

УДК 581.19:577.158

Абдуллаева Н.Ф., Гюльахмедов С.Г., Кулиев А.А.
Бакинский государственный университет (Азербайджан)

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ pH-СРЕДЫ НА СИНТЕЗ БАКТЕРИОЦИНО-
ПОДОБНОГО ИНГИБИРУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА И ДИНАМИКУ
РОСТА ШТАММА *LB. PARACASEI* SPP. *PARACASEI* BN ATS 5W**

N. Abdullayeva, S. Gulahmadov, A. Kuliyeu
Baku State University, Azerbaijan

**STUDY OF INFLUENCE OF THE pH MEDIUM ON SYNTHESIS
OF BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY SUBSTANCES AND GROWTH
DYNAMICS OF STRAIN *LB. PARACASEI* SPP. *PARACASEI* BN ATS 5W**

Аннотация. Цель данной работы состояла в изучении влияния различных значений pH-среды (pH 4,5; 5,5; 6,5) на синтез бактериоциноподобного ингибирующего вещества (БПИВ) и динамику роста штамма-продуцента *Lb. paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5w. Исследуемый штамм был изолирован из традиционного сыра «Апшерон», произведённого в Азербайджане. Наиболее оптимальным значением pH для роста и накопления антибактериального агента в культуральной жидкости явилось значение pH 5.5. При pH 4.5 обнаружена задержка роста клеток изученного штамма. Слабокислое значение pH (pH 6.5) приводило к снижению антимикробной активности.

Ключевые слова: бактериоцины, лактобациллы, молочнокислые бактерии, бактериальные пептиды, ферментированные продукты.

Abstract. The aim of this work was to study the effect of different pH values (pH 4.5, 5.5, 6.5) on the synthesis of bacteriocin-like inhibitory substances (BLISs) and growth dynamics of the producer strain *Lb. paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5W. The test strain was isolated from the traditional cheese “Absheron,” produced in Azerbaijan. As a result, it was found that the optimal pH for the growth and accumulation of an antimicrobial agent in the culture medium is pH 5.5. Under low pH values (pH 4.5) the growth of studied strain cells became slow. Weakly acidic pH values (pH 6.5) led to a decrease in the antimicrobial activity.

Key words: bacteriocins, lactobacillus, lactic acid bacteria, bacterial peptide, fermented food.

Бактериоцины и бактериоциноподобные ингибирующие вещества (БПИВ) являются антибактериальными и в основном комплексными субстанциями белковой природы. Они различаются по спектру активности, способу действия, генетическому контролю, биохимическим свойствам [3, 8]. Для стран с развитой пищевой промышленностью наиболее актуальным является вопрос поиска безвредных и эффективных препаратов, увеличивающих сроки хранения продуктов питания, вместо традиционных химических консервантов.

Влияния pH-среды на рост и секрецию бактериоцина представляет немаловажный интерес. Известно, что молочнокислые бактерии (МКБ) в качестве конечного продукта катаболизма углеводов выделяют в среду обитания большое количество молочной кислоты, что приводит к её подкислению. Как известно, кислая среда угнетает рост и развитие большинства микроорганизмов, и патогенные не составляют в этом исключения [7]. Сильное подкисление среды обитания подавляет рост и развития самих МКБ и контролирует численность их популяций в ферментированных продуктах [1, 2]. Кислотность среды значи-

тельно влияет на антимикробную активность МКБ, связанную с высвобождением в среду бактериоцинов. По мнению исследователей, активность бактериоцинов во многом определяется степенью их адсорбции на поверхность клеток тест-культур [5].

С этой целью нам и представился большой интерес заняться изучением данной группы соединений, вследствие возможного их применения в качестве натуральных пищевых консервантов, а также для получения новых антимикробных лекарственных препаратов [5, 7, 9]. Штамм *Lb. paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5w впервые изолирован нами из традиционного местного сыра «Апшерон» совместно с коллегами из лаборатории VIA-FIPL (Национальный институт агрономических исследований, Нант, Франция) [1,2,6].

Методы исследований

Антимикробную активность выявляли методом луночной диффузии в агар [4]. Для этого в мягкой агаровой (0,8%) среде, засеянной клетками тест-культуры (*Lb. bulgaricus* 340), прорезались лунки диаметром 10мм и в каждую из них вносили по 200 мкл культуральной жидкости потенциального продуцента. Инкубацию производили в течение ночи при оптимальной температуре роста тест-культуры (37°C). В качестве контроля использовали жидкую МРС-среду. Антибактериальную активность культуральной жидкости оценивали посредством анализа критического разбавления. Активность БПИВ определяли как величину, обратную наивысшему разбавлению культуральной жидкости, проявляющую зону ингибирования индикаторных штаммов более чем на 2 мм и выражали в произвольных единицах, делённых на 1 мл культуральной жидкости (ПЕ•мл⁻¹). Индивидуальную активность каждой клетки-продуцента вычисляли, разделив значение общей антимикробной активности на количество колоний образующих единиц (КОЕ), обнаруженных в 1 мл культуральной суспензии в определённых интервалах времени [4]. Для определения влияния pH на антимикробную активность

