

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И pH СРЕДЫ НА ТИТР БАКТЕРИОЦИНА ШТАММА *E. faecium* J1-48

С.Г. Гюльяхмедов<sup>1</sup>, А.А. Кулиев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан  
e-mail: [sahib66@rambler.ru](mailto:sahib66@rambler.ru)

**Резюме.** Исследовано влияние температуры и pH среды на динамику синтеза и секреции бактериоцина штамма *E. faecium* J1-48. Наиболее высокая активность бактериоцина и плотность бактериальных клеток в среде штамма *E. faecium* J1-48 были обнаружены при +37<sup>0</sup>С 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 штамма *E. faecium* J1-48.

**Ключевые слова:** *E. faecium* J1-48, бактериоцин, температура и pH, продуктивность.

### 1. Введение

Бактериоцины молочнокислых бактерий обладают широким спектром антимикробной активности и подавляют рост ряда патогенных грамотрицательных и грамположительных бактерий. Они имеют большое прикладное значение в виду их возможного применения в качестве натуральных пищевых консервантов и антимикробных лекарственных препаратов [2,6,17]. Будучи молекулами пептидной природы, проходя через желудочно-кишечный тракт, под действием протеолитических ферментов они легко расщепляются на пептиды и свободные аминокислоты. В связи с этим, а также в виду отсутствия антигенных и токсических свойств, возможность вытеснения бактериоцинами вредных химических консервантов в пищевой промышленности выглядит довольно перспективной [1].

Однако бактериоцины, как правило, секретируются в среду в мизерном количестве и этот процесс зависит от многих факторов, таких, как углеродного и азотного источников питания [2, 3, 5, 10, 15], pH и температуры культивирования и т.д. [4,6- 8,12].

*E. faecium* штамм J1-48 обладает строгой антимикробной активностью против 12 грамположительных штаммов (в том числе 5 штаммов рода *Listeria*), а так же *S. cerevisiae* DSH213.83 и *F.g raminearium* CBS 1385 [8,9].

В данной работе было исследовано влияние температуры и pH среды на динамику синтеза и секреции бактериоцина штамма *E. faecium* J1-48.

## 2. Материалы и методы исследования

*E. faecium* штамм J1-48 был изолирован нами из образца традиционного сыра из Верхне - Карабахского региона Азербайджана. Образец сыра был изготовлен из цельного молока коровы при домашних условиях и был готов к употреблению.

Чистую культуру штамма хранили в виде сток культуры при температуре -80°C в MRS-среде, содержащей 30% (по объему) глицерина.

Антимикробную активность *E. faecium* J1-48 определяли методом диффузии в агар [16]. В качестве тест-культуры использовали *L. bulgaricus* 340. Произвольную единицу (ПЕ•мл<sup>-1</sup>) вычисляли по следующей формуле: ПЕ/мл = 2<sup>n</sup> × 1.000 μl/10μl, где, n – степень разбавления культуральной жидкости, проявляющая зону ингибирования индикаторного штамма более чем, на 2 мм [13].

Кинетику роста и продуцирования бактериоцина определяли в M17L среде при 30 °С и 37 °С. В среду инокулировали (2% по объему) свежую культуру исследуемого штамма и инкубировали при нерегулируемых условиях рН. Каждый час измеряли накопление биомассы (измеряли оптическую плотность при 600 nm), рН, а также определяли титр антимикробной активности.

