

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ**

На правах рукописи

САИБ ГУРБАН ОГЛЫ ГЮЛЬАХМЕДОВ

**МЕТАБОЛИТЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ
АЗЕРБАЙДЖАНА С АНТИМИКРОБНЫМИ
СВОЙСТВАМИ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

2422.01- «Биотехнология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора наук по биологии

Б А К У – 2 0 1 6

Диссертационная работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии Бакинского Государственного Университета.

Научный консультант: **Зас.дей.науки, доктор наук по биологии, проф., А.А. Кулиев**

Официальные оппоненты:

доктор наук по биологии, проф.	Х.Г.Ганбаров
доктор биологических наук, проф.	М.А.Егоров
доктор наук по биологии, проф.	А.А.Набиев

Ведущая организация: **Кафедра биохимии Азербайджанского Медицинского Университета**

Защита состоится 27 сентября 2016 г. в 14-00 часов на заседании Диссертационного Совета Р/Д 01.222 при Институте Микробиологии НАН Азербайджанской Республики по адресу: Az1004, г.Баку, ул. М. Мушфига, 103

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Микробиологии НАН Азербайджанской Республики

Автореферат разослан «___» июля 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Р/Д 01.222,
Д.н.п.б.

Ф.Х.Гахраманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Исследование метаболитов молочнокислых бактерий (МКБ) с антимикробными свойствами необходимо для решения фундаментальной проблемы микробиологии – направленному выяснению механизмов антагонистического взаимодействия бактериальных клеток, с помощью которых угнетают рост и развитие сопутствующих микроорганизмов, и тем самым обеспечивают превосходство перед ними [Savadogo, 2006; Saxelin, 2005].

Обеспечение людей экологически безопасными продуктами питания и защита их натуральными консервантами, которые позволили бы продлить сроки хранения и качество пищевых продуктов и искоренить вредные действия химических консервантов, в настоящее время является одной из актуальных проблем пищевой промышленности. На этом фоне значение и прикладные перспективы МКБ, которые с древних времен вошли в повседневную жизнь человечества, становятся очевидными [Кабисов, 2004].

Антагонистические свойства МКБ позволяют использовать их в производстве большого разнообразия ферментированных пищевых продуктов, а также силоса для вскармливания скотов. Они продуцируют множество различного рода антимикробных субстанций, в том числе бактериоцинов, витаминов, вакцин, ароматических соединений, полисахаридов и различных ферментов. Они, с одной стороны, подавляя рост клеток *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* и других патогенных и гнилостных микроорганизмов [Carminati, 1997; Greenacre, 2006; Gulahmadov, 2006], обеспечивают общую биологическую безопасность выше перечисленных продуктов, а с другой стороны, способствуют формированию у них питательных, органолептических и технологических свойств [Sengun, Karabiyikli, 2011; Settanni, Corsetti, 2008].

МКБ получили широкое применение также в медицине и в фармакологии. Их используют в виде бактериальных препаратов – пробиотиков, которые определяются как жизнеспособные микробные пищевые добавки, положительно воздействующие на организм [Kos, 2008]. Выше перечисленные свойства МКБ превращают их в очень интересные и перспективные биотехнологические объекты и требуют изолирование и изучение все новых и новых штаммов.

Одним из перспективных антибактериальных метаболитов МКБ является бактериоцины, молекулы пептидной природы, синтезируемые на рибосомах. В настоящее время они находятся в центре внимания многих исследователей, вследствие их возможного применения в качестве натуральных (природных) пищевых консервантов, а также для приготовления новых антимикробных лекарственных препаратов [Daly və Davis, 1998; Квасников и Нестеренко, 1975].

В последние годы у научных исследователей нашей страны наблюдается повышенный интерес к изучению микробиологического состава традиционных кисломолочных продуктов, изготовленных в домашних условиях. В этих работах особое внимание уделялось морфокультуральным и физиолого-биохимическим свойствам микроорганизмов (дрожжей и молочнокислых бактерий), изолированных из спонтанных образцов простокваши. Фрагментарно исследована также, антибактериальная активность культуральной жидкости некоторых лактобацилл и стрептококков. При этом не уточнялась биохимическая природа этих субстанций [Гамбаров, 2004, Гамбаров и Джафаров, 2009].

Однако в Азербайджане, несмотря на богатый опыт приготовления кисломолочных и овощных ферментированных продуктов, скрининг этих продуктов по выявлению МКБ, обладающих пробиотическими свойствами и продуцирующих бактериоциноподобные ингибирующие вещества (БПИВ) только начинается [Кулиев и др., 2009; Gulahmadov, 2005; 2006; 2009].

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы явилось проведение широкомасштабного скрининга штаммов МКБ в традиционных кисломолочных продуктах со всех экономических регионов Азербайджана, обладающих бактериоциногенными, пробиотическими и другими полезными с точки зрения биотехнологии свойствами, а также изучение их метаболитов с антимикробными свойствами, особенно бактериоцинов и возможности их практического применения.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Проводить скрининг среди широкого круга кисломолочных продуктов, приобретённых со всех экономических регионов

- страны по поиску штаммов МКБ с полезными биотехнологическими свойствами;
2. С помощью современных методов биохимии и молекулярной биологии идентифицировать изолированные штаммы МКБ;
 3. Изучить антимикробные свойства изолированных штаммов МКБ и определить спектр их антимикробной активности;
 4. Исследовать биохимическую природу антимикробных компонентов изолированных штаммов МКБ и механизмов их действия на клетки индикаторных штаммов;
 5. Исследовать пробиотические и другие полезные технологические свойства изолированных штаммов МКБ с антимикробными активностями;
 6. Изучить динамику синтеза и секреции антимикробных метаболитов изолированных штаммов МКБ;
 7. Подобрать оптимальные условия для продуцирования бактериоцинов и частично очищать наиболее перспективные антимикробные пептиды.

Научная новизна работы. Впервые в Азербайджане проведен широкомасштабный скрининг традиционных кисломолочных продуктов, изготовленных во всех экономических регионах страны, по поиску МКБ, обладающих бактериоциногенными свойствами.

Из 63 крупных городов 9 экономических регионов Азербайджана собраны и анализированы 107 образцов кисломолочных продуктов, из которых были изолированы 5541 микробных колоний. Из них у 1247 (22.5%) была обнаружена антимикробная активность против *L. delbruki* spp. *bulgaricus* 340. Активность 66 штаммов была обусловлена присутствием БПИВ.

С помощью современных методов были идентифицированы 66 бактериоциногенных штаммов МКБ. Установлено, что 26 палочкообразных бактериоциногенных штаммов относятся к 14 видам рода *Lactobacillus*. Среди шаровидных 40 штаммов, относящиеся роду *Enterococcus*, выявлены 5 видов.

Изучен спектр антимикробной активности 66 изолированных бактериоциногенных штаммов МКБ. Установлено, что БПИВ 11 штаммов ингибировали рост от 8 до 23 различных индикаторных микроорганизмов.

Исследован механизм действия бактериоцинов в соответствии со степенью их адсорбции на поверхность клеток пассивных культур. Показано, что тип ингибирующего действия бактериоцинов исследуемых штаммов проявляется в бактериостатической и бактерицидной форме. Исследованные штаммы МКБ не обладали мультирезистентностью к антибиотикам и не содержали факторы вирулентности, специфичные для патогенов, что позволяет безопасно применять их в качестве ко-культур и пробиотиков в производстве различных ферментированных продуктов.

Подобраны оптимальные условия культивирования для синтеза бактериоцина штамма *Enterococcus faecium* S5, что позволило увеличивать его продуктивность в 32,5 раз.

Практическая ценность работы. Используемые в работе методы быстрого и эффективного скрининга и изолирования бактериоциногенных штаммов МКБ из традиционных кисломолочных продуктов Азербайджана, а также подбора оптимальных условий для увеличения титра бактериоцина, рекомендуются для использования в лабораториях, занимающихся выделением и очисткой бактериоциноподобных веществ, с целью применения их в пищевой промышленности, медицине, ветеринарии как антимикробные агенты против гнилостных и болезнетворных бактерий. Отобранные и изученные штаммы молочнокислых бактерий могут быть использованы в качестве продуцентов бактериоцина и других антимикробных метаболитов в научных исследованиях, в производстве кисломолочных, мясных, рыбных и растительных продуктов, а также, в качестве пробиотиков в медицине и ветеринарии. Нуклеотидные последовательности генов 16S рДНК новых бактериоциногенных штаммов МКБ депонированы в базу данных *GenBank*. Из отобранных и изученных штаммов создана коллекция (банк) бактериоциногенных и пробиотических штаммов МКБ.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- традиционные кисломолочные продукты Азербайджана являются богатыми источниками МКБ с антимикробными свойствами, которые обусловлены с секрецией в среду обитания органических кислот, перекиси водорода и бактериоцинов;
- видовой состав индикаторных микроорганизмов, входящий в состав спектра антимикробной активности является уникальным для каждого изолированного бактериоциногенного штамма МКБ;

- степень стабильности отдельных бактериоцинов в ответ на воздействие различных внешних факторов отличается друг от друга;
- бактериостатический или бактерицидный механизмы подавления роста пассивных микроорганизмов зависит от степени адсорбции отдельных бактериоцинов на их поверхность;
- химические консерванты, ионы Mn^{2+} и 3% раствор хлористого натрия стимулируют, а ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , казеин и лецитин угнетают антимикробную активность бактериоцинов;
- качественный и количественный состав генов вирулентных факторов в геноме штаммов рода *Enterococcus* зависит от их вида и источников изолирования;
- биосинтез энтероцина S5, который состоит из двух разных полипептидных цепей, является индуцибельным процессом и строго зависит от условий культивирования штамма продуцента.

Апробация работы. Результаты исследований по теме диссертации представлялись и обсуждались на Республиканских и Международных симпозиумах и конференциях, в том числе: Республиканская научная конференция «Экспериментальная биология и современность» (Баку, 2005); XV республиканская конференция аспирантов и молодых ученых (Баку, 2006); Республиканская научная конференция «Проблемы прикладной биологии» (Баку, 2007); Республиканская научная конференция «Современные проблемы биологии» (Баку, 2008); Республиканская научная конференция, посвящённая 90-летию БГУ (Баку, 2009); Республиканская научная конференция «Актуальные проблемы биологии XXI века», посвящённая 100-летию акад. Абдуллы Караева (Баку, 2010). Республиканских научных конференциях «Научные успехи в биологии» (Баку, 2006, 2009, 2010); Международная научная конференция, посвященная 60-летию юбилею ДГУ (Махачкала, РФ, 2006); Международная научная конференция, посв. 100-летию акад. Гасана Алиева, “Экология: проблемы природы и общества” (Баку, 2007); 11-я Международная школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2007); III Международная конференция молодых учёных «Биоразнообразие. Экология. Адаптация. Эволюция» (Одесса, 2007); III международный симпозиум «Recent Advances in Food Analysis» (Прага, Чехия, 2007); VIII Международная конференция «Интродукция нетрадиционных и редких растений»

(Мичуринск, 2008); Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биоэкологии» (Москва, 2008); Международная конференция “ELIAVA-2008. Phage Biology, Ecology and Therapy Meeting” (Тбилиси, РГ, 2008); Международный Нинс-симпозиум «Lactic acid bacteria: health, evolution and systems biology» (Нидерланды, Egmond an Zee, 2008); II международный симпозиум «Antimicrobial Peptides. Food veterinary medical and novel applications» (Франция, Сан-Мало, 2009); XI международный симпозиум “*BIOLOGY – TRADITIONS AND CHALLENGES*” (Болгария, София, 2009); II международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биоэкологии» (Москва, 2010); VI международная конференция молодых ученых „Биоразнообразие. Экология. Адаптация. Эволюция” посвященная 150-летию со дня рождения В.И. Липского (Одесса, 2013); Международной научная конференция, посв. 91-летию Г. Алиева «Актуальные проблемы современной химии и биологии» (Гянджа, 2014), Международной научная конференция, посв. 85-летию образования Биологического факультета БГУ (Баку, 2014).

