

ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИОЦИНОПОДОБНОГО ИНГИБИРУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА (БПИВ) ШТАММА *Enterococcus faecium* Q1

**С.Г.ГЮЛЬАХМЕДОВ, Н.А.АБДУЛЛАЕВА, Т.МИРХАДИЗАДЕ,
Н.КОШКИ-ЗАДЕ, А.А.КУЛИЕВ**
Бакинский Государственный Университет
sahib66@rambler.ru

Изучено бактериоциноподобное ингибирующее вещество (БПИВ) из культуральной жидкости молочнокислой бактерии (МКБ) штамма *Enterococcus faecium* Q1, изолированного из сыра, приготовленного в домашних условиях в Газахском районе. БПИВ ингибировало рост *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Enterococcus faecales*, *Saccharomyces cerevisiae*, а также *Candida pseudotropicalis*, *Listeria innocua*, *Candida guilliermondii*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*. Проназа полностью, а протеаза и хитотрипсин частично подавляли его антимикробную активность. Каталаза, липаза и α -амилаза на активность БПИВ не оказали заметное влияние. БПИВ оказалось термостабильным, а также устойчивым к кислым и щелочным значениям pH полипептидом. Максимальная активность БПИВ в культуральной жидкости обнаруживалась в конце экспоненциальной фазы роста клеток.

Введение

Одним из актуальных направлений в обеспечение людей экологически безопасными пищевыми продуктами является их биозащита с помощью безопасных и натуральных консервантов. С этой целью в процессах ферментации уже давно используются молочнокислые бактерии (МКБ), продуцирующие ряд биологически-активные вещества с антимикробными свойствами [1-3]. Некоторые метаболиты МКБ участвуют в процессах созревании и при формировании ароматических, вкусовых и других органолептических качеств. Антагонизм МКБ в ферментированных продуктах ассоциируется с главными конечными продуктами их метаболизма, такими, как молочная и уксусная кислоты, перекись водорода, ферменты, литические агенты и/или бактериоцины [4-8].

В последние годы бактериоцины находятся в центре внимания многих исследователей, вследствие возможного использования их в качестве естественного пищевого предохранителя а также для приготовления новых антимикробных лекарственных препаратов [9-11].

Enterococcus faecium Q1 впервые выделен и идентифицирован нами из сыра, приготовленного в домашних условиях в Газахском районе. Этот штамм является продуцентом бактериоциноподобного ингибирующего вещества (БПИВ), подавляющего рост ряда Грам-положительных и Грам-отрицательных бактерий, в том числе и микроскопических грибов. В настоящей работе мы частично охарактеризовали ингибирующую активность этого штамма. Начатые

нами исследования с традиционными кисломолочными продуктами Азербайджана представляют большой научный и прикладной интерес [6].

Материалы и методы

Изолирование штамма и обнаружение его антимикробной активности было выявлено по описанной ранее методике [6]. 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* Q1 [▲]

