

BİOLOGİYA**УДК 517.64****БИОХИМИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ЭНТЕРОЦИНА, ПРОДУКТА ШТАММА
ENTEROCOCCUS FAECIUM M13****А.А.КУЛИЕВ, С.Г.ГЮЛЬАХМЕДОВ**
Бакинский Государственный Университет
sahib66@rambler.ru

Из штамма Enterococcus faecium M13 выделен и очищен антимикробный агент пептидной природы, который обладал строгой антилистериозной активностью. Протеолитические ферменты полностью инактивировали данный активный компонент, тогда как, каталаза, липаза и α -амилаза не оказывали на него заметного влияния. Активный компонент оказался термостабильным полипептидом с молекулярной массой 5 кД. Методом ПЦР анализа в хромосоме штамма-продуцента обнаружен единственный амплификант с размером 216 пар оснований, который соответствует размеру гена энтероцина P.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, энтерококки, энтероцины, антимикробная активность

В настоящее время одним из перспективных и востребованных направлений микробиологии и медицины является поиск новых молочнокислых бактерий (МКБ), обладающих антимикробными и пробиотическими свойствами. Считается, что наиболее богатыми источниками этих бактерий являются традиционные кисломолочные продукты, изготовленные в домашних условиях. Процесс созревания и формирования ароматических, вкусовых и других органолептических качеств сырных изделий и других кисломолочных, рыбных и мясных продуктов тесно связан с промежуточными и конечными продуктами метаболизма МКБ. Антагонистические свойства МКБ обусловлены главными конечными продуктами их метаболизма, такими, как молочная кислота, перекись водорода или бактериоцины [2, 4-10, 21-25]. В виду строгой антимикробной активности, в последние годы бактериоцины находятся в центре внимания

многих исследователей, которые рассматривают их в качестве естественного пищевого презерванта, а также источника новых антимикробных лекарственных препаратов [9-11].

Бактериоцины являются молекулами белково-пептидной природы, синтезирующиеся в рибосомах. Гены, ответственные за синтез бактериоцинов обычно формируют оперонный кластер. К этим генам относятся структурный ген пробактериоцина, гены, регулирующие их синтез и транспорт, а также ген иммунитета [17, 19]. Кластеры этих генов могут быть локализованы на хромосоме, на плазмиде, или же на конъюгативных транспозонных элементах [3, 5,11].

К проблеме классификации бактериоцинов посвящены многочисленные работы [9, 10, 15, 16]. Однако прийти к конечному, общепринятому результату пока не удалось. Большинство авторов бактериоцины разделяют на четыре класса: бактериоцины класса I- лантибиотики; бактериоцины класса II- короткие полипептиды без остатков лантионина; бактериоцины класса III – циклические полипептиды и бактериоцины класса IV – белки с большой молекулярной массой. Кроме того, представители класса II разделили на три подклассы: II.a - бактериоцины семейства педиоцинов; II.б - бактериоцины, синтезируемые без лидерного пептида и II.с – другие линейные энтероцины, не относящиеся к семейству педиоцинов.

Enterococcus faecium M13 впервые выделен и идентифицирован нами из полутвердого Масаллинского сыра, изготовленного в домашних условиях из молока коровы. Этот штамм является продуцентом энтероцина M13, обладающий широким спектром противобактериальной и противогрибковой активности. В настоящей работе мы продолжили определение ингибирующей активности этого штамма [14].

Материалы и методы

Изолирование штамма и обнаружение его антимикробной активности было выявлено по описанной ранее методике [14]. Список тест-организмов и питательных сред приводится в табл.1. Все используемые питательные среды были производства Difco (Detroit, США). Остальные реактивы – фирмы Sigma-Aldrich (США).

