увеличению выхода энтероцина в среду. Установлено, что максимальная энтероциновая активность обнаруживается при температуре культивирования 25°C и концентрации хлористого натрия 3% (табл. 1).

Таблица 1

Диагностический экспериментальный дизайн (2³) и влияние некоторых параметров ферментации на степень продуцирования энтероцина *Enterococcus faecium* штамм S5

№№	Уровень значений эффекторов ^а					Активность ^б	
	Лактоза	Кол-во КОЕ/мл	Аэрация	Температура	NaCl	LB-340	LI-80.11
1	-1	-1	-1	+1	+1	232	58
2	+1	-1	-1	-1	+1	456	112
3	-1	+1	-1	+1	-1	448	124
4	+1	+1	-1	-1	-1	764	298
5	-1	-1	+1	-1	-1	556	236
6	+1	-1	+1	+1	-1	342	104
7	-1	+1	+1	-1	+1	448	122
8	+1	+1	+1	+1	+1	232	72

Примечание: а – проверенные уровни эффекторов, обозначенные как «-1» и «+1» были следующие: для лактозы - 3 г/л (-1) и 5г/л (+1); для количества инокулята – 10⁵ КОЕ/мл (-1) и 10⁷ КОЕ/мл (+1); для аэрации – 1 л(стерил. воздуха)/час (-1) и без аэрации (+1); для температуры – 25 °С (-1) и 35 °С (+1); для NaCl –3% (об/вес) (-1) и 5% (об/вес) (+1). б – максимальная активность определена по отношению пассивных культур – *Lactobacillus bulgaricus* 340 и *Listeria innocua* CIP 80.11 и выражена как ПЕ/мл

Повышенное количество инокулята в стартовой культуре положительно влияет на этот процесс.

Таким образом, целью проведения и анализа этой диагностической двухступенчатой модели опытов явилось получение экспериментальных данных, которые могли бы служить в качестве начального подхода к установлению конечных оптимальных условий для максимального продуцирования энтероцина.

В этих опытах в качестве переменных брали три параметра – температуры, концентрации хлористого натрия и количество инокулирующихся клеток продуцента. Здесь мы поменяли и пределы вариации этих параметров (табл. 2, примеч. Б). Так, пределы для температуры были от 23°C до 31°C, пределы для концентрации хлористого натрия были от 1% до 5%, а пределы для количества инокулята были от 10⁶ КОЕ/мл до 10⁸ КОЕ/мл. Еще, для установления и стимулирования диагностического цикла, были выбраны также центральные значения для всех переменных данных.

Таблица 2

Диагностический экспериментальный дизайн (3²) и влияние избранных параметров ферментации на степень продуцирования энтероцина *Enterococcus faecium* штамм S5

№№	Уровень значений эффекторов ^а			Активность ^б	
	Температура	NaCl	Количество КОЕ/мл	LB-340	LI-80.11
1	-1	-1	-1	932	288
2	-1	0	+1	1212	328
3	-1	+1	0	1236	342
4	0	-1	0	1256	354
5	0	0	+1	1334	378
6	0	+1	-1	438	136
7	+1	-1	0	1244	344
8	+1	0	-1	958	222
9	+1	+1	+1	1224	146
10	0	0	0	1396	398

Примечание: а – проверенные уровни эффекторов, обозначенные как «-1», «0» и «+1» были следующие: для температуры – 23 °С (-1), 27°C (0) и 31 °С (+1); для NaCl – 1% (об/вес) (-1), 3% (об/вес) (0) и 5% (об/вес) (+1); для количества инокулята – 10⁶ КОЕ/мл (-1), 10⁷ КОЕ/мл (0) и 10⁸ КОЕ/мл (+1); б – максимальная активность определена по отношению пассивных культур – *L. bulgaricus* 340 и *L. innocua* CIP 80.11 и выражена как ПЕ/мл.

Результаты этих исследований суммированы в табл. 2. Из таблицы видно, что, как и в предыдущих экспериментах, ингибирующая активность энтероцина по отношению *Lactobacillus. bulgaricus* 340 была намного выше (около 4 раза), чем по отношению *Listeria innocua* CIP 80.11. Относительно влияний различных значений и комбинаций изученных параметров на антимикробную активность энтероцина можно

сказать, что здесь не наблюдаются четкие закономерности. Однако при средних значениях этих трех параметров проявляется наибольшая активность.

Самая низкая антимикробная активность в этой таблице была получена в комбинации максимальной концентрации хлористого натрия (5%) и минимальном значении стартового инокулята (10^6 КОЕ/мл).