Публикации. Результаты диссертации опубликованы в 53 печатных работах. Из них 27 статей в научных журналах (в том числе 3 в журналах с импакт фактором), 4 статьи в материалах международных конференций и 22 тезисов.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 частей, 8 глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 548 наименований. Работа изложена на 371 страницах компьютерного текста, включая 51 таблиц и 39 рисунков.

Часть работы выполнена в рамках следующих научных программ: Проект (JEP-25084-2004 «Master Sciences et Gestion de l’Environnement») в рамках программы Темпус Европейской Комиссии - 2003-2005; Проект SfP - 982164 – «Study of antimicrobial and hypoallergenic products of LAB» в рамках программы НАТО «Наука за Мир» – 2006-2009; Проект по ЕСO-NET, Dossier N°08139-XA, МИД Франции - 2004-2005; Проект по гранту посольства Франции в Баку - 2005-2007; Проект по гранту «50/50» Бакинского Государственного Университета - 2010

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

К скринингу были привлечены всего 107 образцов традиционных кисломолочных продуктов, приобретенных из 63 крупных городов. Все образцы были изготовлены из цельного молока и были готовы к употреблению. До использования они были хранены при температуре -20°C .

Скрининг штаммов с антимикробными свойствами осуществляли модифицированным методом реплики De Vuyst и др. (1994). В качестве тест культуры использовали *L. bulgaricus* 340 и *L. brevis* F145.

Чистые культуры изолированных МКБ хранили в виде сток-культур при температуре -80°C в MRS-среде, содержащей 30% (по объему) глицерина.

Фенотипическую идентификацию на видовом уровне осуществляли по методу Sharpe (1975) и с помощью API50CH (L) системы (bio-Merieux, Lyon, France). Идентификацию энтерококков на видовом уровне осуществляли по схеме Murray et al. (2003).

Полученные изоляты были идентифицированы при помощи Rep – ПЦР анализа генома бактерий и ПЦР амплификации и секвенирования 16S рДНК фрагмента.

Хромосомной ДНК бактерий экстрагировали по модифицированному методу осаждения ацетатом калия, как описано Randazzo et al. (2002) и очищали методом Horwood et al. (1985). В качестве матрицы для ПЦР-амплификации при гер-ПЦР- анализе использовали общую ДНК изолированных штаммов. В качестве олигонуклеотидных праймеров были использованы BOXA1R (5-CTACGCAAGGCGACGCTGAG-3) и (GTG)₅ (5-GTGGTGGTGGTGGTG-3), каждый со своей оптимальной программой ПЦР (Versalovic и др., 1994). Реакции проводили в соответствии с процедурой Terzic-Vidojevic et al (2009). Кластеризация проводилась с помощью программы Statistica 7.0 для Windows (в StatSoft Inc. США). 16S рДНК фрагменты амплифицировали при помощи универсальных праймеров U968 (5-AACGCGAAGAACCTTAC-3) и L1401 (5-GCGTGTGTACAAGACCC-3) (Zoetendal et al., 1998; Randazzo et al., 2002). Полученные ПЦР - продукты очищали с помощью QIAquick PCR Purification Kit/250 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), и секвенировали сервисом "CRI BI BMR SERVIZIO sequenziamento DNA", (Университета Падуя, Италия).

Антимикробную активность МКБ определяли методом диффузии (Cleveland et al. 2001) В качестве тест-культуры использовали *L.bulgaricus* 340.

Активность бактериоцинов вычисляли по следующей формуле: ПЕ/мл = $2^n \times 1.000 \mu\text{l}/10\mu\text{l}$, где n – степень разбавления культуральной жидкости, проявляющая зону ингибирования индикаторных штаммов более чем, на 2 мм (Batdorj, et al., 2006).

Адсорбцию бактериоцинов, на поверхность клеток - продуцентов определяли по методу Yang (1992).

Гидрофобность клеточной поверхности рассчитывали в соответствии с уравнением: $\% H = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$, где A_0 и A – численные значения поглощения до и после экстракции органическим растворителем, соответственно.

Очистку энтероцина осуществляли по схему, состоящей из трех ступень: катионообменная хроматография (КХ - Streamline SP (26x100 мм, GE Healthcare, Amersham, Uppsala, Sweden), препаративная обратнофазная хроматография (ОФХ - RPC-15 (Source, Pharmacia; 250 мм x 10 мм)) и обратнофазная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ - C18 (Nucleosil Reverse Phase C18; 8 мм x 200 мм)).

Белок определяли методом Smith *et al.* (1985), с применением бицинхоиновой кислоты.

Электрофорез проводили по слегка модифицированному методу Schagger and Jagow (1989).

Масс-спектры бактериоцинов были определены электроспрей ионизацией и ионной ловушкой типа LCQ Advantage (Thermo Finnigan, Сан-Хосе, Калифорния). Спектры были проанализированы с помощью программного обеспечения Xcalibur (Thermo Finnigan).

Гидролазную активность штаммов определяли по Скотт (2001).

Чувствительность к антибиотикам проверяли методом диффузии Chang и др., 2001. Результаты интерпретировали согласно стандартам Национального комитета по клиническим испытаниям (NCCLS) антимикробных веществ, а для лактобацилл, в соответствии с Научным комитетом Европейской комиссии по питанию животных.

Наличие генов, кодирующих различные факторы вирулентности энтерококков, проверяли с помощью ПЦР, используя соответствующие праймеры. Статистические вычисления полученных данных проводились с помощью программы «Сигма-плот 12.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

СКРИНИНГ МКБ С АНТИМИКРОБНЫМИ СВОЙСТВАМИ ИЗ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОНОМИЧЕСКИХ РЕГИОНОВ АЗЕРБАЙДЖАНА

В нашей стране, в зависимости от особенностей развития различных отраслей промышленности и сельского хозяйства, выделяют следующие 10 экономических регионов. В связи с временным нахождением под оккупацией армянских вооруженных сил из населенных пунктов Келбеджер-Лачинского и частично Верхне-Карабахского экономических регионов приобрести образцы кисломолочных продуктов не представлялось возможным.

Результаты проведенного скрининга кисломолочных продуктов по поиску бактериоциногенных штаммов МКБ из остальных экономических регионов суммированы в табл.1. Из этой таблицы следует, что в составе 12 образцов кисломолочных продуктов *Баку – Апшеронского экономического региона* было изолировано всего 8 бактериоциногенных штаммов. Наиболее широкий спектр антимикробной активности наблюдался у штаммов 5w и 8w, обнаруженных в составе говсанского сыра. В присутствие активного компонента штамма 5w не могли расти культуры 12 пассивных штаммов. Активный компонент штамма 8w ингибировал рост 16 из проверенных 38 тесторганизмов.

Из 18 образцов кисломолочных продуктов *Низменного экономического региона* мы изолировали 11 бактериоциногенных штаммов. Самый активный штамм S5 был изолирован из Сабирабадского айрана и подавлял рост 21 пассивных штаммов.

В составе 11 образцов кисломолочных продуктов *Западного экономического региона* было изолировано всего 4 бактериоциногенных штаммов. Наиболее широкий спектр антимикробной активности наблюдался у штамма Q1, изолированного из Газахского сыра. В присутствие активного компонента данного штамма не могли расти культуры 13 пассивных штаммов.

Из 12 образцов кисломолочных продуктов *Южного экономического региона* мы изолировали 8 бактериоциногенных штаммов. Самые активные штаммы L8 и M13 были изолированы из Лерикского сыра и образца гатыг из Масаллинского района, подавляли рост 16 и 10 пассивных штаммов, соответственно.

Таблица 1

Обобщенные результаты скрининга по поиску бактериоциногенных штаммов МКБ, изолированных из различных кисломолочных продуктов Азербайджана (пассивный штамм — *L. bulgaricus* 340)

Источники		Штаммы МКБ		Актив.штаммы	Природа активных компонентов			
Экон. регионы	Обр-цы	Кокки	Бациллы		Орг.кисл.	H ₂ O ₂	БПИВ	Др. метатты
Баку – Абшерон	12	433	261	163	117	32	8	6
Низменный и Западный	18+11	508+300	503+196	265+98	192+69	58+22	11+4	4+3
Южный и Шеки-Закатальский	12+12	261+266	206+199	106+124	69+84	26+27	8+8	4+5
Губа-Хачмаз и Верхне Карабах	10+6	267+205	272+177	93+67	56+40	28+22	7+4	2+1
Горно – Ширван и Нахчиван	12+14	332+520	253+382	124+207	57+100	58+94	6+10	3+3
Всего:								
9	107	3092 (55,8 %)	2449 (44,2 %)	1247 (22,5%)	784 (62,9 %)	367 (29,4 %)	66 (5,3 %)	31 (2,5 %)

В составе 22 образцов кисломолочных продуктов *Северо-Западного и Северо-Восточного экономических регионов* были изолированы 8 и 7 бактериоциногенных штаммов, соответственно. Наиболее широкий спектр антимикробной активности среди изолированных штаммов принадлежал только двум - FAZ16m и X24. Штамм FAZ16m был изолирован из Шекинского сыра «Мотал» и ингибировал рост 14 пассивных микроорганизмов. Штамм X24 был изолирован из Хачмазского сыра и эго бактериоцин подавлял рост 11 индикаторных микробов.

Из 18 образцов кисломолочных продуктов *Верхне-Карабахского и Горно – Ширванского экономических регионов* мы изолировали 10 бактериоциногенных штаммов. Анализ спектров антимикробной активности этих бактериоциногенных штаммов МКБ показал, что из них только двое - J1-48 и Sh66 обладали сравнительно широким спектром антимикробной активности: в состав изученного спектра штамма J1-48 входили 14 индикаторных микроорганизмов, а штамма Sh66 – 8.

В составе 14 образцов кисломолочных продуктов *Нахчиванского экономического региона* было изолировано всего 10 бактериоциногенных штаммов. Среди бактериоциногенных штаммов региона со своим широким спектром антимикробной активности выделился только один штамм - Oq7, который подавлял рост 13 пассивных штаммов.

Необходимо отметить, что такой широкомасштабный скрининг в Азербайджане проводился впервые. Привлечь к скринингу удалось всего 107 образцов традиционных кисломолочных продуктов, из которых 47 образцов сыра, 5 образцов шор, 31 образцов гатыг и 24 образцов айрана. Эти образцы были приобретены из 63 крупных городов 9 экономических регионов страны.

Из этих продуктов мы изолировали всего 6680 микробных колоний. Среди исследуемых изолятов 5531 оказались грамположительными и каталазаотрицательными. Из них 1247 колонии обладали антимикробной активностью и тормозили рост клеток *L. bulgaricus* 340. У 784 штаммов такими метаболитами были органические кислоты, 367 изолятов угнетали рост пассивного штамма посредством секреции в среду перекиси водорода, а 66 штаммов оказались бактериоциногенными и подавляли развитие индикаторного штамма с помощью бактериоцинов.

Было обнаружено, что большинство этих штаммов обладает довольно узким спектром активности. БПИВ 46 штаммов ингибировали рост клеток максимум 3, причем генетически родственных пассивных

микроорганизмов. Однако у 11 штаммов обнаружена строгая анимикробная активность по отношению широкого круга пассивных штаммов. БПВВ этих штаммов ингибировали рост от 10 до 21 различных индикаторных микроорганизмов. Большинство из них обладали антимикробной активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и плесени. У 7 бактериоциногенных штаммов наблюдали строгую антилистерийную активность. 9 штаммов обладали фунгицидной активностью против *C. pseudotropicalis* (2), *Sa. cerevisiae* DSH213.83 (7) и *Fu. graminearium* CBS 1385 (1). Подобные активности выделенных штаммов показывают их большой потенциал для применения в качестве натуральных биоконсервантов в пищевой промышленности и лекарственных препаратов в медицине.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИОЦИНОГЕННЫХ МКБ

Фенотипическая идентификация

Морфологические и биохимические признаки активных штаммов установлены на основе методических указаний Sharpe (1975). Микроскопирование 66 активных штаммов выявило, что из них 26 имеют палочковидную, а остальные 40 - коккобразную форму.