Таблица 1

Список микроорганизмов используемых в качестве тест-культур и спектр антимикробной активности штамма *Enterococcus faecium* M13[▲]

Индикаторные организмы	Среда	Активность
1. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> 340	MPC 37°C	+++ [♦]
2. <i>L. brevis</i> F145	MRS, 37°C	+++
3. <i>L. acidophilus</i> ATCC	MPC, 37°C	+

4. <i>Bacillus cereus</i> 11778 INRA	MRS, 37°C	++
5. <i>B. subtilis</i> 1759	BHI, 37°C	+
6. <i>Listeria ivanovii</i> ATCC	BHI, 37°C	+
7. <i>L. innocua</i> F (ENITIAA)	BHI, 37°C	++
8. <i>L. monocytogenes</i> 7644 ATCC	BHI, 37°C	+
9. <i>Echerichia coli</i> ATCC 23355	LB, 37°C	+
10. <i>E. coli</i> HB101	LB, 37°C	-
11. <i>Staphylococcus aureus</i> 9973	BHI, 37°C	-
12. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC	MRS, 37°C	++
13. <i>Salmonella typhimurium</i>	LB, 37°C	-
14. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ENITIAA)	YPD, 30°C	-
15. <i>Candida pseudotropicalis</i> (ENITIAA)	YPD, 30°C	-
16. <i>Fusarium</i> CBS 1385 INRA	PDA, 30°C	-

▲ – проверен методом диффузии в агар

◆ “-” активность не обнаружена, + диаметр чистой зоны 2-4 мм, ++ диаметр чистой зоны 4-8 мм, +++ диаметр чистой зоны >8 мм

Штаммы МКБ и *Enterococcus* были культивированы в МРС-среде (De Man, Rogosa and Sharpe. Состав среды (в %): дрожжевой экстракт – 0.5; мясной экстракт - 1.0; пептон - 1.0; глюкоза - 2.0; лимоннокислый аммоний-0.2; уксуснокислый натрий - 0.5; твин 80 - 0.1; K_2HPO_4 - 0.2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0.02; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$.+37⁰C), *L.innocua* и *St.aureus* -BH-среде (Brain-Heart. Состав среды (в %): смесь мозгового и сердечного экстракта-3.7; 87%-ный раствор глицерола-1; цистеин-HCl - 0.02; $Na_2S \cdot 9H_2O$. +37⁰C), *E. coli*-LB-среде (Luria-Bertani. Состав среды (в %): дрожжевой экстракт с триптоном-3; NaCl-1. +30⁰C), остальные (*S.serevisiae*, *C.pseudotropicalis*)-YPD среде. (Yeast extract/Peptone/Dextroza. Состав среды (в %): дрожжевой экстракт - 2; пептон-4; декстроза - 4; L-триптофан - 0.06).

Антимикробную активность штамма определяли методом диффузии. В мягкой агаровой (0,8%) среде, засеянной в чашке Петри клетками пассивной культуры, прорезались лунки диаметром 10 мм и в каждую лунку вносили 200 мкл стерильной культуральной жидкости потенциального продуцента. Затем чашки Петри охлаждали в течение 4 часов при +4° С. Это было необходимо для обеспечения радиальной диффузии компонентов, содержащихся в культуральной жидкости. После этого чашки Петри переносили в термостат и инкубировали в течении ночи при оптимальной температуре роста пассивной культуры. В качестве контроля использовали жидкий МРС. Антибактериальную активность культуральной жидкости оценивали посредством анализа критического разбавления. Активность БПИВ определяли как величину, обратную наивысшему разбавлению культуральной жидкости, проявляющему зону ингибирования индикаторных штаммов больше чем на 2 мм и выражали в произвольных единицах, деленных на миллилитр культуральной жидкости (ПЕ•мл⁻¹).

Химическую природу активного компонента проверяли инкубацией культуральной жидкости растворами протеиназы К (КФ 3.4.21.14, 11,4 Е/мг, из *Bacillus licheniformis*), проназы, α -амилазы II-A (КФ 3.2.1.1, 15 Е/мг, из *Bacillus subtilis*) и липазы VII (КФ 3.1.1.3, 50 Е/мг, из *Candida rugosa*) в течении 1,5 ч при 37⁰ С.

Для выяснения влияния рН на антимикробную активность рН культуральной жидкости доводили до нужных значений (рН 3-12) с помощью 5 N NaOH и 5 N HCl и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем рН в каждой пробирке доводили до 6,5 и определяли антимикробную активность по описанной методике.

Динамику продуцирования бактериоцина изучали при 37⁰ С и при неконтролируемых условиях рН. Через каждый определенный интервал времени проверяли рост клеток путем измерения оптической плотности суспензии (ОП при 600 нм) и рН.

