

УДК 517.63

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РОСТ  
И БИОСИНТЕЗ БАКТЕРИОЦИНА *E. FAECIUM* S5****С.Г.ГЮЛЬАХМЕДОВ, Н.А.АБДУЛЛАЕВА**  
*Бакинский Государственный Университет*  
*sahib66@rambler.ru*

*Изучено влияние условий культивирования на интенсивность роста и продуцирования бактериоцина штамма *Enterococcus faecium* S5. Максимальный рост *E. faecium* S5 был обнаружен в M17L среде и наибольший бактериоциновый титр проявился в ранней стационарной фазе роста культуры. Оптимальное значение стартовой численности популяции клеток продуцента для максимального синтеза бактериоцина составляло  $10^7$  -  $10^{7.5}$  КОЕ/мл. Наиболее высокая активность бактериоцина и плотность бактериальных клеток в среде штамма *E. faecium* S5 были обнаружены при  $+37^{\circ}\text{C}$  и при стартовом значении pH 6.0.*

**Ключевые слова:** *Enterococcus faecium*, бактериоцины, антимикробная активность, оптимизация

Представители рода *Enterococcus* найдены во многих традиционных кисломолочных продуктах, изготовленных в средиземноморских и ближневосточных странах, а так же в странах Закавказья, из сырого овечьего, коровьего или козьего молока [2, 5, 7, 12]. Эти бактерии в настоящее время играют фундаментальную роль в изготовлении ферментированных кисломолочных продуктов, вероятнее всего благодаря протеолизу, липолизу и расщеплению цитратов, следовательно, добавляя уникальный вкус и аромат к этим продуктам [1, 9, 13]. Они также играют роль защитных агентов против различных патогенов, в том числе, против представителей рода *Listeria* - известного микроба, присутствующего в мясе и молочных продуктах. Это происходит благодаря их способности выделять антимикробные пептиды, называемые бактериоцинами [1, 6, 12].

Хотя энтерококки длительное время используются в качестве заквасочной культуры для изготовления различных видов сыров, они иногда ассоциируются с патогенностью. Предполагается, что они развивают эндокардит, бактериемию и инфекции мочевого тракта [8]. Следовательно, для защиты продуктов ферментации, в качестве добавки целесообразно

вносить не самих штаммов энтерококков, а их бактериоцинов [9, 14]. В таком случае возникает необходимость оптимизировать энтероциногенез, чтобы получить большое количество антимикробной субстанции. Этот процесс зависит от многих факторов, которые не редко являются штамм специфичными [8, 9].

В данной работе мы изучали влияние условий культивирования на рост и секрецию бактериоцина штамма *E. faecium* S5, изолированного нами из кисломолочных продуктов Азербайджана [12].

### Материалы и методы

Изолирование штамма и обнаружение его антимикробной активности проводилось по ранее описанной методике [2]. В качестве пассивных культур выбирали *Lactobacillus bulgaricus* 340, которые были культивированы в МРС среде. Штамм-продуцент *E. faecium* S5 выращивали в M17L среде при +37<sup>0</sup>С. Все используемые питательные среды были производства Difco (Detroit, США) и имели следующий состав: МРС-среда (в %) (De Man, Rogosa and Sharpe): 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; К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>-0.2; MgSO<sub>4</sub>•7Н<sub>2</sub>О - 0.02; MnSO<sub>4</sub>•4Н<sub>2</sub>О, + 37<sup>0</sup>С); M17 среда (в г/л): соевый пептон (5.0), мясной пептон (2.5), казеиновый пептон (2.5), дрожжевой экстракт (2.5), мясной экстракт (5.0), аскорбиновая кислота (0.5), сульфат магния (0.25), глицерофосфат натрия (19.0), лактоза (5.0). При 25<sup>0</sup>С рН M17 равно 7.0 ± 0.2; Остальные реактивы – фирмы Sigma-Aldrich (США).

Антимикробную активность штамма определяли методом диффузии и оценивали посредством анализа критического разбавления, как описано ранее [12].

рН культуральной жидкости изменяли с помощью 5 N NaOH и 5 N HCl. Инкубацию проводили в течении ночи при нужных температурных условиях. Перед определением антимикробной активности в каждом образце рН доводили до 6,5.