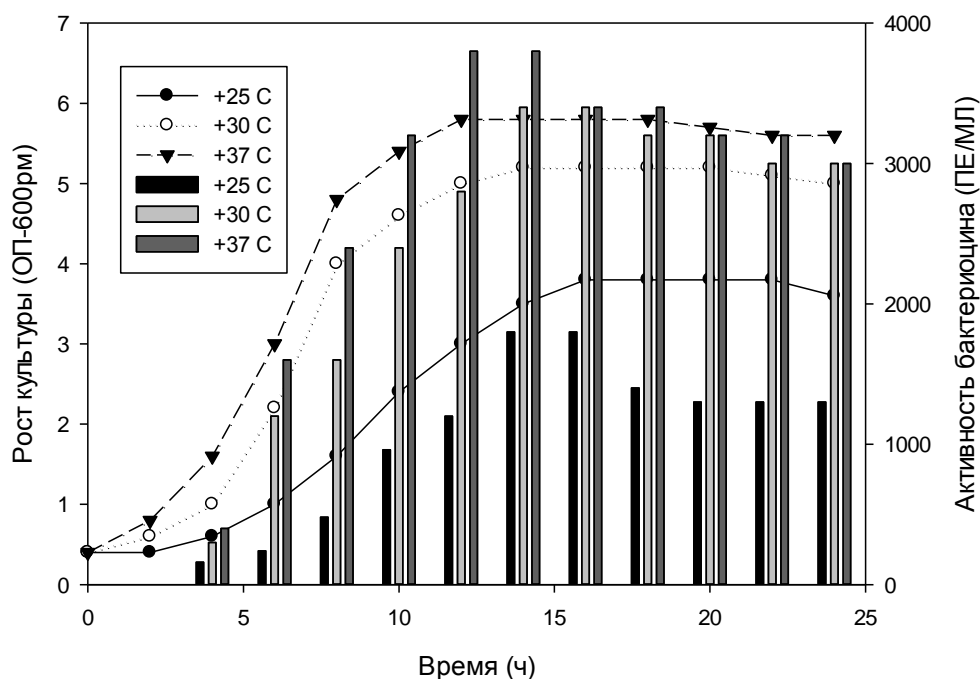
Для изучения влияния различных температур на бактериальный рост и синтез бактериоцина штамма продуцента, культивирование проводили при различных температурных условиях (25, 30, 37 °С) в M17L среде (рН 6,5) в течение 24 ч. Активность бактериоцина (ПЕ/мл) и рост культуры (ОП-600нм) измеряли как описано выше [3].

С целью изучения влияния рН питательной среды культивирования на синтез и секрецию бактериоцина, использовали 200 ml M17L среду со стартовым значением рН 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 и 7,0, которые были доведены с помощью 6 М HCl или 6 М NaOH. Далее питательные среды автоклавировали и в каждую колбу вносили свежую ночную культуру штамма продуцента в концентрации 1,0%. Культивирование проводили 24 ч при температуре 37 °С. Активность бактериоцина (ПЕ/мл) и рост культуры (ОП-600нм) измеряли как описано выше [15].

## 3. Результаты и их обсуждение

В этой части наших исследований мы изучали зависимость процессов роста, синтеза и секреции бактериоцина штамма *E. faecium* J1-48 от двух факторов среды культивирования - температура и рН. Культивирование проводили в M17L среде с рН 6,5. На рис. 1 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°C. При этом максимальная оптическая плотность культуры наблюдалась спустя 12 ч культивирования, которая совпала с началом фазы стабилизации роста и составляла 5,8

единиц. Понижение температуры среды значительно ослабло рост культуры. Например, при  $+30^{\circ}\text{C}$  максимальный рост культуры был достигнут на 14 ч и составил 5,1 единицы, а при  $+25^{\circ}\text{C}$  аналогичный показатель, обнаруженный на 16 часу культивирования, составлял 3,6 единицы.