Для точного установления оптимальных значений этих трех параметров, мы изучили их в комбинации двух переменных. С этой целью сначала мы изучали значение максимальной активности энтероцина в зависимости от количества стартового инокулята. В качестве второго переменного мы брали различные концентрации хлористого натрия. Результаты этих экспериментов отражены на рис. 3. Из этого рисунка видно, что присутствие хлористого натрия в среде культивирования в концентрации от 3% до 4% угнетает процесс образования энтероцина. По-видимому, это связано с низким ростом штамма-продуцента. Потому что, если следить за зависимостью максимальной активности энтероцина от концентрации начального инокулята, то мы видим, как по мере увеличения этой концентрации повышается и антимикробная активность. Но такая корреляция действительна только до значения концентрации инокулята $\text{Log } 7,6$ КОЕ/мл. При дальнейшем увеличении этого показателя наблюдается не только отсутствие повышения активности, но и ее незначительное падение. При низких концентрациях хлористого натрия также замедляется процесс образования энтероцина.

Так, если сравнить значения максимальной активности энтероцина при культивировании штамма в присутствии 2% хлористого натрия с 2,5%-ной концентрацией, то мы видим, что во втором случае активность значительно больше.

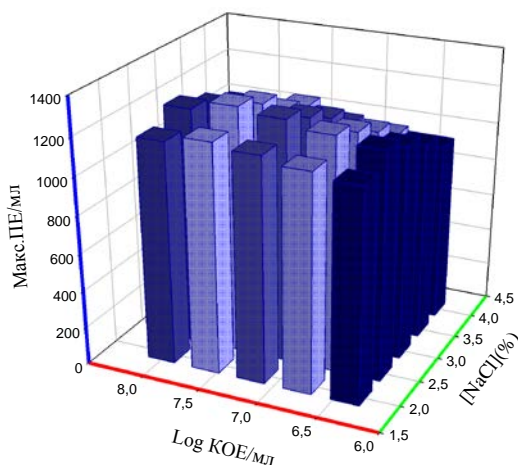


Рис. 1. Максимальный уровень антимикробной активности энтероцина штамма *Enterococcus faecium* штамм S5 в зависимости от концентрации хлористого натрия при различных концентрациях первичного инокулята продуцента ($t_{\text{культ}}=25^{\circ}\text{C}$. тест культура – *Lactobacillus L. bulgaricus* 340)

Таким образом, в комбинации двух переменных, состоящей из концентраций хлористого натрия и стартового инокулята, наибольшая продуктивность штамма *Enterococcus faecium* S5 была обнаружена на стыке значений этих показателей 2,5% и Log 7,6 КОЕ/мл, соответственно.

Для температуры этот предел находится в точке, соответствующей значению 29°C, а для плотности (Log КОЕ/мл) - в точке, соответствующей значению 7,8. Судя по рельефу диаграммы, оптимальная зона для продуцирования энтероцина находится в пределах температуры от 26°C до 30°C и в пределах плотности бактерий от 7,6 Log КОЕ/мл до 8,0 Log КОЕ/мл. При этом пик энтероциновой активности наблюдается в точке пересечения значений этих показателей 29°C и Log 7,8 КОЕ/мл, соответственно.

Таким образом, результаты исследований по выявлению оптимальных условий продуцирования энтероцина штаммом *Enterococcus faecium* S5 показали ряд важных моментов: во-первых, с этой целью нельзя выбирать факторов, от которых могло бы зависеть процесс энтероциногенеза, по отдельности, а нужно проводить комплексное исследование, где одновременно прослеживаются влияние некоторых факторов. Во-вторых, факторы, которые положительно влияют на рост штамма-продуцента, не всегда способствуют увеличению скорости образования и накоплению энтероцинов в культуральной жидкости. Наконец, в-третьих, оптимальными значениями температуры, начальной плотности бактерий и концентрации хлористого натрия для максимального выхода энтероцина в культуральную жидкость являются 29°C, Log 7,8 КОЕ/мл и 2,5 %, соответственно. В этих условиях выход энтероцина, по сравнению с первоначальным значением увеличивался до 9 раз и составил 1900 ПЕ/мл.

Благодарность. Эти исследования были проведены в Национальном Институте Агрономических Исследований (Нант, Франция) при финансовой поддержке посольства Республики Франции в Азербайджане, частично Грантов по программам TEMPUS и NATO Science for Peace SfP 982164.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаева Н.Ф., Гюльяхмедов С.Г., Кулиев А.А. Термозависимость биосинтеза и секреции бактериоцина штамма *Lactobacillus paracasei* BN ATS SW // Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана. Баку: Элм, 2008, т.6, с. 209-212.
2. Ганбаров Х.Г., Гурбанова Ф.К. Влияние сахаров на рост штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из простокваш, используемых в Агроклиматической области Большого Кавказа Азерб. Республики / Материалы Республиканской научной конференции. Баку, 2005, с. 26-27.
3. Гюльяхмедов С.Г., Абдуллаева Н.Ф., Гусейнова Н.Ф., Кулиев А.А., Иванова И.В., М.Дальгальарондо, Шобер Ж.-М., Хаертле Т. Выделение и характеристика бактериоциноподобных ингибиторных веществ молочнокислых бактерий,