Динамику продуцирования бактериоцина изучали через каждый определенный интервал времени, при которых также проверяли рост клеток путем измерения оптической плотности суспензии (ОП при 600 нм) и рН.

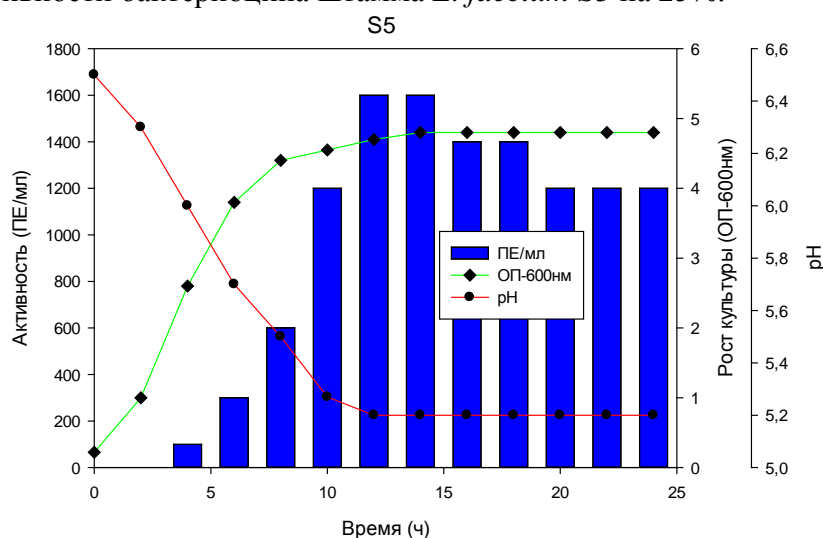
### Результаты и их обсуждение

Для достижения поставленной цели сначала мы следили за динамикой роста культуры, синтезом органических кислот и бактериоцина штамма *E. faecium* S5 в M17L среде при +37<sup>0</sup>С. На рис. 1 отражены результаты этих исследований. Из рисунка видно, что максимальный рост культуры наблюдался на 14 ч. культивирования штамма и приравнялся значению 4,83. Такое значение оптической плотности клеток не претерпело значительным изменениям до конца времени культивирования, которое

продолжалось 24 ч. При этом, рН культуральной жидкости от изначального значения рН 6,5, опустилось до отметки рН 4,9 и оставалось на этом уровне до конца наблюдений.

Первые признаки проявления антимикробной активности в культуральной жидкости были обнаружены на 4 ч культивирования, который соответствовал фазе ускорения роста. Активность бактериоцина достигала своего максимального значения в начале стационарной фазы и приравнялась 1600 ПЕ/мл. Однако дальнейшее культивирование штамма сопровождалось падением его бактериоциновой активности. Так, на 16 ч активность бактериоцина уменьшилась на 200 ПЕ/мл, на 20 ч – еще на 200 ПЕ/мл и приравнялась к 1200 ПЕ/мл, что составляло 75% максимальной активности.

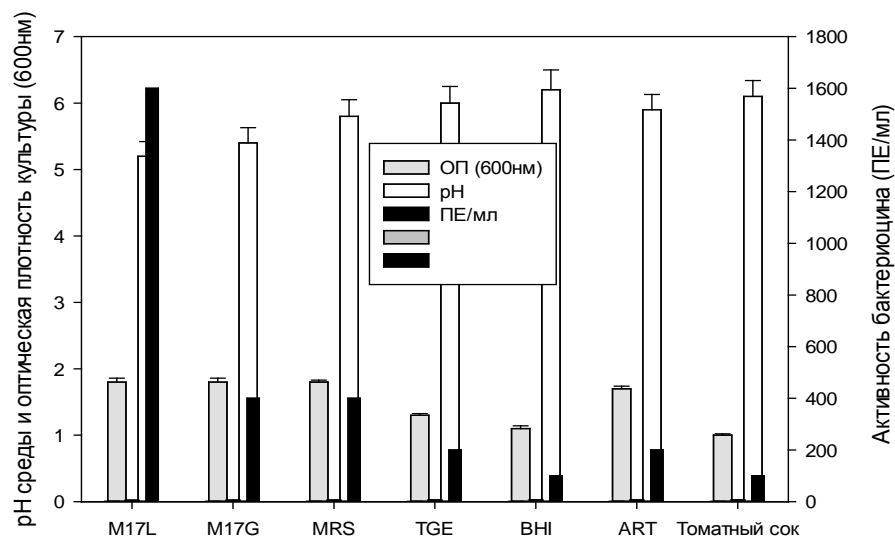
По литературным данным, фазы обнаружения максимального значения антимикробной активности бактериоцинов отличаются у разных штаммов – продуцентов. Так, например, в подобных экспериментах со штаммами *E. faecium* IM1 и *E. faecium* AQ71, максимальная активность бактериоцина была обнаружена на экспоненциальной фазе роста [3, 8]. В этом отношении наши результаты отличались от этих экспериментов, но сходились с результатами Yamamoto и его сотрудников, которые исследовали динамику синтеза бактериоцина штамма *E. faecalis* RJ-11 и обнаружили максимальную активность в начале стационарной фазы роста штамма – продуцента [21]. Такое различие в полученных результатах может быть связано с рН средой и температурой культивирования, составом питательной среды, различными протеолитическими ферментами, а также адсорбцией молекул бактериоцина на поверхность клеточной стенки штамма-продуцента. Последний фактор также стал причиной редуцирования активности бактериоцина штамма *E. faecium* S5 на 25%.