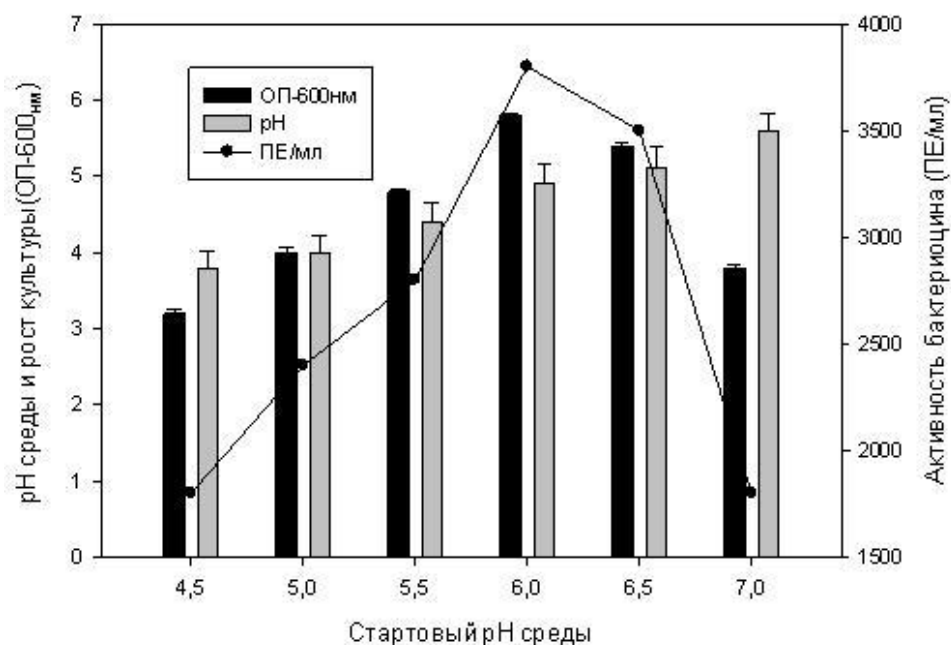


**Рис. 1.** Влияние температуры культивирования на динамику роста и секрецию бактериоцина штамма *E. faecium* J1-48 (стартовый pH среды 6.5)

Судя по полученным данным, наивысшая бактериоциновая активность была обнаружена также при  $+37^{\circ}\text{C}$ . При низких температурных условиях культивирования интенсивность синтеза бактериоцина замедлялась. Так, максимальный бактериоциновый титр в культуре при  $+37^{\circ}\text{C}$  составлял 3800 ПЕ/мл, при  $+30^{\circ}\text{C}$  – 3400 ПЕ/мл, а при  $+25^{\circ}\text{C}$  он приравнивался к 1800 ПЕ/мл, что более чем в 2 раза ниже активности обнаруженной при  $+37^{\circ}\text{C}$ . По этому, в дальнейших экспериментах культивирование проводили при  $+37^{\circ}\text{C}$ .

Результаты опытов по изучению зависимости роста и бактериоциновой активности штамма *E. faecium* J1-48 в M17L среде при  $+37^{\circ}\text{C}$  от изначального значения pH среды суммированы на рис. 2. 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

единиц, а при pH 7.0 – 3, 4 единиц. В обоих значения pH бактериоциновая активность приравнялась к 1800 ПЕ/мл, что на 53% ниже максимального значения, обнаруженного при pH 6.0.



**Рис. 2.** Влияние изначального значения pH среды на динамику роста и секрецию бактериоцина штамма *E. faecium* S5 (температура культивирования - +37<sup>0</sup>С)

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 [10, 12, 13, 15]. Так, например, интенсивность роста штамма *L. acidophilus* AA11 при различных температурных условиях (при +25<sup>0</sup>С, +30<sup>0</sup>С и +37<sup>0</sup>С) особенно не отличалась друг от друга. Однако наибольшая активность бактериоцина среди этих культур была обнаружена при +30<sup>0</sup>С [3]. Максимальное количество биомассы штамма *L. lactis* subsp. *lactis* A164 было обнаружено при +37<sup>0</sup>С. Но, максимальный бактериоциновый титр в культуре сформировался при +30<sup>0</sup>С [5]. Оптимальной температурой роста *E. faecium* M13 было 36<sup>0</sup>С, хотя максимальная энтероциновая активность обнаружена при 32<sup>0</sup>С [2]. Различие между этими значениями было обнаружено также у другого штамма *L. lactis*, изолированного из морской среды [13]. В отличие от этих результатов, в наших экспериментах оптимальная температура роста штамма *E. faecium* J1-48 совпала с той для синтеза бактериоцина (+37<sup>0</sup>С). Такое совпадение было обнаружено и в трудах ряда исследователей. Так, Ramachandran et al. (2012) изучали влияние температуры на рост и синтез бактериоцина бактерии *Lactococcus lactis*, изолированной из образцов йогурта и установили, что оптимальной

температурой для этих двух показателей является +30<sup>0</sup>С [14]. Аналогичные показатели были получены также для штамма *L. brevis* OG1 [11].

Такая же картина вырисовывалась при анализе оптимальных значений стартового рН среды для роста и синтеза бактериоцина различными штаммами продуцентами: оно может быть одинаковым для обеих показателей, или же может отличаться друг от друга. Так, оптимальное значение стартового рН для роста и секреции бактериоцинов для таких штаммов, как *L. acidophilus* AA11 [3], *L. plantarum* ST23LD [18], *L. plantarum* ST13BR [16], *L. plantarum* bacST202Ch [17], *Lactococcus lactis* [11] и *L. brevis* OG1 [11], так же как у штамма *E. faecium* S5, было одинаково. 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, наиболее высокая активность бактериоцина и плотность бактериальных клеток в среде штамма *E. faecium* J1-48 были обнаружены при +37<sup>0</sup>С и при стартовом значении рН 6.0. Полученные результаты наводят на мысль о том, что температура культивирования и стартовое значение рН среды играют существенную роль в процессах роста и секреции бактериоцина штамма *E. faecium* J1-48.