Штаммы и микроорганизмы	Среда	Антимикробная активность
1. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> 340	MPC 37°C	+++ [♦]
2. <i>L. brevis</i> F145	MRS, 37°C	+++
3. <i>L. brevis</i> F1.144	MRS, 37°C	++
4. <i>L. brevis</i> F1106	MRS, 37°C	++
5. <i>Listeria innocua</i> F (ENITIAA)	BHI, 37°C	+
6. <i>Listeria ivanovii</i> ATCC	BHI, 37°C	+
7. <i>Echerichia coli</i> ATCC 23355	LB, 37°C	+
8. <i>Escherichia coli</i> HB101	LB, 37°C	-
9. <i>Staphylococcus aureus</i> CIP 9973	BHI, 37°C	-
10. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC	MRS, 37°C	++
11. <i>Salmonella typhimurium</i>	LB, 37°C	+
12. <i>Bacillus subtilis</i> 1759	BHI, 37°C	++
13. <i>B. mesentericus</i>	BHI, 37°C	+
14. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ENITIAA)	YPD, 30°C	+++
15. <i>Candida pseudotropicalis</i> (ENITIAA)	YPD, 30°C	-
16. <i>Candida guilliermondii</i>	YPD, 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 MPC-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; K₂HPO₄-0.2; MgSO₄•7H₂O-0.02; MnSO₄•4H₂O.+ 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; Na₂S•9H₂O. +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 течение ночи при оптимальной температуре роста пассивной культуры. В качестве контроля использовали жидкую МРС. Антибактериальная активность культуральной жидкости оценивали посредством анализа критического разбавления (З). 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). Для того, чтобы исключить ингибиторный эффект молочной кислоты и H₂O₂, рН культуральной жидкости доводили до 6,5 с 1М NaOH и инкубировали с раствором каталазы (КФ 1.11.1.6, 2,39 Е/мг, из печени быка) в течение 2 ч при 37⁰ С. Культуральную жидкость стерилизовали путем пропускания через фильтр с размером пор 0,22 мкм. 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 течение 1,5 ч при 37⁰ С. Воздействие фермента на антимикробные компоненты приостановили путем кипячения реакционной смеси 5 мин. Растворы используемых ферментов, конечные концентрации которых составили 1 мг/мл, готовили в стерильном 20 мМоль К-фосфатном буфере, рН 7.0. Последний, без добавления фермента, служил контрольным вариантом.

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 проинкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем рН в каждой пробирке доводили до 6,5 и определяли антимикробную активность по описанной методике.

Зависимость активности БПИВ от температуры определили путем инкубирования культуральной жидкости во водяной бане со соответствующими температурами и автоклавирования.

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

Результаты и их обсуждение

В Табл. 1 приводится список микроорганизмов, которые для определения спектра антимикробной активности, были использованы в качестве тест-культуры. В этот список включены некоторые потенциально патогенные Грамм-положительные и Грамм-отрицательные бактерии, а также микроскопические грибы, способные в той или иной степени отрицательно влиять на качество пищевых и кормовых продуктов, значительно сократить сроки их хранения, а также привести к отравлению потребителей этих продуктов. Результаты этих экспериментов суммированы в третьей столбце. Активный компонент выделенного штамма МКБ ингибировал рост клеток проверенных тест-организмов, хотя степень ингибирования варьировала у разных штаммов в за-

зависимости от видовой принадлежности пассивных культур. Клетки *E.coli* HB101, *Candida pseudotropicalis* и *S. aureus* СР 9973 в этом смысле составили исключение. Они оказались резистентными против влияния активного компонента изолированного штамма МКБ.

Изучение влияний таких протеолитических ферментов, как протеаза X, проназа E и химотрипсин, показало, что активный компонент исследуемого штамма при их инкубации с вышеперечисленными ферментами, потеряли практически всю свою антимикробную активность (табл. 2). Это указывает на белковую природу активного компонента. Полная резистентность исследуемого активного компонента была обнаружена также 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.

Таким образом, активный компонент культуральной жидкости штамма *Enterococcus faecium* Q1, обладающий антимикробными свойствами, имеет белковую природу, что позволяет отнести его к бактериоциноподобным ингибирующим веществам (БПИВ).

Следующая серия экспериментов была посвящена к изучению влияния рН, а также температуры культуральной жидкости на проявление антимикробной активности БПИВ исследуемого штамма. При практическом использовании БПИВ, в зависимости от вида ферментированных продуктов и технологии их производства, бактериоцины могут подвергаться влиянию различных значений температуры и рН среды. Следовательно, эксперименты подобного рода имеют большие прикладные значения. Результаты этих исследований также суммированы на Табл. 2. В пределах значений рН 3.0 – 10.0 антимикробная активность БПИВ изолированного штамма практически не менялась. При щелочной (рН 11.0) среде наблюдалось уменьшение активности БПИВ на 80%. Интересно, что при увеличении рН культуральной жидкости до значения 12.0, антимикробная активность БПИВ практически не проявилась.