API50CH - тест

Результаты «API-теста» показали, что штаммы BN ATS 5w, BN ATS 7w, BN ATS 8w, G9 и X24 идентифицировались как *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei*, штаммы Su1 и Su2 - *Lactobacillus buchneri*, штаммы M13s и Sa2 - *Lactobacillus pentosus*, штаммы Q1- 4 и A4 - *Lactobacillus brevis*, штаммы Gc-39, Ga-13 и A3 - *Lactobacillus collinoides*, штаммы X8, X24, T-47 и L-16a - *Lactobacillus curvatus*, штаммы L24a и Oq7 - *Lactobacillus cake*, FAZ 16m - *Lactobacillus rhamnosus*, штамм Oz 26 - *Lactobacillus plantarum*, штамм Q79 - *Lactobacillus fermentum*, штамм L16a - *Lactobacillus asidofilus*, штамм Sr15 - *Lactobacillus salivarius*, штамм Sk8 - *Lactobacillus fruktivorans* и штамм Yi-32 был идентифицирован как *Lactobacillus helveticus*.

На основе фенотипических признаков среди изолированных 40 штаммов были найдены 5 видов энтерококков: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus hirae* и *Enterococcus durans*. Штаммы Bk9, Gr11, Is63, J1-48, L8, M1s, M13, Nn8,

Oq3, Od6, Q1, Q4F, Qn31, S1-5, S1-12, S1-38, S1-44 и S5 идентифицировались как *Enterococcus faecium*, штаммы Bk7, B43, M7, M8s, N5 и Sh66 - *Enterococcus faecalis*, штаммы A8L, Isa32, Qa48, Sn33 и Z32 - *Enterococcus mundtii*, штаммы Au22, Gr64, L6, M48, и Xr11- *Enterococcus hirae*, а штаммы Ad55, Cq9, Isq4, K71, Q25 и Xz14 идентифицировались как *Enterococcus durans*.

Генетическая идентификация штаммов

Rep – ПЦР анализ геномов бактериоциногенных штаммов

Для представителей рода *Lactobacillus* амплификация повторяющихся последовательностей ДНК была осуществлена с помощью праймера BOXA1R. Праймер (GTG)₅ был использован для молекулярной идентификации штаммов рода *Enterococcus*. Анализ электрофореграммы для штаммов рода *Lactobacillus* показал, что результаты фенотипической идентификации подтвердились только для определенных штаммов МКБ. Например, профиль амплифицирующихся участков ДНК штаммов BN ATS 5w, BN ATS 7w, BN ATS 8w, G9 и X24 совпали аналогичной профилю референс - штамма *L. paracasei* spp. *Paracasei*, что совпадает с результатами предыдущей идентификации. Такое совпадение обнаружилось для одного (Su1) из двух штаммов вида *Lactobacillus buchneri*, штамма M13s идентифицированного как *L. pentosus*, A4 - *L. brevis*, а также для штаммов X8, X24 и T-47 идентифицированных как *L. curvatus*. Фенотипическая идентификация остальных 14 штаммов МКБ не получили свои подтверждения с помощью данного анализа.

Электрофореграмма Rep – ПЦР анализа генома штаммов рода *Enterococcus* подтвердила результаты фенотипической идентификации.

Анализ 16S р ДНК

С этой целью анализу были привлечены ДНК изолированных и не идентифицированных штаммов МКБ. С помощью праймеров U968 и L1401 были амплифицированы соответствующие участки генома бактерий. Результаты этих анализов и обобщенные результаты всего процесса идентификации показали, что всего к анализу были привлечены 14 штаммов. Секвенция первичной структуры участка 16S рДНК штамма Su2, который ранее был идентифицирован как *L. buchneri*, показала 99% идентичности с аналогичной последовательностью видов *L. collinoides* и

L. brevis. Штамм АЗ по фенотипическим признакам идентифицировался как *L. collinoides*. Однако с помощью данного метода проявлял 98% идентичности с видами *L. buchneri* и *L. brevis*. Штамм Q1-4, идентифицированный как *L. brevis*, с помощью гер-ПЦР и DGGE анализа не был идентифицирован. Данный метод подтвердил, что этот штамм на 99% имеет сходство с *L. brevis* и *L. collinoides*. Точно такие же результаты были получены со штаммами Ga-13 и Gc-39, которые были предварительно идентифицированы как *L. collinoides*. Результаты фенотипической идентификации подтверждались также для штаммов L16a и L24a, ранее идентифицированных как *L. curvatus* и *L. cake*, соответственно. Первичная структура 16S рДНК совпала 100% с референс штаммом данного вида. Второй штамм на 97% был идентичен с *L. cake* и *L. casei*. Такое подтверждение было обнаружено также для штаммов *L. pentosus* Sa2, *L. fermentum* Q79, *L. plantarum* Oz26, *L. helveticus* Yі32 и *L. rhamnosus* FAZ16m. Исключение составили два штамма - Sk8 и Sr15. Первый из них, идентифицированный как *L. fruktivorans*, показал 98% идентичности с *L. paracasei* и *L. rhanosus*. Второй штамм, идентифицированный как *L. salivarius*, не идентифицировался с помощью применяемых молекулярных методов.

Нуклеотидная последовательность гена 16S рДНК штамма *E. faecium* S5 депонирована в базу данных GenBank под номерами: DQ255951-DQ255954.

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ АКТИВНЫХ ШТАММОВ МКБ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ АЗЕРБАЙДЖАНА

Влияние физико-химических факторов на стабильность и антимикробную активность бактериоцинов

Влияние температуры и pH среды на стабильность бактериоцинов. В пределах температуры от 30⁰С до 70⁰С в обеих экспозициях изученные бактериоцины сохраняли свою антимикробную активность. Однако нагревание бактериоциновых препаратов до 100⁰С в течение 30 мин приводило к редуцированию активности бактериоцинов 4-х штаммов – BN ATS 5w, BN ATS 8w, FAZ 16m и Q1. А при 120 минутной экспозиции бактериоцины этих штаммов полностью теряли свою антимикробную активность. В таких условиях наблюдалось частичная потеря активности бактериоцинов еще двух штаммов – X 24 и Oq 7, которые

полностью лишились своей активности после их автоклави-рования (экспозиция 121⁰С – 20 мин).

Нагревание препаратов бактериоцинов всех исследуемых штаммов до 121⁰С отрицательно сказывалось в проявлении их антимикробной активности. При этом бактериоцины штаммов энтерококков оказались более термостабильными. Так, бактериоцины штаммов BN ATS 5w, BN ATS 8w, FAZ 16m, X24, Oq7, идентифицированные как представители рода *Lactobacillus* и Q1 (*Enterococcus*) полностью, а штаммов M13, S5, L8, J1-48 и Sh66 (все штаммы относятся роду *Enterococcus*) частично потеряли свои активности.

Устойчивость к высокой температуре является важным свойством бактериоцинов и связана с наличием межмолекулярных связей, и чем больше их число, тем выше общая стабильность пептида.

Результаты экспериментов по определению зависимости антимикробной активности изученных нами бактериоцинов от значений рН среды в диапазоне рН 2.0 – 12.0 показали, что в пределах значений рН от 3.0 до 10.0 стабильность антимикробной активности изученных бактериоцинов сохраняется. Однако более низкое и высокое значения рН среды отрицательно влияют на активность практически всех исследуемых нами бактериоцинов. Так, например, при рН 2.0 наблюдалась полная потеря активности бактериоцинов штаммов BN ATS 8w, FAZ 16m, M13, Q1 и L8. В степени активности бактериоцинов всех остальных штаммов (BN ATS 5w, X 24, Oq 7, S5 J1-48 и Sh66) наблюдалось частичное редуцирование. Точно такую же картину наблюдали при значении рН среды 12.0.

Следует отметить, что изучение влияние указанных выше низких и высоких значения рН на сохранения стабильности бактериоцинов с прикладной точки зрения не является обязательным, поскольку эти значения рН практически не формируются в процессах возделывания ферментированных продуктов. Однако результаты этих экспериментов могут быть полезными для определения функциональных групп аминокислотных радикалов, входящих в состав бактериоцинов, следовательно, и пролить свет на пути выяснения механизмов их действий, а также те или иные биохимические и молекулярные свойства исследуемых бактериоцинов.

Влияние ферментов, детергентов и других соединений на антимикробную активность бактериоцинов

Под действием амилолитического фермента активность двух бактериоцинов - BN ATS 5w и BN ATS 8w значительно уменьшилась. При

этом отрицательное влияние данного фермента на бактериоцин штамма BN ATS 5w, по сравнению со вторым, ощущалось сильнее. Первый из них потерял свою активность на 50%, тогда как, второй – только на 33%. Бактериоцины этих штаммов точно также отреагировали на совместную инкубацию с липазой. Это связано тем, что в составе активных доменов этих бактериоцинов присутствуют углеводные и липидные компоненты.

Под действием протеиназы К и проназы Е наблюдалось полная потеря активности всех без исключения бактериоцинов. Под влиянием пепсина бактериоцины 7 штаммов (BN ATS 5w, BN ATS 8w, FAZ 16m, Oq7, S5 и Q1J1-48), также потеряли всю свою активность. В присутствии данного фермента активность бактериоцинов штаммов M13, L8 и Sh66 редуцировалась на 50%, а бактериоцина штамма X24 - на 33%. Инкубация бактериоцинов совместно с трипсином также привело к полной (в случае с продуктами штаммов FAZ 16m, Oq7, Q1 и Sh66), или же к частичной (у всех остальных штаммов) потери их антимикробной активности.

Такой тип зависимости активности бактериоцинов от воздействия протеолитических ферментов указывает на их пептидную природу. Наблюдаемая частичная устойчивость пепсину и трипсину, по-видимому, связана с отсутствием специфических к этим протеолитическим ферментам аминокислотных последовательностей в первичных структурах этих молекул. Что касается каталазы, то этот фермент на антимикробную активность изучаемых бактериоцинов практически ни какое влияние не оказывал. Полная резистентность активных компонентов против влияния каталазы исключает присутствие перекиси водорода в проявлении антимикробной активности бактериоцинов изученных штаммов.

Влияние детергентов и поверхностно-активных соединений на бактериоцинов не выявило заметных изменений в их способностях подавлять рост клеток пассивной культуры.

Влияние некоторых составных компонентов ферментированных продуктов на антимикробную активность бактериоцинов

Результаты опытов по выявлении характера влияния двухвалентных катионов на активность бактериоцинов показали, что разные катионы по разному повлияли на активность бактериоцинов. Так, ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} ингибировали их антимикробную активность, а ионы Mn^{2+} , наоборот, стимулировали. Была обнаружена корреляция между концентрацией про-

веренных катионов и степенью соответствующих форм индукции активности бактериоцинов. Примечательно, что такая корреляция наблюдалась со всеми изученными бактериоцинами, с той лишь разницей, что у одних наблюдаемый эффект было больше, а у других, меньше. Степень ингибирующего и стимулирующего эффектов этих катионов отличалась также в зависимости от видовой принадлежности пассивных культур. Так, по мере увеличения генетической отдаленности тест организмов степень наблюдаемых эффектов также были повышены. Аналогичная картина наблюдалась и со стимулирующим эффектом ионов марганца на антимикробную активность исследуемых нами бактериоцинов.

Наблюдаемый отрицательный эффект ионов кальция и натрия на активность бактериоцинов может быть связан тем, что соединяясь с отрицательно заряженными фосфолипидами, они увеличивают жесткость плазматической мембраны, вследствие чего, уменьшают их способность адсорбировать молекулы бактериоцинов. Стимулирующий эффект ионов марганца можно объяснить с их окислительно-восстановительными способностями. Однако, для полного выяснения механизма данного эффекта нужны более детальные исследования.

