

УДК 579.22

Гюльяхмедов С.Г., Гусейнова Н.Ф., Абдуллаева Н.А., Кулиев А.А.
Бакинский государственный университет

**ВЛИЯНИЕ ХЛОРИСТОГО НАТРИЯ, ПАРА-ГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ
КИСЛОТЫ И ПРОПИЛ-ПАРАБЕНА НА СПЕКТР АНТИМИКРОБНОЙ
АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОЦИНОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ,
ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ АЗЕРБАЙДЖАНСКИХ СЫРОВ***

S. Gulamedov, N. Huseynova, N. Abdullaeva, A. Kuliev
Baku State University

**EFFECT OF NaCl, PARA-HYDROXYBENZOIC ACID AND PROPYL-PARABENE
ON THE ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF BACTERIOCINS OF LACTIC ACID
BACTERIA, ISOLATED FROM AZERBAIJANI CHEESES**

Аннотация. Изучено влияние поваренной соли, пара - гидроксibenзойной кислоты и пропил-парабена на спектр антимикробной активности бактериоцинов, выделенных из штаммов *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w, *Enterococcus faecium* A5 и *Lactobacillus rhamnosus* FAZ 16m. В качестве пассивной культуры были использованы *Listeria innocua* CIP80.11, *Escherichia coli* ATCC23355, *Enterococcus faecalis* ATCC 1.144. При исследуемых концентрациях все изученные факторы оказывали синергетический эффект с бактериоцинами. Изученные факторы используются для предохранения от порчи большинства ферментированных продуктов. Полученные результаты имеют большое прикладное значение.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, антимикробной активности, бактериоцины, синергетический эффект

Abstract. The effect of NaCl, para-hydroxybenzoic acid and propyl-parabene on the antimicrobial activities of paracaseicine 8w, enterocine S5 and rhamnosicine 16m was studied. *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Listeria innocua* CIP80.11, *Escherichia coli* ATCC23355, *Enterococcus faecalis* ATCC 1.144 were used as target organisms. It was determined that all of studied factors were synergistic of the bacteriocins. These factors are compounds of a lot of fermented products. Therefore the results obtained have an applied potential.

Key words: lactic acid bacteria, antimicrobial activities, bacteriocin, synergistic

Молочнокислые бактерии (МКБ) продуцируют ряд биологически-активных веществ с антимикробными свойствами. Антагонизм МКБ в ферментированных продуктах ассоциируется с их метаболитами, такими, как молочная и уксусная кислоты, перекись водорода или бактериоцины, представляющие себя молекулами пептидной природы [2–4].

Секреция бактериоцинов внутри ферментированного продукта штаммами – продуцентами зависит от многих физико-химических и экологических факторов. Эти факторы по-разному влияют на антибактериальную активность бактериоцинов. Однако информации о взаимодействии бактериоцинов с хлористым натрием, пара-гидроксibenзойной кислотой и пропил-парабеном ограничены и касаются только активности низина против клеток нескольких патогенных культур, в том числе против *Salmonella heidelberg* и *L. monocytogenes* [8-11].

Целью настоящих исследований явилось изучение влияния хлористого натрия, пара-гидроксibenзойной кислоты и пропил-парабена на спектр антимикробной активности бакте-

* © Гюльяхмедов С.Г., Гусейнова Н.Ф., Абдуллаева Н.А., Кулиев А.А.

риоцинов молочнокислых бактерий, изолированных нами из азербайджанских сыров [1, 7, 13].

Материалы и методы

В качестве пассивной культуры были использованы клетки штаммов *L. innocua* CIP80.11, *E. coli* ATCC23355 и *E. faecalis* ATCC 1.144. Изолированные нами штаммы *L. paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w, *E. faecium* A5 и *L. rhamnosus* FAZ 16m использовали как продуценты параказеина 8w, энтероцина A5 и рамнозицина 16m, соответственно. Все организмы МКБ культивировали в модифицированной МРС (мМРС) среде [6]. Один литр среды содержал: 10 г – триптона, 5 г – дрожжевого экстракта, 2 г K_2HPO_4 , 2 г диаммоний-цитрата, 1 г Твина 80, 0.1 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 г $MnSO_4 \cdot xH_2O$, 20 г глюкозы (все реактивы фирмы Merck, Darmstadt, Germany). После стерилизации среды значение pH в ней было 6,4-6,5. МКБ выращивали в анаэробных условиях при 30° С, все остальные штаммы – на качалке без остановки (200 об/мин) при 37° С.