Очистку энтероцина проводили по протоколу Renye et al. (2009). Супернатант получали из 50 мл свежей культуры штамма. Суспензию центрифугировали при 25000g, 4⁰С, в течение 30 мин. Супернатант отделяли и пропускали через фильтр (0,22мм), далее рН доводили до 4.4 и наносили в катионообменную колонку, наполненную с 10 мл SP Сефарозы, уравновешанной с 10 мМ фосфатным буфером, с рН 4.4. Для вытеснения неспецифических белков и пептидов колонку промывали с тем же буфером, в пять раз превышающим объем колонки. Энтероцин элюировали в линейном градиенте 0-1М хлористого натрия (108 мл) в 10 мМ фосфатного буфера рН 4.4. Полученные активные фракции собирали, и для дальнейшей очистки нанесли на колонку (Source RPC 15) высокоэффективной жидкостной обратнофазной хроматографии (ОФ – ВЭЖХ). Третий финальный этап очистки энтероцина осуществляли методом ОФ - ВЭЖХ на колонке RPNuc C₁₈ (5мм и 4,6-250мм). Сначала элюции проводили (5 мин) в градиенте 5-40% с буфером В (0,086% ТФУ в ацетонитриле), затем продолжали в градиенте 40-100% с буфером В (35 мин) (Буфер А- 0,1% водный раствор ТФУ). Собранные активные образцы были концентрированы в 10 раз.

Для определения молекулярной массы антимикробного пептида использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии Na-додецил-сульфата (Трицин-ДС-Na-ПААГ) с концентрацией акриламида 16.5%. В качестве белков-стандартов использовали маркерные белки с низкими молекулярными массами (от 1.06 до 26.60 кДа) (Sigma). Сила тока в крупнопористом геле составила 10мА, а в мелкопористом - 20 мА.

Для обнаружения антимикробной активности в гелях образцы наносили на гель в симметричном порядке. После электрофореза гель разделяли на две равные части. Для определения молекулярной массы первая часть геля, содержащая полосы с белками-маркерами, была окрашена

Кумасси синим R-250 по стандартному протоколу. Денситометрический анализ осуществлён по программе Quantity One (Bio-Rad). Вторую часть геля промывали дистиллированной водой в течение 3 часов, затем вкладывали в чашку Петри и наслаивали тонким слоем мягкого МРС-агара (0.7%), засеянным *L.bulgaricus* 340 и инкубировали в течение 16 часов при 37°C. Чистая зона на геле указывала на место локализации белковой полосы активной фракции.

Для выявления наличие гена/генов, кодирующих энтероцины, проводили ПЦР анализ ДНК штамма с помощью ранее описанных праймеров, специфичных к уже известным генам энтероцинов: *Ent A*, *B*, *P*, *50A*, *50B*, *31*, *Q* и *AS48*. ПЦР проводили в амплификаторе Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Реакционная смесь в объеме 100 мкл содержала (указаны конечные концентрации в смеси): 1x ПЦР буфер (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM каждого dNTPs, 1 ед. Taq ДНК полимеразы (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), 100 нмоль каждого праймера и 30 нг ДНК. ПЦР проводили в режиме: денатурация при 94 °C 5 мин, 35 циклов, состоящих из денатурации при 94 °C 1 мин, отжига при соответствующей температуре плавления каждого праймера и элонгации при 72 °C 1 мин. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 2.0% агарозном геле, содержащим этидиум бромид (0.5 мг/мл), в 0.5 x TAE (Трис Ацетат-EDTA) в течение 30 мин при 50 V. Визуализацию результатов проводили при помощи UV транс-иллюминатора.