Казеин оказывал ингибирующий эффект на антимикробную активность бактериоцинов. Однако наблюдаемый эффект данного компонента по характеру отличался у разных бактериоцинов и зависел от его концентрации и от видовой принадлежности проверенных пассивных культур. В более высоких концентрациях казеина разница в значениях ингибирующего эффекта между пассивными культурами особо не проявлялась.

Лецитин, так же как и казеин ингибировал антимикробную активность бактериоцинов. Однако его ингибирующий эффект отличался у разных бактериоцинов как в зависимости от концентрации, так и от используемой пассивной культуры. По мере увеличения индуктора наблюдалось повышение устойчивости клеток пассивных культур. При этом в присутствии лецитина резистентность грамположительных бактерий к бактериоцинам была больше, чем у грамотрицательных бактерий.

Факт зависимости активности всех исследуемых бактериоцинов от концентрации лецитина и от грамм статуса пассивных культур наводит на мысль о том, что мишенью лецитина в целом является не мембранная система пассивных культур, а сами бактериоцины. Это обстоятельство объясняется с тем, что амфотерные молекулы лецитина (цвиттерионы) образуют стабильный комплекс с пептидами бактериоцинов, тем самым

лишают их от антимикробной активности.

Влияние химических консервантов и хлористого натрия на антимикробную активность бактериоцинов

Результаты опытов показали строгий синергизм пропил-парабена (ППб) с бактериоцинами в проявлении их антимикробной активности. Появление в среде даже очень низкой концентрации ППб приводило к резкому повышению антимикробной активности бактериоцинов. Активность бактериоцинов коррелятивно увеличивалась по мере увеличения концентрации ППб. Более высокие концентрации ППб (0,12 г/л) стимулировали активность бактериоцинов в 14-16 раз.

Стимулирующий эффект ППб сильно варьировал в зависимости от видов пассивных культур. Так, например, наивысшая степень увеличения антимикробной активности (в 16 раз) у бактериоцина штамма S5 наблюдался против грамотрицательных клеток *E. coli* ATCC 23355. В аналогичных условиях кратность увеличения его активности по отношению *L. bulgaricus* 340 и *E. faecalis* ATCC 1.144, соответственно, равнялись к 5-и 12-и. Ответные реакции бактериоцинов на присутствие пара-гидроксibenзойной кислоты (пГБК) количественно отличались друг от друга. При этом степень повышения их активности зависела как от концентрации индуктора (1), так и от разновидности пассивных культур (2). Зависимость активности бактериоцинов от первого фактора носила пропорциональный характер. В целом, при стимулировании антимикробной активности бактериоцинов пГБК против пассивных культур, по степени чувствительности первое место заняли клетки *L. bulgaricus* 340, затем клетки *L. monocytogenes* 104. А самыми устойчивыми оказались клетки *E. coli*.

Опыты по изучению влияния концентрации хлористого натрия (0-5%) на активность изученных бактериоцинов показали, что хлористый натрий до 3% её стимулирует. Однако ответные реакции различных бактериоцинов к 5%-ной концентрации хлористого натрия, существенно отличались друг от друга. У некоторых бактериоцинов (BN ATS 8w, L8) активность, по сравнению с показателями при 3% концентрации соли, практически не менялась, у бактериоцинов штаммов FAZ 16m, X24, M13 и Q1 она значительно повышалась. Другие же бактериоцины, такие как BN ATS 5w, Oq7, S5 и J1-48 потеряли свою активность от 0,4 (J1-48) до 1,1 (BN ATS 5w) единиц относительной активности, обнаруженной при 3% концентрации соли.

Необходимо отметить, что похожая неоднозначная реакция иссле-

двух бактериоцинов к разным концентрациям хлористого натрия наблюдалась и по отношению другим пассивным штаммам - *E.coli* ATCC 23355 и *L. monocytogenes* 104. Разница была в том, что в этих случаях разность на уровнях активности против этих штаммов тех же бактериоцинов проявилась более выражено, по сравнению с *L. bulgaricus* 340.

Механизм действия бактериоцинов

Добавление препаратов бактериоцинов лактобацилл в культуру клеток *L. brevis* угнетало ее рост. При этом достоверное снижение начального значения оптической плотности (ОП) данной культуры под воздействием этих бактериоцинов не наблюдалось (рис. 1А).

Под действием бактериоцинов штаммов BN ATS 5w, FAZ 16m и Oq7 рост культуры клеток *E.coli* не только прекращался, но и резко понижалась ОП, что указывает на лизис значительной части бактериальных клеток (рис.1В). Однако при добавлении бактериоцинов BN ATS 8w и X24 рост культуры пассивного штамма ход и был остановлен, но, ни какие понижения в ОП этих культур не были обнаружены. Такое обстоятельство исключает бактерицидное влияние этих бактериоцинов на исследуемые клетки пассивных штаммов.

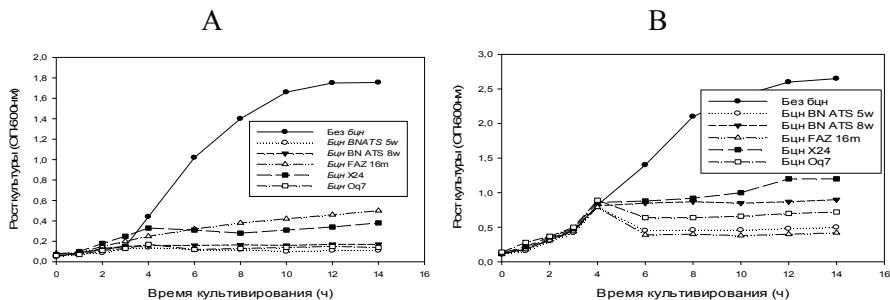


Рис. 1. Влияние бактериоцинов лактобацилл, изолированных из кисломолочных продуктов Азербайджана, на рост культуры *L. brevis* F1106 (А) и *E. coli* (В). Стрелка указывает время добавления бактериоцинов (в 3 ч и в 4 ч, соответственно)

Из рисунка 2А видно, что энтероцины, также, как и бактериоцины изолированных активных лактобацилл, угнетали рост культуры *L. bulgaricus* 340. Под действием четырех энтероцинов (M13, Q1, J1-48 и Sh66) рост клеток в культуре, после их внесения в культуры полностью остано-

вился и ОП этих культур практически не менялась до конца наблюдений. Однако в присутствии остальных двух энтероцинов (S5 и L8) сразу после внесения их препаратов в культуру пассивного штамма ее ОП значительно снижалась. Интересно отметить, что под действием этих двух энтероцинов ОП культуры другого пассивного штамма – граммотрицательной бактерии *E.coli*. штамма ATCC 23355 также значительно снижалась (рис. 2В). Такой же эффект по отношению этого пассивного штамма проявлял препарат энтероцина M13. В присутствии препарата Q1 также наблюдался

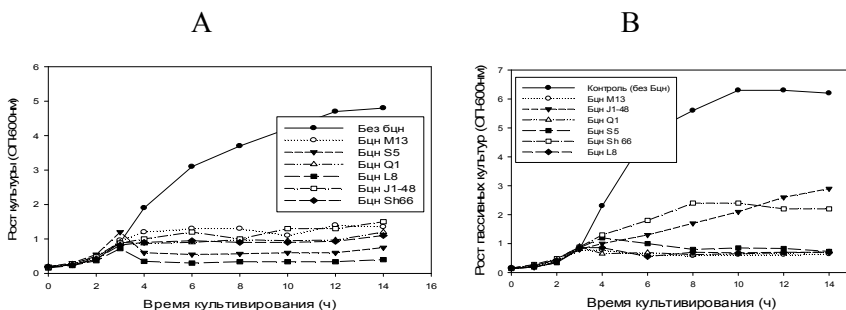


Рис. 2. Влияние бактериоцинов энтерококков, изолированных из кисломолочных продуктов Азербайджана, на рост культуры *Lb. bulgaricus* 340 для всех бактериоцинов (А) и *E.coli* ATCC 23355 (для M13, S5 и L8) и *L. monocytogenes* 104 (для Q1, Sh66 и J1-48) (В). Стрелка указывает время добавления бактериоцинов (в 3 ч культивирования)

спад оптической плотности пассивной культуры. Однако под действием двух остальных энтероцинов - J1-48 и Sh66 ОП пассивных культур продолжала расти, но в графике отсутствовали характерные для спонтанных культур фазы роста.

Адсорбция бактериоцинов на поверхность клеток бактериальных культур

Разные бактериоцины лактобацилл по степени адсорбции отличались между собой. Например, наиболее высокая степень адсорбции на поверхность клеток *L. brevis* F1106, была обнаружена у бактериоцина штамма X24, которая составила 78%. Аналогичные показатели других бактериоцинов составили 40%, 44%, 36% и 32% для бактериоцинов штаммов BN ATS 5w, BN ATS 8w, FAZ 16m и Oq7, соответственно. Степень адсорбции бактериоцинов на поверхности клеток резистентного

штамма *E. coli* СР 104368 и составил в среднем 22%, а на поверхность клеток штаммов продуцентов был от 8% (бактериоцин Оq7) до 13% (бактериоцин BN ATS 8w). Степень адсорбции энтероцинов на поверхность клеток пассивных штаммов была выше. Степени адсорбции энтероцинов штаммов M13, S5 и L8 на поверхность клеток *L. bulgaricus* 340 были достаточно высоки и составили 54%, 84% и 78%, соответственно. Энтероцины остальных штаммов (Q1, J1-48, Sh66) также показали значительную степень адсорбции, но ниже, чем предыдущие их аналоги. Эти показатели у последних были 48%, 52% и 47%, соответственно. Степень адсорбции разных энтероцинов на поверхности клеток отдельных резистентных штаммов варьировал в интервале от 24% до 38%. Значительная адсорбция (от 16% до 21%) всех исследуемых энтероцинов наблюдалась также и на поверхности клеток – продуцентов.

Сравнительное изучение результатов этой и предыдущей серий экспериментов выявило прямые корреляции степени адсорбции бактериоцинов с механизмом их действия на бактериальные клетки, протестируемые в разных целях. Так, например, бактерицидный эффект на чувствительные клетки штамма *L. brevis* F1106 был обнаружен только у бактериоцина X24, который обладал также наиболее высокой степенью адсорбции на поверхность клеток данного пассивного штамма. Бактериоцины же других лактобацилл, обладающие бактериостатическим эффектом на этом штамме, адсорбировались на его поверхности в два раза менее интенсивно.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что характер действия бактериоцинов на клетки пассивной культуры определяется количеством летальных рецепторов на поверхности клеточной мембраны последних. А количество летальных рецепторов зависит от иммунного статуса индикаторных штаммов.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ, ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ПОЛЕЗНЫХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОЦИНОГЕННЫХ ШТАММОВ МКБ И ИХ БЕЗОПАСНОСТИ

Рост бактериоциногенных МКБ при различных значениях рН среды и концентрациях желчных кислот

Результаты исследований по изучению кислотного стресса на рост исследуемых штаммов показали, что динамики роста разных штаммов при различных концентрациях ионов водорода отличались друг от друга. При

значении pH 2,5 подавляющее большинство штаммов не проявили признаки роста. Увеличение значение pH среды на 0,5 пунктов (pH 3.0) привело к заметным изменениям в динамике роста у 8 из 11 исследуемых штаммов. При таком значении pH ОП этих культур увеличивались в среднем до 20 раз. Исключение составляли всего три штамма - BNATS 5w, FAZ 16m и J2-48, которые практически не росли при таких условиях. При остальных значениях pH среды наблюдался нормальный рост штаммов.