Изучение влияния температуры на активность БПИВ выявило термостабильности исследуемого активного компонента. Инкубация культуральной жидкости при температуре 100⁰С, практически не повлияла на антимикробную активность БПИВ, а ее автоклавирование (1 атм. 121⁰С) привело к потере активности только на 25%. Сравнительная толерантность антимикробных компонентов к влиянию рН и температуры позволяет использовать их продуценты в качестве стартовых культур при изготовлении различных кисломолочных и ферментированных растительных продуктов, в том числе сыров, оливок и солевой капусты [2, 7, 14].

Результаты по изучению динамики продуцирования бактериоцина показали, что уже спустя 2 часа после культивирования бактерий в культуральной жидкости обнаруживается антимикробная активность (Рис. 1). Это наводит на мысль, что БПИВ 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.

**Влияние ферментов, pH, температуры и NaCl на антимикробную
активность штамма *Enterococcus faecium* Q1
(тест-культура *L.bulgaricus* 340)[♦]**

Факторы влияния	Активность штамма (ПЕ/мл)
Ферменты	
Контроль (культ. жидкость)	+++
Каталаза	+++
Протеаза X	+
Проназа E	0
α -Хемотрипсин II	+
α -амилаза II A	+++
Липаза VII	+++
pH	
3	+++
4	+++
5	+++
6	+++
7	+++
8	+++
9	+++
10	+++
Температура (°C)	
50°C, 30 дэq	+++
100°C, 5 дэq	+++
100°C, 15 дэq	+++
100°C, 30 дэq	+++
121°C, 15 дэq	++

♦ В качестве контроля брали культуральную жидкость с pH 6.5

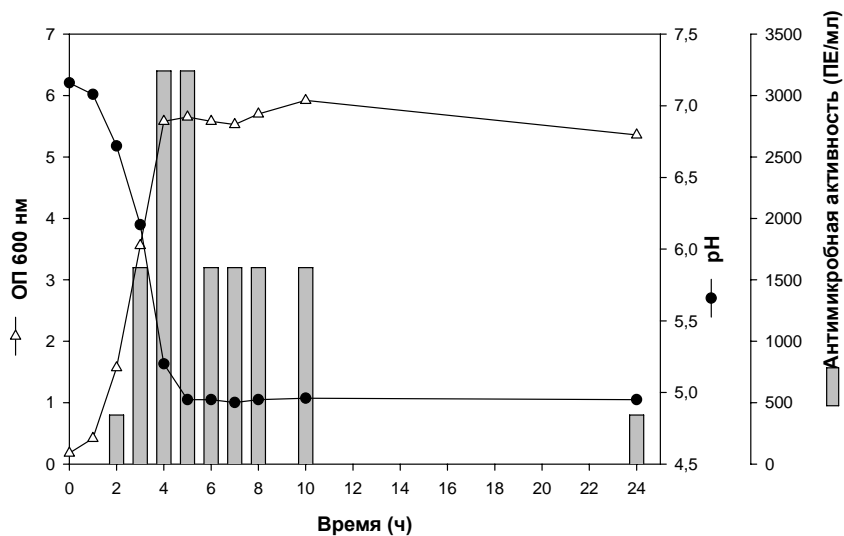


Рис. 1. Кинетика роста, подкисления культуральной жидкости и антимикробной активности штамма *Enterococcus faecium* Q1 (тест-культура *L.bulgaricus* 340)[♦]