Активность бактериоцинов определяли путем реципрокного разбавления растворов бактериоцинов до проявления минимальной антимикробной активности (2 мм), обнаруженной методом диффузии и выражали как ПЕ/мл.

Пара-гидроксibenзойная кислоту (пГБК), хлористый натрий и пропил-парабен (ППб) (Sigma, Deisenhofen, Germany) растворяли в мМРС-среде и раствор стерилизовали путем фильтрации. Влияние каждого компонента среды на активность бактериоцинов определяли отдельно при стандартных условиях. Влияние самих компонентов на рост пассивных культур определяли таким же путем без добавления бактериоцина.

Результаты и обсуждение

Составные компоненты ферментированных пищевых и кормовых продуктов разными путями влияют на микроорганизмы, населяющие эти продукты. При этом они могут взаимодействовать с клеточной мембраной микробов или же с их метаболитами [5, 9, 10]. Антимикробная активность бактериоцина является результатом гидрофобных и электростатических взаимодействий этих амфифильных, положительно заряженных пептидов обычно с клеточной мембраной пассивной культуры. Метильные, этильные и пропиловые эфиры пГБК как правило, используются для сохранения качества пищевых продуктов. Их антимикробная активность увеличивается по мере удлинения спиртового остатка и параллельно с этим уменьшается их растворимость в воде. В свете вышеизложенного мы изучили влияние пГБК на активность бактериоцинов против клеток пассивных культур, список которых приводится в методической части. Результаты этих экспериментов суммированы на рис.1. Из графиков следует, что присутствие в среде пГБК приводит к увеличению активности изученных бактериоцинов. При этом степень повышения активности бактериоцинов зависит как от разновидности самих бактериоцинов, так и от пассивных культур. Самая высокая активность у обоих бактериоцинов в присутствии пГБК наблюдалась против клеток *E. coli*. Активность параказеина увеличилась в 6 раз, а энтероцина – в 7 раз. Наименее активны были бактериоцины против клеток *E. faecalis*. В этом случае резистентность этих клеток к бактериоцинам в присутствии пГБК была два раза больше по сравнению с клетками *E. coli*.

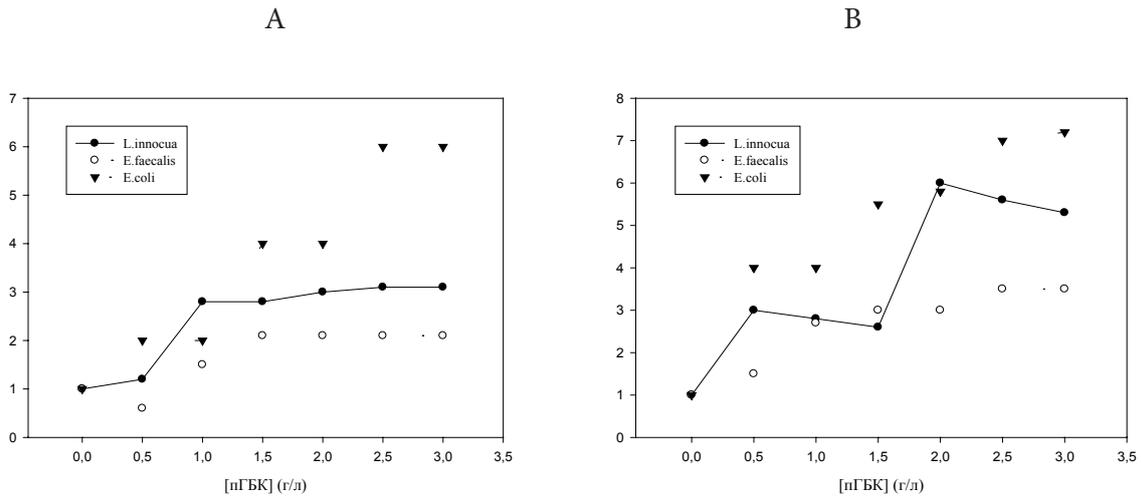


Рис. 1. Влияние парагидроксibenзойной кислоты на антимикробную активность (А) парацетицина 8w и (Б) энтероцина А5 против клеток пассивных культур

По литературным данным, синергетический эффект пГБК наблюдается практически со всеми изученными бактериоцинами. Эта кислота может повышать активность различных бактериоцинов от 2 до 10 раз [3, 6, 8, 12].