культуральную жидкость активного штамма доводили до нужных значений pH (3–12). Соответствующие значения pH поддерживали при помощи 5M NaCl. С этой целью использовали значения pH в пределах от 4.5 до 6.5.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 отражена динамика роста и синтеза БПИВ штамма *Lb. paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5w, при значении pH 4.5 (культура 1). Полученные результаты показали, что кислая среда тормозила рост изученного штамма и, соответственно, наступление его экспоненциальной фазы роста. Так, если экспоненциальная фаза штамма-продуцента при спонтанном культивировании (при неконтролируемых условиях pH) наступала уже в третьем часу и завершилась на восьмом, то при контролируемых условиях pH, при её значении 4,5, начало этой фазы наблюдалось, только на седьмом часу культивирования и длилось целые 16 часов (рис. 1). Однако изучение кривой динамики изменения активности отдельных клеток штамма показало, что этот показатель опережает наступление экспоненциальной фазы роста. Так, максимальная активность клеток обнаруживалась на десятом часу культивирования. В это время динамика

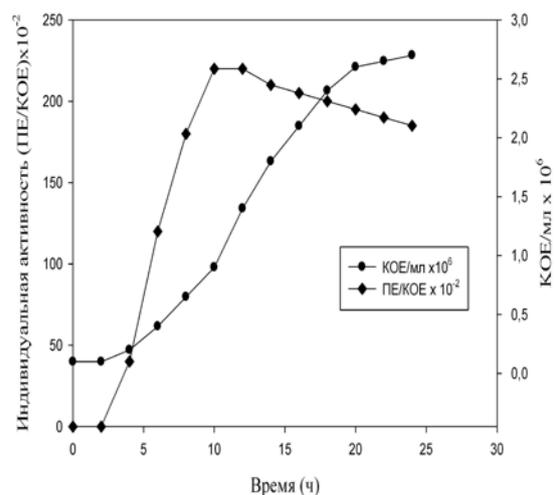


Рис. 1. Динамика роста (●) и синтеза БПИВ (■) штамма *Lb. paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5w (тест-культура *Lb. bulgaricus* 340, pH 4.5)

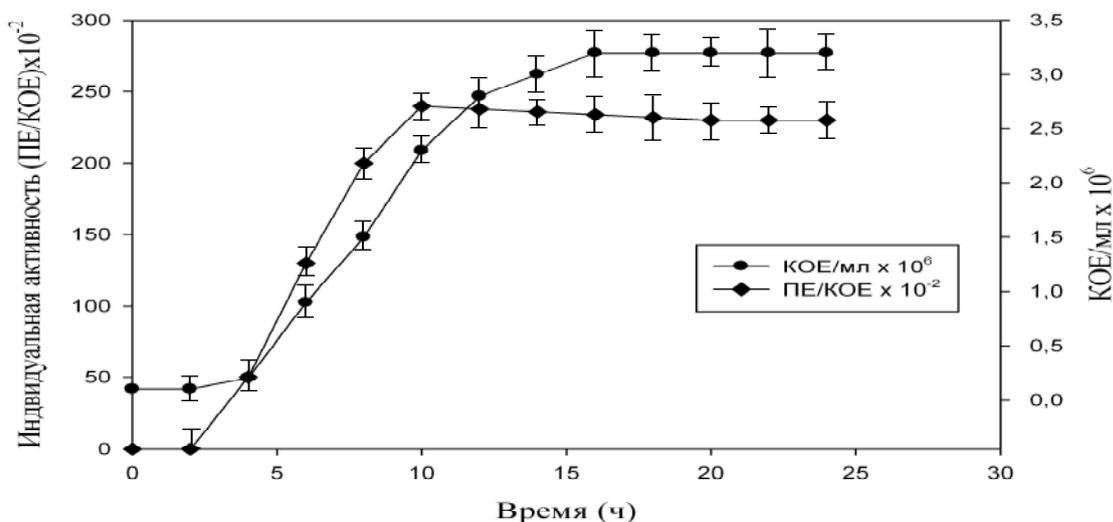


Рис. 2. Динамика роста (●) и синтеза БПИВ (■) штамма *Lb.paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5w (тест-культура *Lb.bulgaricus* 340, pH 5.5)

ка роста данной культуры соответствовала половине экспоненциальной фазы, а активность клеток была равна 2,2. Далее наблюдалось постепенное уменьшение индивидуальной активности клеток, и в конце опытов она составила 1,8 единиц.