Результаты и их обсуждение

В этой статье мы просуммировали результаты исследования по изучению антимикробной активности штамма *Enterococcus faecalis* M13, который был изолирован из образца сыра, изготовленного из коровьего молока в домашних условиях, опираясь на давние традиционные способы. В табл. 1 приводится список микроорганизмов, которые были использованы для определения спектра антимикробной активности в качестве тест-культуры. В этот список включены некоторые потенциально патогенные Грамм-положительные (ГпБ) и Грамм-отрицательные (ГоБ) бактерии, а также микроскопические грибы, способные в той или иной степени, отрицательно влиять на качество пищевых продуктов, значительно сокращать сроки их хранения, а также приводить к отравлению потребителей. Результаты этих экспериментов отображены в третьем столбце. Активный компонент выделенного штамма M13 ингибировал рост клеток всех штаммов листерии, разных видов лактобацилл, энтерококков и других ГпБ, таких, как *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, хотя степень ингибирования варьировала у разных штаммов в зависимости от видовой принадлежности пассивных культур. Из проверенных ГоБ только один штамм *E.coli*

НВ101 проявил чувствительность данному энтероцину. Другой штамм данного вида, *S. aureus*, *Salmonella*, также микроскопические грибы родов *Candida*, *Saccharomyces* и *Fusarium* оказались резистентными против влияния активного компонента изолированного штамма. Полученные результаты соответствуют сообщениям о строгой антилистерийной активности энтероцинов [12, 13]. Такая активность изученного энтероцина определяет его прикладной потенциал для профилактики листериоза в ферментированных продуктах массового использования.

Результаты по изучению динамики продуцирования бактериоцина показали, что антимикробная активность бактерий в культуральной жидкости обнаруживается уже спустя 2 часа после культивирования (рис. 1). Это наводит на мысль, что БПВ изученного штамма относится к группе первичных метаболитов бактериальной клетки. Активность культуральной жидкости достигает своего максимального значения спустя 5 ч, которое соответствует концу экспоненциальной фазы роста клеток.

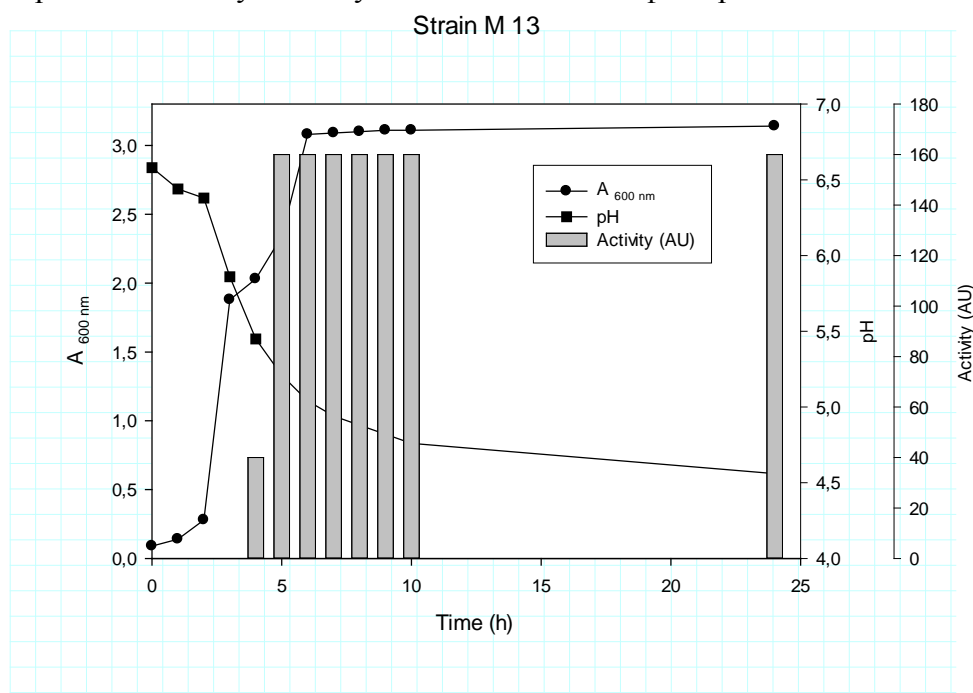


Рис. 1. Кинетика роста, подкисления культуральной жидкости и антимикробной активности штамма *Enterococcus faecium* M13 (тест-культура *L. bulgaricus* 340).