### Литература

1. Гюльяхмедов С.Г., Прикладные перспективы бактериоциногенных молочнокислых бактерий (Обзорная статья), Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана, т. IX, № 2, 2011, с.106-117.
2. Гюльяхмедов С.Г., Абдуллаева Н.А., Оптимизация продуцирования энтероцина штамма *Enterococcus faecium* M13, изолированного из азербайджанского сыра, Журнал Кафказского Университета, Серия Химия и Биология, т.2, № 1, 2014, с.35-39.
3. Abo-Amer A.E. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* AA11, a strain isolated from Egyptian cheese, Annals of Microbiology, Vol.61, 2011, pp.445–452.
4. Biswas S., Ray P., Johnson M., et al. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H, Appl. Envir. Microbiol, Vol.57, 1991, pp.1265–1267.
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, Vol.95, 2002, pp.225-235.
6. Delgado A, Brito D, Peres C, et al., Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration, Food Microbiol., Vol.22, 2005, pp.521–528.
7. Gulahmadov S., Batdorj B., Dalgalarondo M., et al. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from lactic acid bacteria isolated from traditional Azerbaijani dairy products, European Food Rec. Tech., Vol.224, 2006, pp.229-235.

8. Gulahmadov S., Kuliev A., Abdullaeva N. et al., Antilisteria activities of lactic acid bacteria isolated from three types of Azerbaijani cheeses, Second International Symposium on Antimicrobial Peptides.: Food veterinary medical and novel applications, France, Saint-Malo, (in Book of Abstracts, edited by D. Drider and H. Prevost) 2009, p.107, poster 01-NSP
9. Gulahmadov S., Abdullaeva N., Guseynova N. et al., Isolation and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from Azerbaijani cheeses, Appl. Biochem. Microbiol., Vol.45, No.3, 2009, pp.297-303.
10. Mataragas M., Drosinos E, Tsakalidou E., Metaxopoulos J., Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, Antonie van Leeuwenhoek., Vol.85, 2004, pp.191–198.
11. Ogunbanwo S., Sanni A., Onilude A., Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1, Afr.J. Biotechnol., Vol.2, No.7, 2003, pp.179-184.
12. Parente E., Ricciardi A., Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria, Appl Microbiol Biotechnol., Vol.52, 1999, pp.628–638.
13. 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., Vol.2, 2010, pp.138-144.
14. Ramachandran B., Srivathsan J., Sivakami V., et al., Production and optimization of bacteriocin from *Lactococcus lactis*, J. Acad. Indus. Res., Vol.1, No.16, 2012, pp.306-309.
15. Sharma, S., Garg A., Singh G., Optimization of fermentation conditions for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* CCSULAC1 on modified MRS medium, Int. J. Dairy Sci., Vol.5, 2010, pp.1-9.
16. Todorov S., Dicks L., Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine, Microbiol. Res., Vol.161, 2006, pp.102-108.
17. Todorov S., Furtado D., Saad S., et al., Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon, J. Appl. Microbiol., Vol.110, 2011, pp.971–986.
18. Todorov S., Gotcheva B., Dousset X., et al., Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* ST31, Biotechnol. Eq., Vol.14, 2000, pp.50–55.

## **INFLUENCE OF TEMPERATURE AND PH ON BACTERIOCIN PRODUCTION IN ENTEROCOCCUS FAECIUM J1-48**

**S.G. Gulahmadov, A.A. Kuliev**

The effect of temperature and pH on the dynamics of the synthesis and secretion of bacteriocins in *E. faecium J1-48* strain was studied. The highest activity of bacteriocins and bacterial cells density in the strain of *E. faecium J1-48* medium were detected at + 37<sup>0</sup>C and at a starting pH of 6.0. The results suggest that the temperature of the culture and the starting pH of the medium play an important role in the growth and secretion of bacteriocins of *E. faecium J1-48*.

**Keywords:** *E. faecium J1-48*, bacteriocin, temperature and pH, productivity.