Это свидетельствует о том, что если изученное значение pH 4,5 неблагоприятно для роста самой культуры, то на накопление бактериоцина в среде данное значение оказывает положительное влияние. Такое предположение подтверждается при рассмотрении рис. 2 и 3. На рисунках отражены результаты аналогичных исследований, проведенных при значениях pH 5,5 (культура 2) и 6,5 (культура 3), соответственно. Сравнительное изучение графически выраженных данных показывает, что значение pH-среды, близкое к нейтральному особенно не отражается на динамике роста исследуемого штамма. Экспоненциальная фаза роста обеих культур начиналась спустя 4 ч. с момента начала культивирования и переходила на фазу стабилизации через 11 ч. (рис. 2). В это время количество КОЕ на каждом мл обеих суспензий достигало до $3,2 \times 10^6$. Что касается динамики изменения индивидуальной активности клеток, тут наблюдались следующие результаты. Динамика увеличения активности клеток по времени с незначительными опережениями совпало

с динамикой накопления биомассы у обеих культур. Максимальная активность отдельных клеток наблюдалась ближе к концу экспоненциальной фазы роста и достигала 2,4 и 2,0 в суспензиях, культивируемых при pH 5,5 и 6,5, соответственно. При этом антимикробная активность клеток второй культуры до конца опыта существенно не менялась.

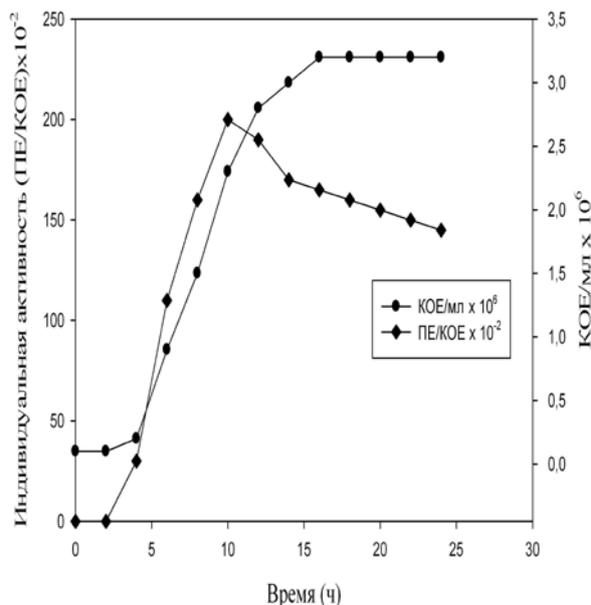


Рис. 3. Динамика роста (●) и синтеза БПИВ (■) штамма *Lb.paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5w (тест-культура *Lb.bulgaricus* 340, pH 6.5)

В третьей культуре в то же время аналогичная активность снизилась на 30% и уменьшалась до значения 1,4. Наблюдаемые результаты свидетельствуют о том, что нейтральные значения pH приводят к уменьшению выхода бактериоцина в культуральную жидкость (рис. 3).

Таким образом, исходя из выше изложенного, было установлено, что оптимальным значением pH-среды для роста и накопления антибактериального агента в культуральной жидкости является значение pH 5,5. Низкое значение pH (pH 4,5) задерживало рост клеток изученного штамма, в то время как значения, близкие к нейтральным (pH 6,5), несмотря на интенсивный рост штамма-продуцента, способствовали снижению антимикробной активности.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гюльяхмедов С.Г. Антибактериальная активность молочнокислых бактерий, выделенных их традиционных молочных продуктов Апшеронского полуострова Азербайджана // Вестник Бакинского университета. Серия естественных наук. 2005. № 1. С. 59-65.
2. Гюльяхмедов С.Г. Антимикробная активность штамма *Enterococcus faecium* AZES2-48, изолированного из сыра МОТАЛ // Труды Института Ботаники НАН Азербайджана. Баку: Элм, 2008. Т. IV. С. 167-174.
3. Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г. Бактериоциногенез. Л.: Медицина, 1966. 244 с.
4. Abee T., Krockel L., Hill C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning // J. Food Microbiology. 1995. V. 28. P. 169-185.
5. Daeshel M. Amplications and interactions of bacteriocins from LAB in food and beverages // J. Applied and Enviromental Microbiology, 1993. P. 63-91.
6. Gulahmadov, S., Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Chobert, J-M., Kuliev, 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.
7. Hove H., Norgaard H., and Brobech M. Review: Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract // European J. of Clinical Nutrition, 1999. V. 53. № 5. P. 339-350.
8. 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.
9. Soomro A., Masud T. Role of lactic acid bacteria in food preservation and human health // Pakistan Journal of Nutrition. 2002. V. 1. № 1. P. 20-24.