Таким образом, все исследуемые бактериоциногенные штаммы МКБ проявляли толерантность к влиянию среды с pH 3.5, которое соответствует уровню кислотности желудочного сока. Подавляющее большинство этих штаммов (9 из 11) оказались устойчивыми к среде с особо повышенной кислотности со значением pH 2.0. Исключение составили штаммы L8 и Sh66, которые в течение полторы часа теряли около 2 логарифмические единицы своих клеток.

В следующей серии экспериментов мы исследовали влияние различных концентраций солей желчных кислот таких, как тауродезоксихолевой кислоты (ТДХК) или глюкодезоксихолевой кислоты (ГДХК) (0,1%, 0,3%, 0,5%) на рост бактериоциногенных штаммов МКБ. При физиологической концентрации соли желчных кислот (0,3%) из 11 исследуемых бактериоциногенных штаммов МКБ 8 обладали резистентностью и сохраняли свою жизнеспособность. Данный фенотип позволяет использовать этих штаммов в качестве пробиотиков. Рост штаммов S5, BNATS 5w и Q1 был полностью подавлен под воздействием 0,3% соли желчных кислот, что указывает на потерю жизнеспособности этих штаммов при прохождении по желудочно-кишечному тракту человека и других высших животных. Дальнейший скрининг на наличие генного оперона *cbh*, отвечающего за синтез СВН выявил, что большинство штаммов, чувствительных к влиянию желчных кислот, имели в своем геноме данной оперон. По-видимому, ген, отвечающий за синтез и секрецию гидролаз желчных кислот, является индуцибельным и для его активации нужны определенные условия и сигнальные механизмы.

Таким образом, из 11 исследуемых бактериоциногенных штаммов МКБ 8 проявляли способность расти в присутствии 0,3% ТДХК и ГДХК. Клетки этих штаммов обладали активностью фермента СВН. Клетки штаммов *E. faecium* S5, *E. faecium* Q1 и *L. paracasei* spp. *Paracasei* BNATS 5w оказались чувствительными к воздействию этой концентрации солей и лишены СВН-активности.

Определение чувствительности бактериоциногенных штаммов МКБ к различным антибиотикам

Результаты опытов по изучению влияния антибиотиков – ингибиторов синтеза компонентов клеточной стенки показали, что штаммы *E. faecium* S5 и J1-48 проявляли резистентность по отношению ванкомицину. Полная резистентность к остальным антибиотикам у всех других штаммов не была обнаружена.

Исследовали влияния антибиотиков – ингибиторов синтеза белков (хлорамфеникол, эритромицин, гентамицин, канамицин и стрептомицин) на рост бактериоциногенных штаммов МКБ. У 6 штаммов - 16m, Q7, M13, S5, J1-48 и Sh66 была обнаружена резистентность гентамицину. Штаммы 5w и 8 w, Q7 и J1-48 оказались резистентными канамицину, а штаммы 16m и Q1- к стрептомицину.

В третьей части этих опытов мы проверяли влияние антибиотиков, ингибирующих синтеза ДНК - рифамицина, офлоксацина и метронидазоля. Не один из исследуемых штаммов не могли нормально расти в присутствии рифомицина. Однако штаммы *E. faecium* M13, S5 и *E. faecales* Sh66 проявляли устойчивость метронидазолу. Большинство штаммов рода *Lactobacillus* оказались устойчивыми офлоксацину.

Таким образом, все изученные штаммы проявляли в разной степени чувствительность к таким широко применяемым в современной медицине антибиотикам, как пенициллину, ампициллину, эритромицину, хлорамфениколу и рифомицину, что создает предпосылку для использования этих штаммов в качестве пробиотиков.

Наличие генов вирулентности

В этой серии экспериментов мы с помощью ПЦР анализа проводили тестирование на присутствие в геноме исследуемых нами бактериоциногенных штаммов МКБ, относящихся к роду *Enterococcus*, следующих вирулентных генетических элементов: *ace* – ген коллагенадгезина, *asal* – ген одного из белков агрегации, *efaAfs* – один из генов, определяющих антигенность энтерококков, *esp* – ген поверхностного белка энтерококков, *fsrB* – один из трех регуляторных элементов экспрессии гена желатиназной активности, *gelE* – ген, кодирующий желатиназную активность, а также набор генов цитолизина (*cyIA*, *cyIB*, *cyIM*, *cyILL*, *cyILs*) (Табл.2). В качестве позитивного контроля был использован штамм *E. faecales* MM4594. В геноме штаммов *E. faecium* M13 и J1-48 продуктов

амплификации не одного из протестированных вирулентных генов обнаружить не удалось. У двух штаммов *E. faecium* (Q1 и L8) амплифицированы копии только одного гена - *cylLs*, а у одного штамма данного вида (S5) – два гена, *cylLs* и *gelE*.

Таблица 2

Профиль факторов вирулентности бактериоциногенных штаммов МКБ, изолированных из кисломолочных продуктов Азербайджана

Вирулент.	ШТАММЫ					
гены	M13	S5	Q1	L8	J1-48	Sh66
<i>ace</i>	-	-	-	-	-	+
<i>aca1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>cylA</i>	-	-	-	-	-	-
<i>cylB</i>	-	-	-	-	-	-
<i>cylLL</i>	-	-	-	-	-	-
<i>cylLs</i>	-	+	+	+	-	+
<i>cylM</i>	-	-	-	-	-	+
<i>esp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>efa AFs</i>	-	-	-	-	-	+
<i>fsrB</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Gel E</i>	-	+	-	-	-	-

Примечание: «+» - ген присутствует, «-» - ген отсутствует

Что касается штамма *E. faecales* Sh66, то в его геноме были обнаружены амплификанты сразу четырех вирулентных генов – *ace*, *cylLs*, *cylM* и *efaAFs*. Остальные вирулентные гены, такие, как *asa1*, *cylA*, *cylB*, *cylLL*, *esp*, а также, *fsrB* не были обнаружены в составе генома ни одного из изученных в этой работе штаммов МКБ. Наличие сразу четырех вирулентных генов – *ace*, *cylLs*, *cylM* и *efaAFs* генов в геноме штамма *E. faecales* Sh66, делает его непригодным для применения в пищевых отраслях.

Таким образом, частота обнаружения изученных вирулентных генов в составе геномов исследуемых нами штаммов рода *Enterococcus* не высокая, а обнаруженные продукты генных амплификаций исключают проявление их вирулентности.

Гидрофобность штаммов-продуцентов

Одним из многочисленных показателей пробиотических штаммов является их гидрофобность, которая обычно определяет интенсивность взаимодействия бактерий с клетками хозяина. Уровни гидрофобности бактериоциногенных штаммов отличались друг от друга. При этом степень гидрофобности штаммов рода *Lactobacillus* значительно превосходила те же показатели штаммов рода *Enterococcus*. Так, например, эти показатели для молочнокислых палочек были следующие: 29,2%, 31,6% и 45,8% для *L. paracasei* spp. *Paracasei* штаммов X24, BN ATS 5w и BN ATS 8w, соответственно; 59,2% для *L. rhamnosus* FAZ 16m, 34,7% для *L. casei* Oq7. Энтерококки же показали следующие значения: для *E. faecium* штаммов J1-48 – 13%, L8-11,1%, M13 – 14,4%, Q1-11,8%, и S5-8,4%, а для штамма *E. faecalis* Sh66 степень гидрофобности составила 15,3%.

Высокая степень гидрофобности бактериоциногенных штаммов рода *Lactobacillus*, безопасных и имеющих GRAS – статус указывает на благоприятный пробиотический признак и позволяет им более интенсивно колонизировать поверхность слизистой человека и животных, а также помещать в этом процессе клеткам патогенов и других нежелательных микробов. Слабая гидрофобность штаммов рода *Enterococcus*, которые обладают неоднозначной репутацией относительно безопасности, также является хорошим признаком пробиотика.

Авто-агрегация и ко-агрегация

Степень авто-агрегации штаммов рода *Lactobacillus* имела следующие значения: 26,02%, 28,12% и 41,21% для *L. paracasei* spp. *Paracasei* штаммов X24, BN ATS 5w и BN ATS 8w, соответственно; 51,98% для *L. rhamnosus* FAZ 16m, 36,84% для *L. casei* Oq7. Бактериоциногенные штаммы рода *Enterococcus* показали более низкие значения: для *E. faecium* штаммов M13 - 6,98%, S5-14,42%, Q1-3,68%, L8-7,32% и J1-48 - 4,12%, а для штамма *E. faecalis* Sh66 степень авто-агрегации составила 7,53%. Аналогичные показатели для пассивных микроорганизмов имели различные значения и отличались друг от друга и от показателей активных штаммов. Так, для *L. brevis*, *E. coli* и *L. monocytogenes* степени авто-агрегации составляли 38,16%, 15,96% и 25,3%, соответственно, что значительно больше по сравнению с аналогичными показателями штаммов рода *Enterococcus*.

Активные штаммы рода *Lactobacillus* агрегировали с пассивным штаммом *L. brevis* значительно более интенсивно, чем с *E. coli*, при этом в обоих случаях это свойство носило штамм специфичный характер. Так, степень ко-агрегации этих штаммов с первым индикаторным микроорганизмом варьировала от 26,16% до 44,32%. Аналогичные показатели других штаммов *L. paracasei* spp. *Paracasei* X24, BN ATS 8w и *L. rhamnosus* FAZ 16m приравнивались к 35,36%, 32,16% и 42,16%, соответственно. В случае с *E. coli*, степень ко-агрегации этих штаммов варьировала от 10,48% до 18,32%. Штамм специфичный характер ко-агрегации наблюдали также у активных штаммов рода *Enterococcus*. С клетками *E. coli* BAS23355 степени ко-агрегации для штаммов *E. faecium* M13, S5, Q1, L8 и J1-48 составляли 8,12%, 11,96%, 5,72%, 8,96% и 4,64%, соответственно, а для штамма *E. faecalis* Sh66 степень ко-агрегации составила 8,88%.

Штамм специфичный характер может быть связано с наличием у них вид специфичных поверхностных белков. Это свойство бактериоциногенных МКБ, с точки зрения их пробиотических и других биотехнологических показателей, имеет неоднозначное значение. С одной стороны высокая степень ко-агрегация с нежелательными бактериальными клетками способствует их удалению с пищеварительной системы. Агрегация с пассивными штаммами бактериоциногенных штаммов также создает благоприятное условие для более эффективной борьбы с ними и исключения микробов из организма хозяина. С другой стороны, низкий уровень ко-агрегации с патогенами может играть важную роль в предотвращении образования патогенной биопленки и таким образом стимулировать устранение возбудителя из желудочно-кишечного тракта.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОДУЦИРОВАНИЯ И ОЧИСТКА БАКТЕРИОЦИНА ШТАММА *E. FAECIUM* S5

Оптимизация продуцирования бактериоцина штамма *E. faecium* S5

При культивировании в M17L среде штамма *E. faecium* S5 максимальный бактериоциновый титр был обнаружен в ранней стационарной фазе роста штамма-продуцента и составил 1600 ПЕ/мл. Штамм был культивирован в 7 разных средах - M17L, M17G, MPC, TGE, BNI, ART и томатный сок. Однако для максимального продуцирования бактериоцина *E. faecium* S5, оптимальной средой явилась M17L среда, а оптимальным

значением стартовой численности популяции клеток продуцента составляла 10^7 - $10^{7,5}$ клеток в каждом мл среды.

Интенсивность роста культуры при различных температурных условиях отличалась друг от друга. Наиболее интенсивный рост штамма наблюдали при $+37^{\circ}\text{C}$. При низких температурных условиях культивирования интенсивность синтеза бактериоцина замедлялась.

Максимальный рост штамма и максимальная активность его бактериоцина были обнаружены при начальном значении рН среды 6,0, в котором эти численные значения достигали уровня 5,82 и 3800 ПЕ/мл, соответственно. Понижение или повышение стартового значения рН среды на 0,5 единиц приводило к редуцированию бактериоциновой активности на 26% (при рН 5,5) и 10,5% (при рН 6,5), соответственно.