**Рис. 1.** Динамика роста, подкисления среды и продуцирования бактериоцина штамма

*E. faecium* S5 в M17 – среде при +37<sup>0</sup>С. Пассивная культура - *Lb. bulgaricus* 340

В следующей серии экспериментов мы исследовали зависимость бактериоцинового титра от состава среды культивирования и стартового количества бактерий – продуцентов. Результаты первого опыта отражены на рис. 2. Как видно из этого рисунка, штамм был культивирован в 7 разных средах - M17L, M17G, MРС, TGE, ВНИ, ART и томатном соке. Однако самая высокая активность бактериоцина была обнаружена в культуральной жидкости штамма в M17L среде. Активность бактериоцина в этой среде была равна 1600 ПЕ/мл. Ближайший показатель бактериоцинового титра был обнаружен в M17G и MРС средах – 400 ПЕ/мл, что составило только ¼ часть активности, обнаруженной в M17L среде. При этом интенсивность роста исследуемого штамма в этих средах практически не уступила росту в M17L среде. Самой неудачной средой для роста и продуцирования бактериоцина штамма *E. faecium* S5 была ВНИ – среда и томатный сок. В обеих средах рост штамма был слабым, а бактериоциновая активность составила всего 100 ПЕ/мл.

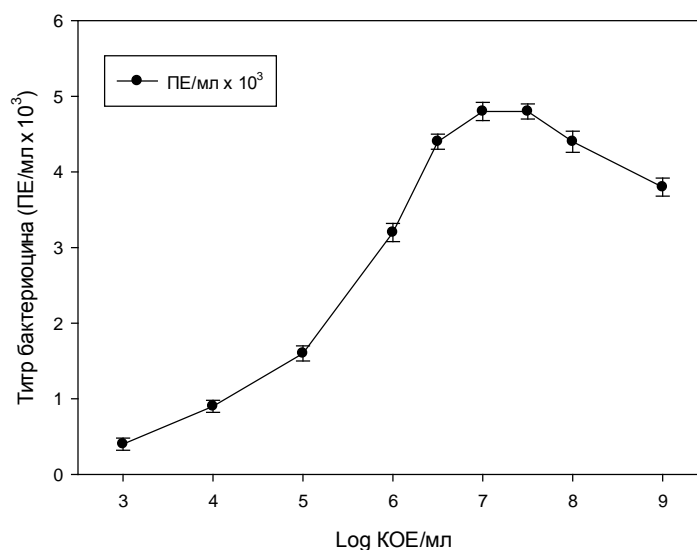


**Рис. 2.** Влияние различных питательных сред на рост, подкислению среды и на бактериоциновую активность штамма *E. faecium* S5. (Время культивирования 12 ч при +37<sup>0</sup>С. Пассивная культура - *L. bulgaricus* 340)

