

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ**

На правах рукописи

НИГЯР ФАИК ГЫЗЫ ГУСЕЙНОВА

**БИОХИМИЧЕСКИЕ И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА
ЭНТЕРОЦИНА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ МОЛОЧНОКИСЛЫХ
БАКТЕРИЙ РОДА *ENTEROCOCCUS***

2406.02 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени доктора
философии по биологии**

Баку – 2015

**Работа выполнена на кафедре Биохимии и биотехнологии
Бакинского Государственного Университета и в
Национальном Институте Агрономических Исследований
(Нант, Франция).**

Научный руководитель: заслуженный деятель науки,
доктор биологических наук,
профессор **А.А.Кулиев**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор **Х.Г. Ганбаров**

доктор биологических наук,
профессор **С.Ю.Сулейманов**

Ведущая организация: **Азербайджанский
медицинский университет,
кафедра биохимии**

Защита состоится "09__" __09_____2015 г. в__ часов на за-
седании Диссертационного Совета D.01.061 при Институте Бота-
ники НАН Азербайджана

Адрес: AZ 1073, г. Баку, Бадамдарское шоссе 40

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Бо-
таники НАН Азербайджана

Автореферат разослан " __ " _____ 2015 г.

**Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
Доктор биологических наук,
профессор**

С.Д. ИБАДУЛЛАЕВА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Молочнокислые бактерии (МКБ), как и многие другие микроорганизмы, используются людьми в повседневной жизни с древних времен. Они состоят из группы бактерий, имеющих общие морфологические, метаболические и физиологические характеристики. Это—грамположительные, не образующие спор, анаэробные кокки или палочки, которые производят молочную кислоту как основной конечный продукт брожения углеводов (Salminen et al., 2004).

На основе использования молочнокислых бактерий возникли крупные отрасли народного хозяйства. В молочной промышленности с помощью этих организмов получают целый ряд кисломолочных продуктов, в сельском хозяйстве изготавливают силос- сочный и энергетически ценный корм для животных. Молочнокислые бактерии широко применяются и как безопасные и натуральные консерванты пищевых продуктов, сохранность которых является одной из насущных задач пищевой промышленности. Это свойство молочнокислых бактерий связано с их антагонизмом с гнилостными и патогенными бактериями. Известно, что антагонистическое свойство молочнокислых бактерий связано с образованием ими таких метаболитов, как молочная кислота, перекись водорода и антибиотические вещества разной природы (Salminen et al., 2004).

В последние десятилетия большое внимание уделяется изучению продуцирования молочнокислыми бактериями антимикробных метаболитов. К таким метаболитам, прежде всего, относятся бактериоцины и бактериоциноподобные вещества, которые находятся в центре внимания многих исследований, ввиду возможного их применения в качестве натуральных пищевых консервантов и для приготовления новых антимикробных лекарственных препаратов (Jack et al., 1995; Parente, Ricciard, 1999).

Поиск природных консервантов, отвечающих требованиям потребителей и производителей, – актуальный вопрос и для нашей республики. Однако, исследования бактериоцинов, проводимые в Азербайджане, крайне немногочисленны и отстают от требований сегодняшнего дня, касающихся повышения качества и сохранности пищевых продуктов. Поэтому вопросы поиска и изучения свойств новых штаммов-продуцентов бактериоцинов молочнокислых бактерий, перспективных для создания медицинских препара-

тов и использования в пищевой промышленности, а также подбор питательных сред и оптимальных условий их культивирования для синтеза бактериоцинов все еще остаются актуальными и требуют своего решения.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение биохимических и антимикробных свойств энтероцина, полученного из молочнокислых бактерий рода *Enterococcus*.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- Выделение штаммов молочнокислых бактерий рода *Enterococcus* из молочных продуктов домашнего приготовления;
- Изучение антимикробной активности выделенных штаммов молочнокислых бактерий рода *Enterococcus* и отбор активных штаммов;
- Идентификация штаммов молочнокислых энтерококков, обладающих высокой антимикробной активностью;
- Выделение энтероцина (как антимикробного агента) из активного штамма энтерококка;
- Изучение биохимических и антимикробных свойств выделенного энтероцина;
- Подбор питательных сред и условий культивирования МКБ рода *Enterococcus* для оптимального продуцирования бактериоцинов.

Научная новизна работы. Впервые проведен скрининг бактериоцинообразующих штаммов мезофильных молочнокислых бактерий рода *Enterococcus*, полученных из сыров и айрана, изготавливаемых в разных районах Азербайджана. Выделены штаммы бактерий, обладающие высокой антимикробной активностью, которые идентифицированы как *Enterococcus faecium* S5. Разработана схема выделения и очистки энтероцина, синтезируемого штаммом *Enterococcus faecium* S5. Получены его индивидуальные компоненты в хроматографически чистом виде и изучены их свойства.

Установлено, что энтероцин, синтезируемый штаммом *Enterococcus faecium* S5, состоит из двух компонентов, каждый из которых в отдельности имеет свой спектр активности, и совместно проявляют синергизм.

Показано, что очищенный энтероцин проявляет устойчи-

вость в широком диапазоне кислотности среды и температуры. Двухвалентные катионы и лецитин полностью подавляют, а эфиры п-оксибензойной кислоты и NaCl (0,1%), наоборот, стимулируют антимикробную активность энтероцина.

Практическая значимость работы. Отобранные и изученные штаммы молочнокислых бактерий рода *Enterococcus* могут быть использованы в качестве продуцентов энтероцина и других бактериоциноподобных веществ, ингибирующих рост и развитие патогенных бактерий, вызывающих порчу пищевых продуктов.