Далее изучено влияние ферментов и температуры на активность энтероцина M13. Под действием протеазы X, проназы E и химотрипсина, активный компонент потерял практически всю свою антимикробную активность (табл. 2). Это указывает на белковую природу активного компонента. Полная резистентность исследуемого активного компонента была

обнаружена против влияний каталазы, что исключает присутствие перекиси водорода в проявлении антимикробной активности данного штамма. Устойчивость антимикробного компонента к воздействиям амилолитического и липолитического ферментов указывает на отсутствие углеводных и липидных компонентов при формировании его активного домена. Инкубация культуральной жидкости штамма M13 при температуре 100⁰С, практически не повлияла на антимикробную активность БПИВ, а ее автоклавирование (1 атм. 121⁰С) привело к потере активности только на 25%.

Таблица 2

**Влияние ферментов, pH и температуры на антимикробную
активность штамма *Enterococcus faecium* M13
(тест-культура *L.bulgaricus* 340)***

Факторы влияния	Активность штамма (ПЕ/мл)
Ферменты	
Контроль (культ. жидкость)	+++
Каталаза	+++
Протеаза X	-
Проназа E	-
α -Химотрипсин II	-
α -амилаза II A	+++
Липаза VII	+++
Температура (⁰С)	
100 ⁰ С, 2 ч	+++
121 ⁰ С, 15 мин	++

Таким образом, активный компонент культуральной жидкости штамма *Enterococcus faecium* M13, обладающий антимикробными свойствами, термостабилен и имеет белковую природу, что позволяет отнести его к энтероцинам. По литературным данным, продуцентами энтероцина класса I являются, в основном, представители вида *Enterococcus faecales* (цитолизин) [6]. Это наводит на мысль, что энтероцин штамма M13 относится к энтероцинам класса II [12].

Далее активный компонент был частично очищен методами катионообменной хроматографии на Сефарозной основе и ОФ – ВЭЖХ, при которых, профиль элюции показала только один пик. Полученная активная фракция разделена методом Трицин-ДС-На-ПААГ-электрофореза. Результаты этих экспериментов отражены на рис. 1. Из этого рисунка видно, что активный компонент имеет пептидную природу с молекулярной массой между 3,49 кД и 6,5 кД (Рис. 2). Дальнейшее вычисление молекулярной массы, путем определения значения Rf показало, что масса активной полосы равна к 5 кД. Таким молекулярным весом чаще всего обладают энтероцины подкласса IIc [5], куда относятся энтероцины A, B, P, 50A, 50B, 31, Q и AS48.

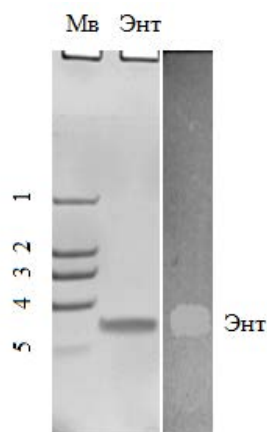


Рис.2. Экспрессия энтероцина штамма М13 (слева Na-ДДС-электрофорез очищенного энтероцина с мол. маркерами (5-3,49 кД, 4-6,5 кД, 3-14,2 кД, 2-17 кД, 1-26,6 кД) справа, гель наслаивающийся пассивной культурой).

Эти энтероцины являются однопептидными бактериоцинами, не имеющие каких-либо свойств, характерных для энтероцинов подкласса Па [1]. Например, энтероцин В не имеет IGNGV, Р и 31 выделяются sec-зависимым путем, а пэдиоциноподобные энтероцины I и Q не имеют лидерной последовательности вообще [7, 14].

Для определения классификации энтероцина М13, с помощью ПЦР анализа, продуцентный штамм был подвергнут скринингу по выявлению в его хромосоме генов известных энтероцинов данного подкласса. С этой целью использовали праймеры генов *Ent* А, В, Р, 50А, 50В, 31, Q и AS48. Результаты ПЦР амплификации представлены на рис. 3, где четко виден амплификант только одного гена с размером 216 по, который соответствует гену энтероцина Р [7]. Остальные же гены не амплифицировались, что указывает на их отсутствие. Энтероцин Р - это пептид с молекулярной массой 5 кД и имеющий С- и N- участки. Гены, участвующие в синтезе этого бактериоцина локализованы в хромосоме. Устойчивость продуцента к данному бактериоцину обеспечивается «белком иммунитета» С типа (32). Представители группы энтероцин Р обладают строгой антилистериозной активностью. К этой группе относятся энтероцины АА13, В1, В2, С16 и т.д. Впервые Энт Р был получен из супернатантов штамма *E. faecium* Р13, изолированного из испанских сосисок [7].