Галактоза, глюкоза, лактоза и селлобиоза являлись подходящими источниками углерода для роста *E. faecium* S5. Однако в присутствии лактозы бактериоциновый титр был в 3,6 раза выше, чем с остальными тремя углеводами и составлял 1800 ПЕ/мл. Стимулирующий эффект лактозы продолжался до ее концентрации 0,7%. Титр бактериоцина при этом превышал стартового значения в 18 раз и достиг уровня 7200 ПЕ/мл.

В качестве органических источников азота были протестированы 5 различных вариантов – дрожжевой экстракт, мясной экстракт, казеин, триптон и пептон. Наиболее высокий титр бактериоцина (1400 ПЕ/мл) был обнаружен в M17 среде, в которой добавлен дрожжевой экстракт. Активность была почти в три раза больше, чем была обнаружена в присутствии триптона. Стимулирующий эффект этого источника азота продолжался до его концентрации 3%. При этом титр бактериоцина превышал стартового значения в более чем 6 раз и достиг уровня 4400 ПЕ/мл.

Добавление в среду культивирования MnSO_4 привело к повышению активности бактериоцина на 40%. Внесение тиамин, В12 и глицерина в M17L среду ингибировало бактериоциновой активности в культуре.

На основании этих параметров мы приготовили оптимальную питательную среду и культивировали в ней штамма *E. faecium* S5. В такой среде стационарная фаза роста наступила на два часа раньше, по сравнению с M17L средой, а титр бактериоцина достигал значение 52000 ПЕ/мл, что больше чем в 32,5 раза, наблюдаемого в супернатанте той же M17L среды.

Таким образом, процессы синтеза и секреции бактериоцина штамма *E. faecium* S5 строго зависят от условий культивирования и сос-

тава питательной среды, в том числе, от pH и температуры культивирования, углеродных и азотных источников и от их концентраций, а также плотности популяций, изначально вносимой в среду культивирования. Из за того, что в составе подобранной среды отсутствовали такие дорогие компоненты, как соевый, мясной и казеиновый пептоны, мясной экстракт, эти результаты имеют, кроме научного, также большое экономическое значение. Они позволяют значительно повысить выход бактериоцина и существенно сократить расходы на синтез этого ценного натурального консерванта.

Частичная очистка и электрофоретическое исследование бактериоцина штамма *E. faecium* S5

Очистку бактериоцина осуществляли по схеме, состоящей из трех этапов: 1 - катионообменная хроматография, 2 - препаративная обратнoфазовая хроматография и 3—обратнoфазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

Катионообменную хроматографию проводили с помощью колонки Streamline SP, при pH 7.0. Активные фракции были получены в виде трех пиков, которые появились при градиенте хлористого натрия 0.3 М/л и 1 М/л. Во фракции третьего пика, элюированная также в градиенте 1 М/л, была обнаружена незначительная активность. В собранных фракциях удельная активность антимикробного метаболита возросла в 69 раз.

Второй этап очистки был осуществлен методом препаративной ОФ-ВЭЖХ в колонке Source RPC 15. Антимикробной активностью обладали фракции 2 пиков, которые были элюированы при 60 % концентрации буфера Д, что указывает на строгую гидрофобность активных молекул. Проводимая на втором этапе очистка бактериоцина методом ОФ-ВЭЖХ приводила к повышению ее удельной активности в 2345 раз.

Третий финальный этап очистки энтероцина был осуществлен методом ОФ-ВЭЖХ в колонке RPNuc C₁₈ (рис. 3). На этой хроматограмме отчетливо видны две основные пики. Первый пик был элюирован на 15 мин при градиенте буфера Д равный 85%, а второй - более высокий пик появлялся на 16 мин при 96% градиенте буфера Д. Фракции были проверены на присутствие в них антимикробной активности. Была обнаружена у них строгая активность против клеток *L. brevis* F 1.14 (Рис.4).

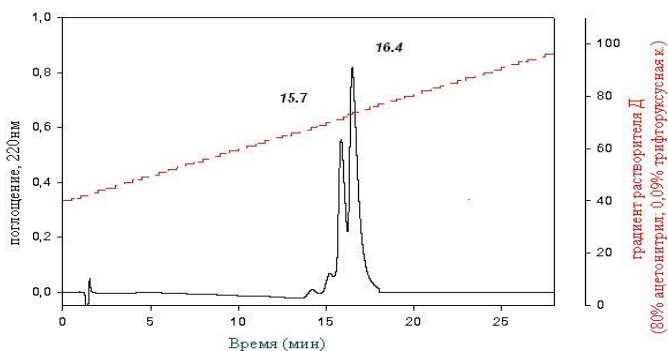


Рис. 3. Хроматограмма ОФ-ВЭЖХ энтероцина штамма *E faecium* S5. Элюция осуществлена на колонке RPNuc C₁₈ при линейном градиенте 40%-100% буфера Д



Рис. 4. Антимикробная активность собранных фракций при ОФ-ВЭЖХ энтероцина штамма *E. faecium* S5 (Пассивная культура - *L. brevis* F 1.14):

1. Фракции, собранные на 16 и 17 минутах;
2. Культуральная жидкость штамма *E. faecium* S5 (контроль);
3. 80% ацетонитрил с 0.09 % ТФК (Буфер Д);
4. 0.1% трифторуксусная кислота (Буфер С)

Таким образом, из культуральной жидкости штамма *E. faecium* S5 методами катионообменной и двухэтапной ОФ-ВЭЖХ выделены и очищены два энтероцина, которые обозначили как энтероцин S5-1 и S5-2. Степень очистки и выхода двух энтероцинов отличались друг от друга. Для S5-1 она была 1724 раза с выходом 16%. При этом удельная

активность данного энтероцина составила 358680 единиц. Аналогичные показатели энтероцина S5-2 составили 2305 раза, 56% и 479440 единиц, соответственно.

Электрофоретическое и масс-спектрометрическое исследования энтероцинов S5-1 и S5-2 штамма *E. faecium* S5

В следующей части этих экспериментов был проведен электрофоретический анализ очищенных энтероцинов. В ПААГ в каждой дорожке, соответствующей разным очищенным фракциям, присутствовала только одна четкая полоса, что указывает на достаточно высокую степень очистки активных фракций энтероцинов S5-1 и S5-2. В третьей дорожке, которая соответствовала смеси двух активных фракций, проявилась одна более жирная полоса. Молекулярные массы обеих белковых фракций были очень близки друг с другом и находились между полос маркерных белков с молекулярной массой 3,4 и 6,5 кДа.

В продолжении этой серии экспериментов обе активные фракции энтероцинов S5-1 и S5-2 штамма *E. faecium* S5, полученные при аналитической ОФ-ВЭЖХ, повторно пропустили через те же колонки при аналогичных условиях проведения хроматографии и исследовали масс спектрометром. Эти исследования показали, что молекулярная масса фракции 1 и фракции 2, равны 5219 Да и 5206 Да, соответственно. Значения молекулярных масс, полученных с помощью масс спектрометра, хорошо согласовались с теми, которые были выявлены методом электрофореза в ПААГ.

Для определения спектра ингибиторной активности этих индивидуальных пептидов нам потребовались дополнительные опыты. Они показали, что очистка энтероцинов благотворно влияла на спектр их антимикробной активности. Так, исходная культуральная жидкость штамма *E. faecium* S5 подавляла рост 16 из проверенных 28 тест культур. Тогда как, очистка этих пептидов расширила этот список до 23 пассивных штаммов. Судя по диаметру чистых зон на газоне, при очистке энтероцина наблюдалось также степень ингибирования роста различных пассивных культур в 2 или 3 раза.

Таким образом, выделенные нами из культуральной жидкости штамма *E. faecium* S5 оба энтероцины S5-1 и S5-2 обладали индивидуальными антимикробными активностями и проявляли синергетический эффект при совместном функционировании.

ВЫВОДЫ

1. Впервые в Азербайджане проведен широкомасштабный скрининг традиционных кисломолочных продуктов, изготовленных во всех экономических регионах страны, по поиску молочнокислых бактерий, обладающих бактериоциногенными свойствами. Из 107 образцов кисломолочных продуктов, приобретенных в 63 крупных городах 9 экономических регионов страны, были изолированы 5531 грамположительные и каталазаотрицательные штаммы. Из них у 1247 была обнаружена антимикробная активность против *L.bulgaricus* 340. При этом активность 784 штаммов была обусловлена присутствием органических кислот, 367 штаммов – перекиси водорода, 66 штаммов – бактериоцином.
2. Идентификация 66 бактериоциногенных штаммов МКБ с помощью современных биохимических и молекулярно-генетических методов показала, что 26 из них относятся к 13 видам рода *Lactobacillus*: *L. paracasei* spp. *Paracasei* (5 штаммов), *L. buchneri* (2), *L. pentosus* (2), *L. brevis* (2), *L. collinoides* (3), *L. curvatus* (4), *L. cake* (2), а также *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. fruktivorans*, и *L. helveticus* (по одному штамму каждого вида), остальные 40 штаммов - к пяти видам рода *Enterococcus*: *E. faecium* (18 штаммов), *E. faecalis* (6), *E. mundtii* (5), *E. hirae* (5) и *E. durans* (6).
3. Наиболее широким спектром антимикробной активности и, следовательно, большим прикладным потенциалом обладали 11 бактериоциногенных штаммов МКБ. Из 38 протестируемых пассивных культур в спектр их антимикробной активности вошли от 8 до 23 индикаторных штаммов, включая грамположительных (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* и *Listeria*), грамотрицательных (*Salmonella*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*) бактерий, а также микроскопических грибов (*Candida*, *Sachcaryomyces*, *Fusarium*). Остальные штаммы обладали узким спектром и тормозили рост от 1 до 7 пассивных штаммов.
4. Показано, что в присутствии детергентов и поверхностно-активных соединений, а также в пределах значений pH от 3.0 до 10.0, стабильность антимикробной активности изученных бактериоцинов не менялась. В целом, бактериоцины оказались термостабильными и сохраняли свою активность при нужных, для изготовления ферментированных продуктов, температурных значениях.
5. Установлено, что ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , казеин и лецитин угнетают, а ионы Mn^{2+} , пропил-парабен, пара-гидроксibenзойная кислота и слабые раст-

- воры хлористого натрия (до 3%) стимулируют антимикробную активность бактериоцинов. При этом индукционный эффект данных факторов зависли от их концентрации и от видовых принадлежностей штаммов пассивных культур.
6. Установлено, что ингибирующий эффект бактериоцинов на рост пассивных штаммов проявились в бактериостатической и бактерицидной формах. Выявлена связь между степенью адсорбции бактериоцинов на поверхность клеток пассивных культур и механизмом их действия. Повышенная адсорбция обуславливала бактерицидный механизм действия.
 7. Показано, что исследуемые штаммы МКБ устойчивы к кислым и щелочным значениям рН и к физиологическим концентрациям желчных кислот, что является одним из важных требований, предъявляемых к пробиотикам.
 8. Показано, что все изученные штаммы не обладали мультирезистентностью к антибиотикам и проявляли в разной степени чувствительность к пенициллину, ампициллину, эритромицину, хлорамфениколу и рифомицину, что создает предпосылку для использования этих штаммов в качестве пробиотиков.
 9. Установлено, что в геноме штаммов *E. faecium* M13 и J1-48 отсутствуют носители вирулентных факторов. В геноме двух штаммов *E. faecium* (Q1 и L8) обнаружен ген - *cylLs*, штамма *E. faecium* S5 – два гена, *cylLs* и *gelE*. В геноме штамм *E. faecales* Sh66 были обнаружены амплификанты четырех вирулентных генов – *ace*, *cylLs*, *cylM* и *efaAFs*.
 10. Подобраны оптимальные условия среды для синтеза и секреции бактериоцинов *E. faecium* S5, что позволило увеличить их продуктивность в 32,5 раза.
 11. Показано, что энтероцин выделенный из культуры *E. faecium* S5 имеет две полипептидной цепи с молекулярными массами 5219 Да и 5206 Да, каждой из которых обладает индивидуальной активностью. Совместно этот энтероцин имеет широкий спектр антимикробной активности по отношению грамположительных (*Listeria*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*) и грамотрицательных бактерий (*Escherichia*, *Pseudomonas*).