Таким образом, из культуральной жидкости штамма *Enterococcus faecium* Q1 был выделен и охарактеризован антимикробный компонент белковой природы. Этот компонент можно отнести к бактериоцинам, однако, ввиду отсутствия чистого белкового препарата данного компонента, это принято называть БПИВ. Последний является термостабильным, устойчивым к кислым и щелочным значениям рН полипептидом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Atrih A., Rekhif N., Moir A.J.G., Lebrihi A., 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.
2. 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.
3. De Vuyst, L., 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., 1994, p.1-12.
4. Deaschel M.A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. *Food Technol.* 1989, v. 43, p.164-167.
5. Jack R.W., Tagg, J.R., Ray B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria // *Microbiol. Rev.* 1995, v. 59, p. 171-200.
6. Gulahmadov S.G., Batdorj B., Dalgalarondo M., Chobert J-M., Kuliev A.A., 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.
7. Klaenhammer T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria // *FEMS Microbiol.Rev.* 1993, v. 12, p. 39-86.
8. Messens W., De Vuyst L. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs – a review // *Int.J.Food Microbiol.* 2002. v. 72, p.31-43.
9. Ross R.P., Morgan S., Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 79: 3-16.
10. Sambrook J, Fitsch E.F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* // Cold Spring Harbor Press, 1989, p. 27-138.
11. Schilinger 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.
12. Schillinger U., Holzapfel W.H. Guidelines for manuscripts on bacteriocins of lactic acid bacteria // *Int.J.Food Microbiol.* 1996, v. 33, p. 3-5.
13. Suma K., Misra M.C., 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.
14. Tagg J.R., Mc Given A.R. Assay system for bacteriocins // *Applied Microbiology.* 1971, v. 21, p. 943.

***Enterococcus faecium* Q1 ŞTAMMININ BAKTERİOSİNƏBƏNZƏR İNHİBİRƏDİCİ
MADDƏSİNİN (BİM) XARAKTERİK XÜSUSİYYƏTLƏRİ**

**S.Q.GÜLƏHMƏDOV, N.A.ABDULLAYEVA, T.MİRHADİZADƏ,
N.KOŞKİ-ZADƏ, A.Ə.QULİYEV**

XÜLASƏ

Qazax pendirindən izolə edilmiş *Enterococcus faecium* Q1 ştamminin kultural mayesindən ayrılmış bakteriosinəbənzər ingibirədici maddə (BİM) öyrənilmişdir. Bu maddə *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Enterococcus faecales*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pseudotropicalis*, *Listeria innocua*, *Candida guilliermondii*, *Bacillus subtilis* habelə *Salmonella typhimurium* kimi test kulturaların böyüməsini ingibirə etmişdir. Pronaza BİM-in fəallığını tam tormozlamış, proteaza və xemotripsin fermentləri isə qismən zəiflətmişdir. Katalaza, Lipaza və α -amilaza BİM-in fəallığına təsir etməmişlər. Bu maddə termostabil, həmçinin mühitin turş və qələvi mühitlərinin təsirinə qarşı davamlı polipeptiddir. Onun maksimal fəallığı hüceyrənin böyüməsinin gec eksponensial fazasında müşahidə edilmişdir.

**CHARACTERIZATION OF A BACTERIOSINE-LIKE INHIBITORY SUBSTANCE
(BLIS) PRODUCED BY *Enterococcus faecium* Q1**

**S.G.GULAHMADOV, N.A.ABDULLAYEVA, T.MIRHADIZADEH,
N.KOSHKIZADEH, A.A.GULIYEV**

SUMMARY

The paper studies a bacteriosine-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Enterococcus faecium* Q1, isolated from Gazakh cheese. BLIS was active against *Candida pseudotropikalis*, *Listeria innocua*, *Candida gillermondii*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Enterococcus faecales* and *Saccharomyces cerevisiae*. Complete inactivation or significant reduction in antibacterial activity of the agent produced by the selected strain was observed after the treatment of cell-free supernatant with pronase, protease and khimotrypsin, but not with catalase, amylase, and lipase. The activity of the studied strain was stable over a wide pH range from 3 to 10. The antimicrobial substance in neutralized active culture supernatant fluid appeared to be heatstable.