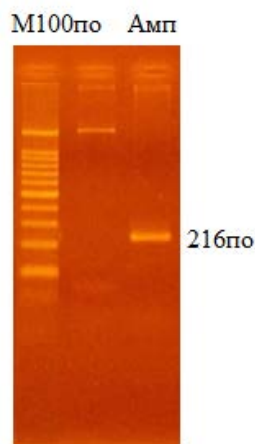


Рис. 3. ПЦР амплификация гена *entP*. 1.5% агарозный гель.

Таким образом, из штамма *Enterococcus faecium* M13 выделен и очищен антимикробный агент пептидной природы, который обладал строгой антилистериозной активностью. Протеолитические ферменты полностью инактивировали данный активный компонент, тогда как каталаза, липаза и α -амилаза не оказывали на него заметного влияния. Активный компонент оказался термостабильным полипептидом с молекулярной массой 5 кД. Методом ПЦР анализа в хромосоме штамма-продуцента обнаружен единственный амплификант с размером 216 пар оснований, который соответствует размеру гена энтероцина P.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермоленко Е.И. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы использования (обзор).// Вестник Ленинградского Университета. 2009, сер. 11, вып. 3, с.78-93.
2. Соловьева И.В., Точылина А.Г., Новикова Н.А., Белова И.В., Иванова Т.М., Соколова К.Я. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus*// Вестник Нижегородского Университета им. Лобачевского. 2010, N. 2(2), с. 462-468.
3. Altena K., Guder A., Cramer C., Bierbaum G. Biosynthesis of the Lantibiotic Mersacidin: Organization of a Type B Lantibiotic Gene Cluster // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, v.66, p.2565-71.
4. Atrih A., Rekhif N., Moir A.J.G., Lebrihi A. and Lefebvre G.. Mode of Action, Purification and Amino Acid Sequence of Plantaricin C19, an anti-*Listeria* Bacteriocin Produced by *Lactobacillus Plantarum* C19 // *Int. J. Food Microbiol.* 2001, v. 68, p. 93-104.
5. Banerjee S., Hansen J. Structure and Expression of a Gene Encoding the Precursor of Subtilin, a Small Protein Antibiotic // *J. Biol. Chem.*, 1988, v.263, p.9508-9514.
6. Booth M.G., Bojie C.P., Sahl H.G. et al. Structural Analysis and Enzymatic Activation of *Enterococcus Faecalis* Cytolysin, a Novel Lantibiotic.// *Mol Microbiol.* 1996, v. 21, p. 1176-1184.
7. Cintas L.M., Casaus P., Holo H. et al. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocine P, a Novel Sec- dependent Bacteriocin from *Enterococcus Faecium* P13, with a Broad Antimicrobial Spectrum // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, v.63, N11, p.4321–4330.

8. Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F. and Chikindas M.L. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation // *Int.J.Food Microbiol.* 2001, v. 71, p. 1-20.
9. De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins: Their Practical Importance // In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (eds). London: Blackie Academic and Professional., 1994a. pp.1-12.
10. Deaschel M.A. Antimicrobial substances from Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservative. *Food Technol.* 1989, v. 43, p.164-167.
11. Dufour A., Rince A., Uguen P., LePennec J. IS1675, a Novel Lactococcal Insertion Element, Forms a Transposon-like Structure Including the Lacticin 481 Lantibiotic Operon // *J.Bacteriol.*, 2000, v.182, p.5600-5605.
12. Franz C., Stiles M., Schleifer K., Holzapfel W. Enterococci in Foods-a Conundrum for Food Safety // *Int.J.Food Microbiol.*, 2003, v.88, No 2-3, p.105-122. Giraffa G. Functionality of Enterococci in Dairy Products // *Int.J.Food Microbiol.*, 2003, v.88, p.215-222.
13. Giraffa G. Functionality of Enterococci in Dairy Products // *Int.J.Food Microbiol.*, 2003, v.88, p.215-222.
14. Gulahmadov S.G., Batdorj B., Dalgalarondo M., Chobert J.M., Kuliev A.A. and Haertle T. Characterization of Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) from Lactic Acid Bacteria isolated from Traditional Azerbaijani Dairy Products // *Europ. Food Rec. Technol.* 2006, v 224, p.338-345.
15. Jack R.W., Tagg J.R. and Ray B. bacteriocins of Gram-positive Bacteria // *Microbiol. Rev.* 1995, v. 59, p. 171-200.
16. Klaenhammer T.R. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria // *FEMS Microbiol.Rev.* 1993, v. 12, p. 39-86.
17. McAuliffe O., Ross R., Hill C. Lantibiotics: Structure, Biosynthesis and Mode of Action // *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, v.25, p.285-308
18. Messens W. and De Vuyst L. Inhibitory Substances Produced by Lactobacilli Isolated from Sourdoughs – A Review // *Int.J.Food Microbiol.* 2002, v. 72, p.31-43.
19. Nes I., Diep D., Havarstein L. et al. Biosynthesis of Bacteriocins in Lactic Acid Bacteria // *Antonie van Leeuwenhoek*, 1996, v.70, p.113-28.
20. Renye J, Somcuti A, Moushumi P. Characterization of Antilisterial Bacteriocins, Produced by *Enterococcus Faecium* and *Enterococcus Durans* Isolates from Hispansh-style Cheeses. // *J Ind Microbial Biotechnol*, 2009, v. 36, p. 261-268.
21. Ross R.P., Morgan S. and Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 79, p.3-16.
22. Schillinger,U. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria // In: Bills, D.D. and Kung, S.(eds).*Biotechnology and Food Safety*. Butterworth-Heinemann, Boston, 1990, p.55-74.
23. Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. Guidelines for Manuscripts on Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria // *Int.J.Food Microbiol.* 1996, v. 33, p. 3-5.
24. Suma K., Misra M.C. and Varadaraj M.C. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus Plantarum* NCIM 2084 Produced in a Simple Glucose Broth Medium // *Inter. J. Food Microbiol.* 1998, v.40, p. 17-25.
25. Tagg J.R., Mc Given, A.R. Assay System for Bacteriocins // *Applied Microbiology*. 1971, v. 21, p. 943.

**ENTEROCOCCUS FAECIUM M13 ŞTAMININ ENTEROSİNİNİN BİOKİMYƏVİ
VƏ GENETİK XARAKTERİSTİKASI**

A.Ə.QULİYEV, S.Q.GÜLƏHMƏDOV

XÜLASƏ

Enterococcus faecium M13 ştamından ciddi antilisterioz fəallığa malik peptid təbiətli maddə ayrılmış və qismən təmizlənmişdir. Proteolitik fermentlərin təsirindən öz antimikrob fəallığını tam itirən bu maddə katalaza, lipaza və amilazanın təsirinə davamlı olmuşdur. Fəal maddənin molekulyar çəkisi 5 kD olan termostabil polipeptid olması aşkar edilmişdir. PSR analizinin köməyiylə prodüsent ştamın xromosomunda enterosin P geninə uyğun gələn (216 nc) ölçülü yeganə amplifikant aşkar edilmişdir.

Açar sözlər: Süd turşusu bakteriyaları, enterokoklar, enterosin, antimikrob fəallıq

**BIOCHEMICAL AND GENETIC CHARACTERISATION OF ENTEROCIN
PRODUCED BY *ENTEROCOCCUS FAECIUM* M13**

A.A.GULIYEV, S.G.GULAHMADOV

SUMMARY

The peptide with strong antilisteria activity produced by *Enterococcus faecium* M13 was isolated and partially purified. The active component was completely inactivated by proteolytic enzymes, whereas catalase, lipase and α -amylase are not exerted on a noticeable effect. Active component appeared thermostable polypeptide with a molecular weight of 5 kDa. The only amplificant with the size of 216 base pairs from the chromosome of producing strain, which corresponds to the size of the *ent. P* gene was detected by PCR analysis

Key words: Lactic acid bacteria, Enterococcus, enterocins, antimicrobial activity

Поступила в редакцию: 03.02.2014 г.

Подписано к печати: 12.05.2014 г.