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Güləhmədov S. Q., Mehvəliyeva U. Z., Bayramova K. N., Mustafayeva R.S. Azərbaycanın Kür-Araz zonasında ənənəvi şoraba məhsullarından ayrılmış süd turşusu bakterialarının bakteriosid fəallığı / «Eksperimental biologiya və müasirlik» respublika elmi konfransının materialları, 29-30 aprel, Bakı, 2005, s.133-134
2. Güləhmədov S. Q., Mehvəliyeva U. Z., Bayramova K. N. Azərbaycanın Kür-Araz zonasında ənənəvi süd məhsullarından ayrılmış süd turşusu bakterialarının antimikrob fəallığının öyrənilməsi / «Eksperimental biologiya və müasirlik» respublika elmi konfransının materialları, 29-30 aprel, Bakı, 2005, s.134
3. Гюльяхмедов С. Г. Антибактериальная активность молочнокислых бактерий, выделенных из традиционных молочных продуктов Апшеронского полуострова Азербайджана // Вестник Бакинского Университета. Серия естественных наук, 2005, № 1, с.59-65
4. Гюльяхмедов С.Г., Алиева А. А., Кулиев А.А. Антимикробная активность вагинальных молочнокислых бактерий // Медицина, Биология, Химия., 2006, №4, с.33-40
5. 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 // European Food Research and Technology, 2006, № 224, p.p. 229-235
6. Гюльяхмедов С. Г., Омарова С. Н. Некоторые свойства бактериоциноподобного активного вещества, выделенного молочнокислой бактерией из квашенной капусты / Материалы научной конференции.: Научные успехи в Биологии, Баку, 2006, с.139-140
7. Омарова С. Н., Гюльяхмедов С. Г., Мустафаева Р. С. Молочнокислые бактерии ферментированных растительных продуктов как продуценты бактериоциноподобных антимикробных веществ / Материалы научной конференции.: Научные успехи в Биологии, Баку, 2006, с.140-141
8. Gulahmadov S. G., Alieva A. A. Effect of temperature, lyophilization, and pH on antimicrobial activity of vaginal *Lactobacillus salivarius* AA32 / Materials of conference.: Scientific achievements in Biology, Baku, 2006, p.p.141-142
9. Gulahmadov S. G., Abdullaeva N. F. Partially characterization of bacteriocinlike inhibitory substance *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei*

- BN ATS 5w* isolated from Azerbaijani hard white cheese / Materials of conference.: Scientific achievements in Biology, Baku, 2006, p.p.142-143
10. Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н. Ф., Мустафаева Р. С. Антибактериальная активность *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei BNATS 5w*, изолированного из Азербайджанского белого сыра / Материалы научной конференции.: Научные успехи в Биологии, Баку, 2006, с.143-144
 11. Абдуллаева Н. Ф., Мустафаева Р. С., Гюльяхмедов С. Г.. Электрофоретическое исследование БПИВ штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei BN ATS 5w*/ Материалы научной конференции.: Проблемы прикладной Биологии, Баку, 2007, с.22
 12. Nurzadə V. N., Əhmədova A. F., Abdullayeva N. F., Güləhmədov S. Q. Müxtəlif məhsullardan ayrılmış laktobasillərin müqayisəli tədqiqi / «Təbiiqi biologiyanın problemləri» elmi konfransının materialları, Bakı, 2007, s.23
 13. Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н. Ф. Подбор оптимальных условий для продуцирования бактериоцина штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei BNATS 5w* / Материалы 11-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых.: Биология наука XXI века, Пущино, 2007, с.26-27
 14. Gulahmadov S. G., Abdullaeva N. F., Kuliev A. A. Isolation and genotypic characterization of lactic acid bacteria from some Azerbaijani dairy products / Materials of III International Young Scientist conference: Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution, Odessa, 2007, p. 190
 15. Gulahmadov S. G., Dalgarrondo M., Chobert J.-M., Kuliev A.A., Abdullayeva N., Huseynova N., Haertlee T. *Lb. buchneri S2* - as a BLIS producing strain isolated from traditional Azerbaijani cheese / 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, 2007, p.p.329-330
 16. Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н. Ф., Алиева А. А., Гусейнова Н. Ф., Ахмедова А. Ф., Мустафаева Р. С., Кулиев А. А. Некоторые характеристики бактерио-циноподонного ингибирующего вещества (БПИВ) штамма *Lb. paracasei* spp. *Paracasei BN ATS 5w* / Межвузовский сборник научных трудов СНГ.: Современный мир, природа и человек, 2007, т. 4, № 3, с.81-85
 17. Гюльяхмедов С. Г. Биохимическая природа антимикробной активности штамма *Lactobacillus pentosus M13* / “Материалы международной

- конференции, посв. к 100-летию Акад. Гасана Алиева.: Экология: проблемы общества и природы, Баку, 2007, с.373-375
18. Гюльяхмедов С. Г. Антимикробная активность штамма *Enterococcus faecium* AZES2-48, изолированного из сыра «МОТАЛ» // Труды Института Ботаники НАН Азербайджана, 2008, т. XXVIII, с. 134-139
 19. Gulahmadov S. G., Mustafaeva R. S., Huseynova N. F. *Lb. pentosus* - as a BLIS-producing strain isolated from traditional Azerbaijani cheeses / Materials of International conference.: ELIAVA-2008. Phage Biology, Ecology and Therapy Meeting, June 12-15, 2008, Tbilisi, p.27
 20. Гюльяхмедов С.Г., Джалилова Т. А., Абдуллаева Н. Ф., Гусейнова Н. Ф., Мустафаева Р. С., Кулиев А. А. Изучение антибактериальной и фунгицидной активностей молочнокислых бактерий, изолированных из Азербайджанских сыров // Вестник Бакинского Университета. Серия естественных наук, 2008, №2, с.62-70
 21. Абдуллаева Н.Ф., Гюльяхмедов С. Г., Зульфугарова А. Г. Особенности бактериоциноподобного ингибирующего вещества (БПИВ) штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5w / Материалы VIII международной конференции.: “Интрадукция нетрадиционных и редких растений, Мичуринск, 8-12 июня 2008, т.3, с.9-11
 22. Гюльяхмедов С. Г. Новый взгляд на системы классификации энтероцинов (Обзорная статья) // Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана, 2008, т. VI, с.275-294
 23. Gulahmedov S., Ivanova, I., Kirilov, N., Iliev, N. Danova, S. T., Dimov, Husseinova, N., Sitohy, S. M., Akhmad, A. N., Kuliev, K. I. A., Dalgalarondo, M., Chobert, J. M., Haertlé, T. Proteolytic Activities of the Selected LAB Strains from Balkans, Caucasus, Iraq and Egypt / Ninth symposium on lactic acid bacteria: health, evolution and systems biology, August 31 - September 5, 2008, Egmond aan Zee, The Netherlands, D064
 24. Абдуллаева Н.Ф., Гюльяхмедов С.Г., Кулиев А.А. Термоза-висимость биосинтеза и секреции бактериоцина штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei* BN ATS 5w // Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана, 2008, т. VI, с.209-213
 25. Гюльяхмедов С. Г., Гусейнова Н. Ф., Абдуллаева Н. Ф. Антимикробная и протеолитическая активности штамма *Enterococcus faecium* S5, изолированного из сыра / Сборник материалов международной научно-практической конференции.: Актуальные проблемы биоэкологии, МГОУ, Москва, 21-24 октября 2008, с.147-150

26. Terzic-Vidojevic A., Vukasinovic M., Tolinacki M., Nikolic M., Lozo J., Begovic J., Gulahmadov S. G., Kuliev A. A., Dalgalarondo M., Chobert J-M., Haertlé T., Topisirovic L. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria from homemade Azerbaijani dairy products // African Journal of Biotechnology, 2009, v. 8, No11, p.p. 2576-2588
27. Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н. А., Мустафаева Р. С., Джалилова Т. А. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* AZEJ2-89 – бактериоциногенный штамм молочнокислых бактерий / Материалы конференции, посвященной 90 летнему юбилею БГУ.: Научные успехи в Биологии, 22-23 мая 2009, Баку, с.124
28. Абдуллаева Н. Ф., Гамидова К. М., Зульфугарова А. Г., Гюльяхмедов С. Г. Бактериоциногенез штамма *Enterococcus faecium* AZES2-48 / Материалы конференции, посвященной 90 летнему юбилею БГУ.: Научные успехи в Биологии, 22-23 мая 2009, Баку, с.58
29. Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н. А., Гусейнова Н. Ф., Гамидова К. М. Влияние температуры на рост и секреции бактериоцина штамма *Enterococcus faecium* S5 // Труды Института Ботаники НАН Азербайджана, 2009, т. XXIX, с.638-643
30. Gulahmadov S. G., Kuliev A., Abdullaeva N., Ahmedova A., Dalgalarondo M., Chobert J-M., Haertle T. 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, june, 17-19 (in Book of Abstracts, edited by D. Drider and H. Prevost) 2009, p.107, poster 01-NSP
31. Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н. Ф., Мустафаева Р. С., Абдуллаева Н. А. Влияния компонентов среды на антимикробную активность бактериоциноподобного ингибирующего вещества (БПИВ) штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *Paracasei* BNATS 5w в модельных опытах // Доклады НАН Азербайджана, 2009, т. LXV, №4, с.147-153
32. Gulahmadov S. G., Abdullaeva N. F., Guseynova N. F., Ivanova I. V., Kuliev A. A., Dalgalarondo M., Chobert J-M. and T. Haertle. Isolation and Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from Azerbaijani cheeses // Applied Biochemistry and Microbiology, 2009, v.45, №3, p.p. 297-303
33. Гусейнова Н. Ф., Гюльяхмедов С. Г., Ахмедова А. Ф., Кулиев А. А. Частичная очистка и характеристика бактериоцина штамма

- Enterococcus faecium* S5, изолированного из Азербайджанского сыра // Доклады НАН Азербайджана, 2009, т.LXV, №5, с.95-103
- 34.Гюльяхмедов С. Г., Гусейнова Н. Ф., Кулиев А. А. Влияние некоторых физико-химических факторов на активность бактериоцина штамма *Enterococcus faecium* S5 // Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана, 2009, т.VII, с.132-136
 - 35.Гюльяхмедов С. Г., Кошкизаде Н., Мустафаева Р. С. Влияние ферментов на антимикробную активность проказеина 8w / Biologiyada elmi nailiyyətlər mövzusunda respublika elmi konfransının materialları. Bakı, 22-23 aprel 2010, s.393
 - 36.Гюльяхмедов С. Г. Влияние экологических факторов на активность энтероцина штамма *Enterococcus faecium* AZES2-48 // Труды Института Ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, 2010, т. XXX, с.332-337
 - 37.Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н. А., Гусейнова Н. Ф., Мирхадизаде Т. Б. Влияние некоторых физико-химических факторов на антимикробную активность энтероцина Q12 / Международная научно-практическая конференция.: Актуальные проблемы биоэкологии, Москва, 26-28 октябрь 2010, с.63
 - 38.Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н. А., Мирхадизаде Т. Б., Кошкизаде Е. Н., Кулиев А. А. Особенности бактериоциноподобного ингибирующего вещества (БПИВ) штамма *Enterococcus faecium* Q1 // Вестник Бакинского Университета. Серия естественных наук, 2010, №2, с.71-77
 - 39.Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н. А., Гусейнова Н. Ф., Исмаилова Л. И., Кулиев А. А. Влияние двухвалентных катионов на антимикробную активности бактериоцинов молочнокислых бактерий, изолированных из Азербайджанских сыров // Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана, 2010, т.VIII, с.120-124
 - 40.Гюльяхмедов С. Г., Гусейнова Н. Ф., Абдуллаева Н. А., Кулиев А. А. Влияние лецитина и казеина на спектр антимикробной активности бактериоцинов молочнокислых бактерий, изолированных из Азербайджанских сыров // Вестник Днепропетровского Университета, 2011, т.19, № 7.1, с.31-35
 - 41.Гюльяхмедов С. Г., Н. Ф. Гусейнова, Н. А. Абдуллаева, А. А. Кулиев. Влияние хлористого натрия, пара – гидроксibenзойной кислоты и пропил-парабена на спектр антимикробной активности бактериоцинов