- izoлированных из азербайджанских сыров. Прик. Биохим.Микробиол. 2009, т.45., № 3., с.297-303.
4. Стоянова Л.Г. Новые бактерицины лактококков и их практическое использование. М.: МГУ. 1992, 148 ст.
 5. Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2005, с. 256.
 6. Dezzaan D., Mequio M., Littell J., et al. Purification and Characterization of *Enterocin* 62-6, a Two-Peptide Bacteriocin Produced by a Vaginal Strain of *Enterococcus Faecium*: Potential Significance in Bacterial Vaginosis // *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2007, v. 19, p. 241-250.
 7. Kaur K., Andrew L., Wishart D., Vederas J. Dynamic Relationships among Type IIa Bacteriocins: Temperature Effects on Antimicrobial Activity and on Structure of the C-terminal Amphipathic Alpha Helix as a Receptor-Binding Region // *Biochemistry*, 2004, v. 43, №29, p. 9009-20.
 8. Klaenhammer T.R. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol.Rev.*, 12: 1993. p. 39-86.
 9. Klaenhammer T. Discovering Lactic Acid Bacteria by Genomics // *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, v. 82, p. 29-58
 10. Nallapareddy S., Weinstock G., Murray B. Clinical Isolates of *Enterococcus Faecium* Exhibit Strain-specific Collagen Binding Mediated by Acm, a New Member of the MSCRAMM Family // *Mol. Microbiol.*, 2003, v.47, p. 1733-1747.
 11. Nilsen T., Nes I., Holo H. Enterolysin A. A Cell Wall-degrading Bacteriocin from *Enterococcus Faecalis* LMG 2333 // *J. Applied and Environmental Microbiology*, 2003, v. 69, №5, p. 2975-2984
 12. Saavedra L., Castellano P., Sesma F. Purification of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria // *Methods in Molecular Biology*, 2004, v. 268, p. 331-336
 13. Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. Guidelines for Manuscripts on Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Int.J.Food Microbiol.*, 33, 1996, p. 3-5.

AZƏRBAYCAN PƏNDİRİNDƏN İZOLƏ EDİLMİŞ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* S5 ŞTAMININ BAKTERİOSİN SİNTEZİ ÜÇÜN OPTİMAL ŞƏRAİTİN SEÇİLMƏSİ

N.F.HÜSEYNOVA, A.Ə.QULİYEV

XÜLASƏ

Sabirabadda ev şəraitində istehsal edilmiş pendirdən bakteriosin sintez edən S5 ştamı izolə edilmişdir. Fenotipik və molekulyar üsullarla S5 ştamı *Enterococcus faecium* kimi identifikasiya edilmişdir. Bu məqalədə in vitro şəraitində *Enterococcus faecium* ştamının enterosinin maksimum sintezi üçün optimal şəraitin seçilməsi həsr olunmuş təcrübələrin nəticələri təqdim olunur. Qoyulan təcrübələrə əsasən 29°C temperaturda, bakteriyaların ilkin qatılığı Log 7,8 IU/ml və NaCl 2,5 % qatılığı enterosin sintezi üçün maksimal uyğun şərait hesab olunur. Bu şəraitdə enterosin sintezi 9 dəfəyə qədər artır və 1900 CFU/ml təşkil edir.

Açar sözlər: *Enterococcus faecium*, enterosin, optimal şərait, antimikrob aktivlik

**SELECTION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF ENTEROCIN
ENTEROCOCCUS FAECIUM S5 ISOLATED FROM AZERBAIJAN CHEESE**

N.F.HUSEYNOVA, A.A.GULIYEV

SUMMARY

Bacteriocin-producing strain S5 was isolated from cheese acquired Sabirabad. Identification of the strain with phenotypic and molecular methods showed that it belongs to the species *Enterococcus faecium*. This part of the paper presents the results of experiments, which were devoted to the selection of the optimum conditions for maximum production of enterocin culture *Enterococcus faecium* strain S5 *in vitro*. The optimum values of the temperature, the initial concentration of bacteria and the density of sodium chloride for maximum enterocin production are: 29°C, Log 7,8 IU/ml and 2,5%, respectively. In these conditions, the yield enterocin, compared to the original value increased to 9 times and to average made 1900 CFU / ml.

Key words: Enterococcus faecium, enterocin, optimal conditions, antimicrobial activity

Поступила в редакцию: 15.01.2014 г.

Подписано к печати: 04.02.2014 г.