В следующей серии экспериментов мы изучили влияние пропил-парабена на антимикробную активность исследуемых бактериоцинов. Результаты этих опытов представлены в таблице. Из этой таблицы следует, что

присутствие в очень низких концентрациях ППб в среде еще сильнее (максимум в 36 раз) стимулирует активность бактериоцинов. Стимулирующий эффект ППб увеличивался по мере повышения его концентрации. Этот показатель также сильно варьировал в зависимости от структуры клеточной стенки пассивных культур, а также от разновидности самих бактериоцинов.

Таблица 1

Влияние пропил-парабена на антимикробную активность парацетицина 8w, энтероцина А5 и рамнозицина 16m

[ППб] (г/л)	Относительная активность бактериоцинов против:					
	<i>E. faecalis</i> ATCC 1.144			<i>E. coli</i> ATCC 23355		
	0	0.06	0.12	0	0.06	0.12
Бактериоцины						
энтероцина А5	1*	4	11	1	14	36
парацетицина 8w	1*	2	6	1	8	20
рамнозицина 16m	1*	5	8	1	10	25

* Относительная активность (Активность бактериоцинов в стандартных условиях равна 1, рН 6,5)

Так, наибольшая степень увеличения антимикробной активности наблюдался у энтероцина А5 против грамотрицательных клеток *E. coli* ATCC 23355. При концентрации ППб 0,12 г/л эта активность повысилась в 36 раз. В аналогичных условиях кратность увеличения ак-

тивности для параказеина 8w и рамнозицина 16m, соответственно равнялись к 20-и 25-и. Чувствительность ко всем изученным бактериоцинам грамположительных клеток в присутствии той же концентрации ППБ была ниже более чем в 3 раза.

Таким образом, это соединение еще сильнее стимулирует активность изученных бактериоцинов. По литературным данным, его очень низкая концентрация может усилить активность бактериоцинов до 100 раз. Парабены в концентрации 0,1% обычно исполь-

зуются в качестве консервантов пищевых продуктов. Эти соединения усиливают процесс торможения роста грамотрицательных бактерий бактериоцинами. Кроме такого синергетического комплекса бактериоцинов и парабенов, более эффективно борющегося с бактериями, были показаны другие комбинации бактериоцина – низина с сорбатом, низким значением pH или хлористым натрием, которые угнетают рост и развитие более устойчивых к самим бактериоцинам бактерий [5, 12].