Вопреки нашим результатам, многие исследователи сообщили, что лучшей средой для роста и синтеза бактериоцина является MRS среда [2, 18-20], в составе которой отсутствует лактоза. Видимо, в отличие от глюкозы, данный источник углерода необходим для синтеза и секреции бактериоцина штамма *E. faecium* S5. Примечательно, что добавление в базовую M17 среду в эквивалентном с MRS количестве (0,5%) глюкозы (M17G среда) не приводило к повышению титра бактериоцина, хотя оптическая плотность культуры была одинаковой (1,8) во всех трех средах

– MRS, M17G и M17L. С другой стороны, почти такой же рост культуры мы наблюдали в ART- среде, в состав которой также входит 0,5% глюкоза. При этом титр бактериоцина в ней составлял всего лишь 100 ПЕ/мл. Однако по результатам Cheigh и др. (2002), для роста и продуцирования бактериоцина штамма *Lactococcus lactis* A 164, лучшим источником углеродного питания также была лактоза [5].

В следующей части наших опытов мы изучали зависимость бактериоцинового титра от стартового значения живых бактерий, которое было внесено в среду культивирования. Результаты этих опытов суммированы на рис. 3.



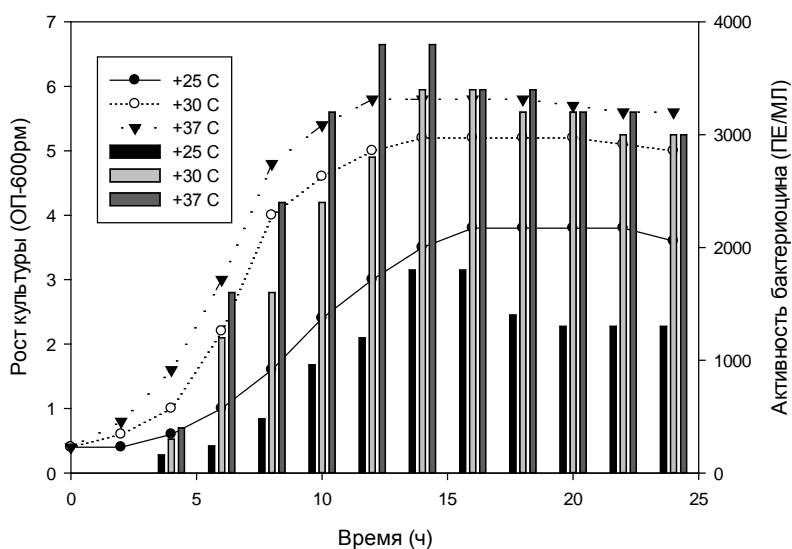
**Рис. 3.** Зависимость активности бактериоцина от стартового значения живых бактерий *E. faecium* S5 в M17L среде, при +37°C (Время культивирования 12 ч, пассивная культура - *L. bulgaricus* 340)

Из этого рисунка видно, что по мере увеличения численности бактерий штамма – продуцента повышается также антимикробная активность бактериоцина. Так, например, увеличение концентрации клеток продуцента на 2 порядка приводило к повышению активности бактериоцина на 700 ПЕ/мл, а при внесении в среду бактерий в численности  $10^6$  единиц активность бактериоцина была равна 3,200 ПЕ/мл. Такая тенденция продолжалась до значения концентрации клеток  $10^7$ , при котором титр бактериоцина составлял 4800 ПЕ/мл. Такой же титр был обнаружен в среде с концентрацией клеток в популяции  $10^{7,5}$ , т.е., 31,6 миллионов единиц. Однако дальнейшее аналогичное увеличение численности бактерий отрицательно отражалось на титре бактериоцина и он упал до значения 4200 ПЕ/мл, что на 12,5% ниже предыдущего значения, а при численности бактерий  $10^8$  единиц активность бактериоцина упала еще на 600 единиц и

была равна 3800 ПЕ/мл. Это может быть связано с нарушением равновесия между интенсивностью секреции бактериоцина и скоростью его адсорбции на поверхность клеток продуцента в пользу последней.

Таким образом, для максимального продуцирования бактериоцина штамма *E. faecium* S5, оптимальной средой явилась M17L среда, а оптимальным значением стартовой численности популяции клеток продуцента составляло  $10^7 - 10^{7,5}$  клеток в каждом мл среды.