- молочнокислых бактерий, изолированных из Азербайджанских сыров // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки», 2011, № 2, с.21-25
42. Güləhmədov S.Q., Quliev A.Ə., Abdullaeva N.A. Bakteriosinlərin pendirlərdə biogen aminlərin toplanma dinamikasına təsiri // AMEA-nın Botanika İnstitutunun əsərləri, 2011, XXXI cild, s.355-359
 43. Ахмедова А. Ф., Гюльахмедов С. Г., Кулиев А. А. Влияние различных факторов на протелитическую активность штамма *Enterococcus faecium* ANI // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки», 2011, № 3. с.17-21
 44. Гюльахмедов С. Г. Прикладные перспективы бактериоциногенных молочнокислых бактерий (Обзорная статья) // Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана, 2011, т.IX, № 2, с.106-117
 45. Абдуллаева Н. Ф., Гюльахмедов С. Г., Кулиев А. А. Изучение влияния рН среды на синтез бактериоциноподобного ингибирующего вещества и динамику роста штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 5w // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки», 2012, № 1, с.10-15
 46. Кулиев А. А., Гюльахмедов С. Г. Биохимическая и генетическая характеристики энтероцина, продукта штамма *Enterococcus faecium* M13 // Вестник Бакинского Университета. Серия естественных наук, 2014, №1, с.49-60
 47. Гюльахмедов С. Г., Абдуллаева Н. А. Ахмедова А. Н. Антимикробные свойства штамма *Lactobacillus delbrueckii* BQ 1.16 – продуцента перекиси водорода // Г. Алиев - 91. Материалы научной конференции.: Актуальные проблемы современной химии и биологии, т.1, Гянджа, 12-13 мая 2014, с.189-192
 48. Гюльахмедов С. Г., Абдуллаева Н. А. Оптимизация продуцирования энтероцина штамма *Enterococcus faecium* M13, изолированного из азербайджанского сыра // Журнал Гафгазского Университета. Серия Химия и Биология, 2014, т.2, №1, с.35-39
 49. Гюльахмедов С. Г., Абдуллаева Н. А., Абдуллаева Н. Ф., Кулиев А. А. Сравнительное изучение периферических белков для идентификации молочнокислых бактерий // Вестник Бакинского Университета. Серия естественных наук, 2014, №3, с.56-61
 50. Гюльахмедов С. Г. Влияние антибиотиков на рост бактериоциногенных штаммов молочнокислых бактерий, изолированных из кисломолочных продуктов Азербайджана / Материалы научной конференции, посвященной к 85-летию юбилею создания Биологического факультета БГУ, Баку, 19-20 декабря 2014, с.64-65

51. Меликова Н. Р., Мустафаева Р. С., Абдуллаева Н. А., Магеррамова К. Р., Гюльяхмедов С. Г. Пропил-парабен как стимулятор антимикробной активности энтероцина AZES2-48 / Материалы международной конференции.: Инновационные проблемы современной Биологии, Баку, 2014, с.78-79
52. Гюльяхмедов С. Г. Чувствительность штаммов молочнокислых бактерий изолированных из кисломолочных продуктов Азербайджана к антибиотикам // Вестник Бакинского Университета. Серия естественных наук, 2015, №1, с. 87-94
53. Гюльяхмедов С.Г., Абдуллаева Н.А. Влияние условия культивирования на рост и синтез бактериоцина штамма *Enterococcus faecium* S5 // Вестник Бакинского Университета. Серия естественных наук, 2015, №2, с. 78-87

Saib Qurban oğlu Güləhmədov

Azərbaycanın süd turşusu bakteriyalarının antimikrob xassəli metabolitləri və onların praktiki əhəmiyyəti

Dissertasiya işi Azərbaycanın bütün iqtisadi regionlarında (Yuxarı Qarabağ istisna olmaqla) ev şəraitində ənənəvi üsullarla istehsal edilmiş turşsüd məhsullarının tərkibində bakteriosinogen, probiotik və digər biotexnoloji əhəmiyyət kəsb edən xassələrə malik STB ştamlarının geniş miqyaslı skrininginə və onların antimikrob təbiətli metabolitlərinin, xüsusən bakteriosinlərinin tədqiqinə və praktikada tətbiqinin mümkünlüyünün təhlilinə həsr olunmuşdur. Skrining replika üsulu ilə həyata keçirilmiş, ştamların antimikrob xassələri isə diffusiya üsulu ilə müəyyən edilmişdir. 9 iqtisadi regionu əhatə edən 63 iri yaşayış məntəqələrindən əldə edilmiş 107 turşsüd məhsulu nümunələrindən 5531 STB izolə edilmiş və onların 1247-sində *L.bulgaricus* 340 ştamına qarşı antimikrob fəallıq aşkar edilmişdir. Fəal STB ştamlarının 784-də antimikrob xassə üzvü turşuların, 367-də H₂O₂ – in, 66-da isə bakteriosinlərin hesabına formalaşmışdır.

API-test, rep-PSR və 16SrDNT sekvensiya üsulları ilə 66 bakteriosinogen STB ştamları identifikasiya edilmiş, *Lactobacillus* cinsinə aid 13 növ və *Enterococcus* cinsinə aid 5 növ aşkar edilmişdir. Onların arasından ən geniş antimikrob fəallıq spektrinə malik 11 bakteriosinogen ştam seçilmişdir. Ən fəal *Enterococcus faecium* S5 ştamı 38 indikator mikroorqanizmlərdən aralarında *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* cinsli bakteriyaları və *Candida*, *Sachcaromyces*, *Fusarium* cinsli maya və kif göbələkləri olmaqla 23-nə qarşı fəal olmuşdur.

Həmin ştamın bakteriosin sintezini stimullaşdıran mühit amilləri optimallaşdırılmış və nəticədə bakteriosin titrinin 32,5 dəfə artmasına nail olunmuşdur. Müəyyən edilmişdir ki, *E. faecium* S5 ştamı molekul kütlələri 5219 Da və 5206 Da olan və hər biri fərdi fəallığa malik olan, lakin birlikdə sinergizm nümayiş etdirən iki müxtəlif polipeptiddən ibarət bakteriosin sintez edir.

Fəal ştamların bakteriosinləri detergent və səthi-fəal birləşmələrə qarşı, pH-ın 3-10 qiymətlərində davamlı olmuş və ümumən termostabillik nümayiş etdirmişlər. Onların fəallığına Ca²⁺ və Mg²⁺ ionları, kazein və lesitin mənfi, Mn²⁺, propil-paraben, *p*-hidroksibenzoy turşusu və NaCl (3%-ə qədər) müsbət təsir etmişlər. Produsent ştamlar müxtəlif dərəcədə turş və qələvi

mühitlərə, öd turşusunun fizioloji qatılığına qarşı davamlı, penisillin, ampisillin, eritromisin, xloramfenikol və rifomisinə qarşı həssas olmuşlar. *E. faecium* növünə aid M13 və J1-48 ştamlarının genomunda virulent amillər tapılmamış, Q1 və L8 ştamlarında *cylLs* geni, S5- də *cylLs* və *gelE* genləri, *E. faecales* Sh66 ştamında isə 4 virulent gen - *ace*, *cylLs*, *cylM* və *efaAFs* aşkar edilmişdir.

Aşkar edilmiş faktlara əsasən qərarlaşdırılmışdır ki, izolə edilmiş bakteriosinogen STB ştamları və onların bakteriosinləri öz fərdi xassələrinə uyğun olaraq yeyinti sənayesində ərzaq məhsullarının təhlükəsizliyi və biomühafizəsi üçün və tibbdə probiotik kimi, həmçinin antimikrob xassəli dərman preparatlarının hazırlanması üçün geniş tətbiq perspektivlərinə malikdirlər.

Saib Qurban Gulahmadov
**Metabolites with antimicrobial properties of Azerbaijani lactic acid
bacteria and their practical importance**

The dissertation has been devoted to conduct a large-scale screening of lactic acid bacteria (LAB) strains in the traditional dairy products from all economic regions of Azerbaijan (excluding the Nagorni Karabakh), giving bacteriosinogenic, probiotic and other useful in biotechnology properties, as well as the study of their metabolites with antimicrobial properties, especially bacteriocins and their possible practical application. Screening was carried out by the replika method and the antimicrobial properties of active strains – by agar-well diffusion method. From the 107 samples of dairy products purchased in 63 major cities 9 economic regions of the country were isolated 5531 gram-positive and catalase-negative strains. Of these, 1247 were detected antimicrobial activity against *L.bulgaricus* 340. The activity of 784 strains due to the presence of organic acids, 367 strains - hydrogen peroxide, and 66 strains - bacteriocin-like inhibitory substances.

By the methods API-test, rap-PSR and 16SrDNT sequence 66 bakterio-cinogenic LAB strains were identified and have been found, that 13 species belonging to the genus *Lactobacillus* and 5 species belonging to the genus *Enterococcus*. From them 11 strains with broad spectrum of antimicrobial activity were selected. The most active strain *Enterococcus faecium* S5 was active against 24 indicator strains, including Gram-positive (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Listeria*), Gram-negative (*Salmonella*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*) bacteria and microscopic fungi (*Candida*, *Sachcaromyces*, *Fusarium*) from all 38 passive test cultures.

The environmental conditions for the synthesis and secretion of bacteriocin of *E. faecium* S5 were optimaized and in this conditions their productivity increased in 32.5 times. It was determined that *E. faecium* S5 synthesis two different chains bakteriosin with the molecular masses 5219 D and 5206 D, each of which is also active in the individual, but together demonstrating the synergies.

Bacteriocins of the active strains were thermally stable and sustainable impact of detergents and surface active compounds. Ions Ca^{2+} and Mg^{2+} , casein and lecithin inhibited their activity and Mn^{2+} , propyl paraben, parahydroxybenzoic acid and sodium chloride (up to 3%) stimulate it. Producing strains were in varying degrees resistant to influence of acid and

alkaline environments and physiological concentrations of bile salts. However, penicillin, ampicillin, erythromycin, chloramphenicol and rifomitsin inhibited the growth of these strains. In the chromosomes of *E. faecium* strains M13 and J1-48 were not detected virulence genes. At strains Q1 and L8 it was discovered gene *cylLs*, at the S5 – two virulence genes - *cylLs* and *gelE*, and in the chromosome *E. faecales* Sh66 4 virulence genes - *ace*, *cylLs*, *cylM* and *efaAFs* were found.

It was established that the isolated bacteriocinogenic LAB strains and their bacteriocins according to their individual properties have broad application prospects in the food industry for food safety and biosecurity, as well as probiotics in medicine and for the manufacture of antimicrobial drugs.

AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI

MİKROBİOLOGİYA İNSTİTUTU

Əlyazması hüququnda

SAİB QURBAN OĞLU GÜLƏHMƏDOV

**AZƏRBAYCANIN SÜD TURŞUSU BAKTERİYALARININ
ANTİMİKROB XASSƏLİ METABOLİTLƏRİ VƏ ONLARIN
PRAKTİKİ ƏHƏMİYYƏTİ**

2422.01 - Biotexnologiya

Biologiya üzrə elmlər doktoru alimlik dərəcəsi
almaq üçün təqim edilmiş dissertasiyanın

A V T O R E F E R A T I

BAKİ – 2016

46