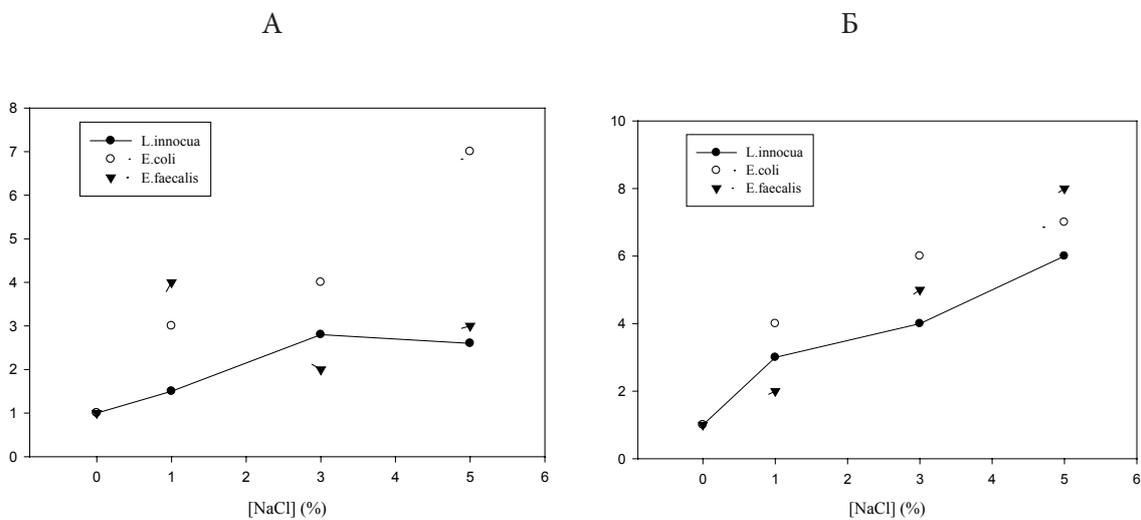


Рис. 2. Влияние NaCl на антимикробную активность энтероцина (А) А5 и (Б) рамнозицина 16 м

Ферментированные пищевые продукты предохраняются от порчи патогенными и другими бактериями обычно комбинированным действием кислой среды с добавлением соли. Более того, добавление соли может усилить защитный эффект бактериоцина, продуцируемого стартерным бактериоциногенным штаммом, или же самих защитных штаммов. Мы изучили влияние концентрации поваренной соли (0-5%) на активность энтероцина А5 и рамнозицина 16 м.

Из рис. 2 видно, что синергизм высокой концентрации (5%) соли с энтероцином в проявлении антимикробной активности более силен в отношении клеток *E. coli*, чем к любому другому штамму. Так, если при такой концентрации хлористого натрия, антимикробная активность данного бактериоцина

против этих клеток повысилась в 7 раз то против других клеток пассивных культур всего 2,5-3 раза. Однако в более низких концентрациях чувствительность клеток к энтероцину проявилась сильнее других пассивных клеток. Синергизм хлористого натрия с рамнозицином носил более равномерный характер. По мере повышения концентрации соли увеличивалась и активность бактериоцина против всех изученных клеток пассивных культур. Так, при концентрации соли 1% активность увеличивалась в среднем в 2,4 раза, при 3% – в 4,5 раз, а при 5% – в 7 раз.

Таким образом, полученные в наших исследованиях результаты способствуют расширению научных данных, которые основывались на взаимодействии низина с грамположительными бактериями, и углуб-

ляют наши познания о механизме влияния бактериоцинов на пассивные культуры в целом.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гюльяхмедов С.Г., Абдуллаева Н.Ф., Гусейнова Н.Ф., Кулиев А.А. и др. Выделение и характеристика бактериоциноподобных ингибирующих веществ молочнокислых бактерий, изолированных из Азербайджанских сыров // Прикладная биохимия и микробиология, 2009. Т. 45. № 3. С. 297-303.
2. Abee T., Krockel L., Hill C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning // Int. J. Food Microbiol. 1995. V. 28. P. 169-185.
3. Blackburn P., Polak J., Gusik S., Rubino S.D. Int. Patent Appl., 1989, No. PCT/US89/02625.
4. 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.
5. Buncic S., Fitzgerald C.M., Bell R.G., Hudson J.A. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperature // J. Food Safety. 1995. V.15. P. 247-264.
6. de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. 1960. V. 23. P. 130-135.
7. 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 // Eur. Food Rec. Technol. 2006. V. 224. P.338-345.
8. Ganzlel M.G., Weber S., Hammes W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. // Int. J. Food Microbiol. 1999. V. 46. P. 207-217.
9. Henning S., Metz R., Hammes W.P. New aspects for the application of nisin to food products based on its mode of action // Int. J. Food Microbiol. 1986. V. 3. P. 135-141.
10. Hugas M., Neumeier B., Pages F., Garriga M., Hammes W.P. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing cultures in meat products. // Fleischwirtschaft. 1996. V. 76. P. 649-652.
11. Jung D.-S., Bodyfelt F.W., Daeschel M.A. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk // J. Dairy Sci. 1992. V.75. P.387-393.
12. Mazzotta A.S., Montville T.J. Nisin induces changes in fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 108C and 308C // J. Appl. Microbiol. 1997. V. 82. P. 32-38.
13. Terzic-Vidojevic A., Gulahmadov S.G., Vukasinovic M., Tolinacki M. et al. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria from homemade Azerbaijani dairy products // African J. Biotechnol. 2009. V. 8(11). P. 2576-2588.