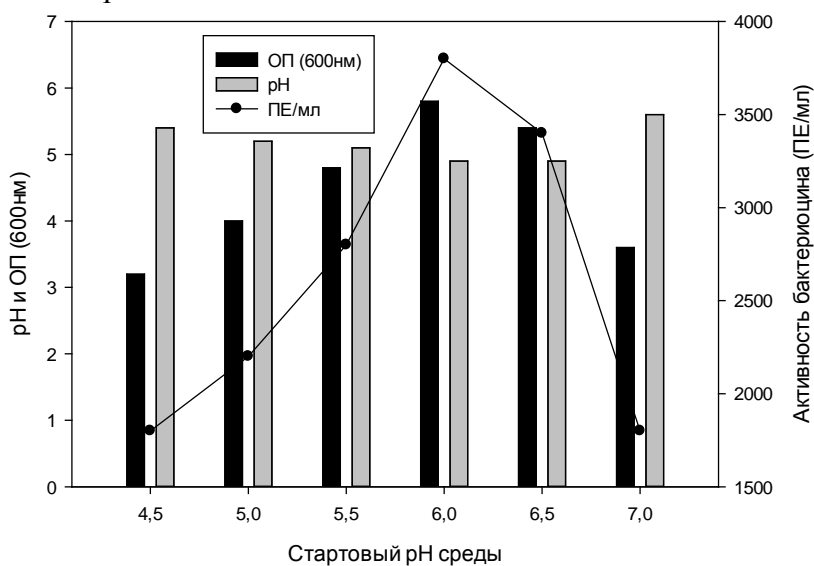
В следующей серии исследований мы изучали зависимость процессов роста, синтеза и секреции бактериоцина штамма *E. faecium* S5 от температуры культивирования и pH среды. На рис. 4 отражены результаты влияния различной температуры на динамику прослеживаемых процессов. Из этого рисунка следует, что интенсивность роста культуры при различных температурных условиях отличалась друг от друга. Так, наиболее интенсивный рост штамма наблюдали при +37<sup>0</sup>С. При этом максимальная оптическая плотность культуры составляла 5,8. Понижение температуры среды значительно ослабило рост культуры. Например, при +30<sup>0</sup>С максимальный рост культуры составил 5,1, а при +25<sup>0</sup>С аналогичный показатель составлял 3,6. Судя по полученным данным, наивысшая бактериоциновая активность была обнаружена также при +37<sup>0</sup>С. При низких температурных условиях культивирования интенсивность синтеза бактериоцина также замедлялась. Максимальный бактериоциновый титр в культуре при +37<sup>0</sup>С составлял 3800 ПЕ/мл, при +30<sup>0</sup>С – 3400 ПЕ/мл, а при +25<sup>0</sup>С он приравнивался к 1800 ПЕ/мл, что более чем в 2 раза ниже активности обнаруженной при +37<sup>0</sup>С.



**Рис. 4.** Влияние температуры культивирования на динамику роста и секрецию бактериоцина штамма *E. faecium* S5 (стартовый pH среды 6.5)

Результаты опытов по изучению зависимости роста и бактериоциновой активности штамма *E. faecium* S5 от pH среды суммированы на рис. 5. Из этого рисунка видно, что максимальный рост штамма и максимальная активность его бактериоцина были обнаружены при начальном значении pH среды 6.0, в котором эти численные значения достигали уровня 5,82 и 3800 ПЕ/мл, соответственно. Понижение или повышение стартового значения pH среды на 0.5 единиц приводило к редуцированию бактериоциновой активности на 26% (при pH 5.5) и 10,5% (при pH 6.5), соответственно. Наименьшая бактериоциновая активность и самый слабый рост культуры были обнаружены при pH 4.5 и pH 7.0. Так, при pH 4.5 ОП культуры составлял 3,2 единицы, а при pH 7.0 – 3,32 единицы. В обоих значениях pH бактериоциновая активность приравнялась к 1800 ПЕ/мл, что на 53% была ниже максимального значения, обнаруженного при pH 6.0.

Таким образом, наиболее высокая активность бактериоцина и плотность бактериальных клеток в среде штамма *E. faecium* S5 были обнаружены при +37<sup>0</sup>C и при стартовом значении pH 6.0. Полученные результаты наводят на мысль о том, что температура культивирования и стартовое значение pH среды играют существенную роль в процессах роста и секреции бактериоцина данного штамма.



**Рис. 5.** Влияние изначального значения pH среды на динамику роста и секрецию бактериоцина штамма *E. faecium* S5 (температура культивирования - +37<sup>0</sup>C)

По литературным данным, оптимальное значение температуры среды для роста и синтеза бактериоцина отличаются у разных штаммов – продуцентов. При этом оптимальное значение этого фактора для роста штамма не всегда способствует максимальному синтезу бактериоцина или, наоборот. Так, например, максимальное количество биомассы штамма *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* A164 было обнаружено при +37<sup>0</sup>C. Но, макси-

мальный бактериоциновый титр в этой культуре сформировался при +30<sup>0</sup>С [5]. Оптимальной температурой роста *Enterococcus faecium* M13 была 36<sup>0</sup>С, хотя максимальная энтероциновая активность была обнаружена при 32<sup>0</sup>С [2]. В отличие от этих результатов, в наших экспериментах оптимальная температура роста штамма *Enterococcus faecium* S5 совпала с оптимальной температурой синтеза бактериоцина (+37<sup>0</sup>С). Такое совпадение было обнаружено и в трудах ряда исследователей [13-14].

Такая же картина вырисовывалась при анализе оптимальных значений стартового рН среды для роста и синтеза бактериоцина различными штаммами продуцентами. Так, оптимальное значение стартового рН для роста и секреции бактериоцинов для таких штаммов, как *Lactococcus lactis* [14], *L. brevis* OG1 [13], так же как у штамма *E. faecium* S5, было одинаковым. У одних оно составляло 6.5, у других 6.0, а у штамма *L. brevis* OG1 была еще ниже – 5.5. Однако стартовое рН<sub>опт</sub> для роста культуры *E. faecium* M13 было 6,8, тогда как наибольшая активность бактериоцина наблюдалась при рН 6,2 [2].

Таким образом, максимальный рост *E. faecium* S5 был обнаружен в M17L среде и наибольший бактериоциновый титр проявился в ранней стационарной фазе роста культуры. Оптимальное значение стартовой численности популяции клеток продуцента для максимального синтеза бактериоцина составляло 10<sup>7</sup> - 10<sup>7,5</sup> КОЕ/мл. Наиболее высокая активность бактериоцина и плотность бактериальных клеток в среде штамма *E. faecium* S5 были обнаружены при +37<sup>0</sup>С и при стартовом значении рН 6.0.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ермоленко Е.И. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы использования (обзор) // Вестник Ленинградского Университета. 2009, сер. 11, в. 3, с. 78-93.
2. Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н.А. Оптимизация продуцирования энтероцинина штамма *Enterococcus faecium* M13, изолированного из азербайджанского сыра// Qafqaz Universiteti Jurnalı. Kimya və biologiya seriyası. 2014, с. 2, № 1, s. 35-39.
3. Ahmadova, A., Todorov, S.D., Choiset Y. et all. Evaluation of Antimicrobial Activity, Probiotic Properties and Safety of Wild Strain *Enterococcus Faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal Cheese// Food Control. 2013, v. 30, p. 631-641.
4. Aly E. Abo-Amer. Optimization of Bacteriosine Production by *Lactobacillus Acidophilus* AA11, a Strain isolated from Egyptian Cheese// Ann Microbiol. 2011, v. 61, p. 445-452. DOI 10.1007/s13213-010-0157-6.
5. Cheigh C., Choi H., Park H. et al. Influence of Growth Conditions on the Productions of Nisin-like Bacteriocin by *Lactobacillus Lactis* subsp. *Lactis* A164 isolated from Kimchi//J Biotechnol, 2002, v. 95, p. 225-235.
6. 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.
7. 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, p.1-12.
8. El-Ghaish, S., El-Bas, A., Haertle T., et all. Bacteriocin Production and Safety Evaluation of non-Starter *Enterococcus Faecium* IM1 and *Enterococcus hirae* IM1 Strains isolated

- from Homemade Egyptian Dairy Products// Europ. Food Rec. Technol. 2015, DOI 10.1007/s00217-015-2424-x.
9. Foulquié Moreno M., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. The Role and Application of Enterococci in Food and Health. International Journal of Food Microbiology, 2006, v.106, p.1–24.
  10. Franz C., Stiles M., Schleifer K., Holzappel W. Enterococci in Foods-a Conundrum for Food Safety // Int.J.Food Microbiol. 2003, v. 88, No 2-3, p.105-112.
  11. Giraffa G. Functionality of Enterococci in Dairy Products // Int.J.Food Microbiol., 2003, v. 88, p.215–222.
  12. Gulahmadov, S. G., Batdorj, B., Dalgalarondo, M. et al. 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.
  13. Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., and Onilude, A.A. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1// Afr.J. Biotechnol. 2003, v. 2(7), p. 179-184.
  14. Ramachandran, B., Srivathsan, J., Sivakami, V., et al. Production and Optimization of Bacteriocin from *Lactococcus Lactis*// J. Acad. Indus. Res. 2012, v.1(16), p. 306-309.
  15. Rajaram G., Manivasagan P., Thilagavathi B., et al. Purification and Characterization of a Bacteriocin produced by *Lactobacillus Lactis* isolated from Marine Environment. // Adv J Food Sci Technol, 2010, v.2, p. 138-144.
  16. 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.
  17. Ross, R.P., Morgan, S. and Hill, C. Preservation and Fermentation: Past, Present and Future// Int. J. Food Microbiol. 2002, v. 79, p. 3-16.
  18. Todorov S., Botes M., Guigas C. et al. Boza, a Natural Source of Probiotic Lactic Acid Bacteria // Journal of Applied Microbiology, 2008, v.104, p. 465-477.
  19. Todorov S., Dicks L. Effect of Medium Components on Bacteriocin Production by *Lactobacillus Pantarum* Strains ST23LD and ST341LD, isolated from Spoiled Olive Brine // Microbiological Research, 2006, v.161, p.102-108.
  20. Todorov S., Wachsman M., Tomé E. et al. Characterisation of an Antiviral Pediocinlike Bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* // Food Microbiology, 2010, v.27, p.869- 879.
  21. Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M., Okazaki, M. Purification and Characterization of a Novel Bacteriocin produced by *Enterococcus Faecales* Strain RJ-11// Appl Environ Microbiol, 2003, v. 69, p. 5746-5753.

## **KULTURAL AMİLLƏRİN *ENTEROCOCCUS FAECIUM* S5 ŞTAMININ BÖYÜMƏSİNƏ VƏ BAKTERİOSİN SİNTEZİNƏ TƏSİRİ**

**S.Q.GÜLƏHMƏDOV, N.A.ABDULLAYEVA**

### **XÜLASƏ**

Kultural amillərin *Enterococcus faecium* S5 ştamının böyüməsinə və bakteriosin sintezinə təsiri öyrənilmişdir. Kulturanın maksimal böyüməsi M17L mühitində müşahidə edilmiş və ən yüksək bakteriosin titri erkən stasionar fazaya təsadüf etmişdir. Maksimal bakteriosin sintezi üçün diri produsent hüceyrələrin başlanğıc sayı  $10^7 - 10^{7.5}$  DH/ml intervalında olmuşdur. *Enterococcus faecium* S5 ştamının maksimal böyüməsi və ən çox bakteriosin ifrazı  $+37^{\circ}\text{C}$  temperaturda və mühitin başlanğıc pH -nın 6.0 qiymətində müşahidə edilmişdir.

**Açar sözlər:** *Enterococcus faecium*, bakteriosin, antimikrob fəallıq, optimallaşdırma.

**INFLUENCE OF CULTURAL CONDITIONS ON THE PRODUCTION  
OF BACTERIOCIN BY *ENTEROCOCCUS FAECIUM* S5**

**S.G.GULAHMADOV, N.A.ABDULLAYEVA**

**SUMMARY**

The influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Enterococcus faecium* S5 was investigated. The maximum growth of *E. Faecium* S5 was found in the M17L medium and largest bacteriocin titer appeared at the early stationary growth phase of the culture. The optimum value of the starting population of cells producing maximum bacteriocin synthesis was  $10^7 - 10^{7.5}$  CFU/ ml . The highest bacteriocin activity and maximum bacterial cell density of the strain *E. faecium* S5 were found at + 37<sup>0</sup> C, and on initial pH of 6.0.

**Key words:** *Enterococcus Faecium*, bacteriocin, antimicrobial activity, optimization

*Поступила в редакцию: 04.03.2015 г.*

*Подписано к печати: 23.06.2015 г.*