Методы, использованные в работе, рекомендуются для применения в лабораториях, занимающихся выделением и очисткой бактериоциноподобных веществ с целью применения их в пищевой промышленности, медицине, ветеринарии в качестве антимикробных агентов против гнилостных и болезнетворных бактерий.

Апробация работы. Разделы диссертационной работы обсуждались на 3-м Международном симпозиуме «3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis» (Прага, Чехия, 2007), на Международной конференции «ELIAVA-2008» (Грузия, Тбилиси, 2008), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биоэкологии» (МГОУ, Москва, 2008), Международном симпозиуме «Ninth symposium on lactic acid bacteria: health, evolution and systems biology» (Эгмонд-анд-Зее, Нидерланды, 2008) и на 2-й Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биоэкологии» (Москва, 2010).

Публикации. Основные положения диссертации отражены в 16 публикациях, из них 10 статьи и 6 тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 4-х глав (обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов и их обсуждения), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 136 страницах компьютерного текста, включая 18 рисунков и 16 таблиц. Библиография включает 157 литературных источников отечественных и зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы включает общую характеристику энтерококков и молочнокислых бактерий рода *Enterococcus*, их морфологические, метаболические и физиологические особенности, систематику, значение в природе и жизни человека и применение в различных отраслях народного хозяйства. Подробно изложены физико-химические и биологические свойства антимикробных метаболитов– бактериоцинов (энтероцинов), продуцируемых энтерококками, дана классификация энтероцинов и характеристика их основных представителей. Рассмотрено прикладное значение энтероцинов в пищевой промышленности, медицине и сельскохозяйственном производстве.

Объекты и методы исследования. Штаммы МКБ, использованные в данной работе, были выделены из пяти видов молочнокислых продуктов: двух образцов айрана и трех разных сырных изделий. Скрининг энтерококков, продуцирующих энтероцины, проводили в кисломолочных продуктах, изготовленных в разных регионах Азербайджана и отличающихся между собою технологией приготовления.

Фенотипическая идентификация выделенных изолятов проводилась согласно стандартным микробиологическим методам, включающим микроскопические исследования морфологии клеток, окрашивание по Граму и тест на продукцию каталазы (Klaenhammer, 2002).

Для изучения антимикробной активности изолированных штаммов и активных компонентов в зависимости от цели и этапа исследований в данной работе использовали два метода: диффузно-луночный метод и метод диффузии в агар. Определяли кинетику продуцирования энтероцина при различных температурах, в присутствии 6.5 % NaCl и при pH 9.6. Изучалось также влияние различных физико-химических факторов, в том числе и протеолитических ферментов, на активность антибактериальных агентов (Lozo et al., 2004).

Очистку энтероцина осуществляли методами хроматографии. При этом использовали схему, состоящую из трех ступеней: катионообменная хроматография (КХ), препаративная обратнo-фазная хроматография (ОФХ) и обратнo-фазная высокоэффектив-

ная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Все фракции собирались с помощью автоматического коллектора (Batdorf et al., 2006).

Количественное определение белка осуществлялось спектрофотометрически с помощью бицинхониновой кислоты. Молекулярная масса энтероцина определялась методом электрофореза в ПААГе (Blum et al., 1987). Для определения молекулярной массы энтероцина в качестве белков-стандартов использовали маркерные белки с низкими молекулярными массами (от 1.06 до 26.60 кДа) (BioRad).

При обнаружении антимикробной активности в геле после электрофореза его делили на две равные части. Для определения молекулярной массы первая часть геля, содержащая полосы с белками-маркерами, окрашивалась ионами серебра по стандартному протоколу и с соблюдением последовательности процедур. Денситометрический анализ осуществляли по программе Quantity One (BioRad). Вторую часть геля промывали дистиллированной водой в течение 3 часов, затем перекладывали в чашку Петри и покрывали тонким слоем мягкого GM17-агара, засеянного клетками *L.brevis* F 1.14.

Масс-спектры выделенных пептидов регистрировали на приборе LCQ Advantage (Thermo-Finnigan, San Jose, USA) методом MALDI – TOF в режиме положительных ионов на матрице – DHB (2,5дигидробензойная кислота). С целью обеспечения наивысшей чистоты исследуемого образца масс-спектрометр был соединен с высокоэффективным жидкостным хроматографом (Waters 616 (насос) и Waters 600 (контрольная система)).

Наиболее активные штаммы идентифицировали до видовой принадлежности молекулярными и генетическими методами. ДНК энтерококков изолировали и очищали по методу Hopwood (1985). Для *rep*-ПЦР (repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction) анализа и секвенирования 16S рДНК области генома молочнокислых бактерий использовали *Taq* ДНК полимеразного кита (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania), при участии праймеров 5'-fD1 (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') и 3'-rD1 (3'-GCGTGTGTACAAGACCC-5'), при оптимальных для каждого праймера условиях ПЦР-программы (Weisburg et al. 1991). Реакции проводили в термальном циклере Gene Amp^R PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Все исследования проводились в 3-х повторностях, полученные результаты обрабатывались статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение чистых культур бактерий рода *Enterococcus* с антимикробной активностью из спонтанных кисломолочных продуктов. В опытах использовались пять видов кисломолочных продуктов: два образца айрана и три разных сырных изделия, полученных из центральных и юго-восточных регионов Азербайджана, в частности, образцы айрана и 1 вид сыра, изготовленные в Сабирабадском районе, два других образца сыра – в Масаллинском и Лерикском районах. Скрининг бактериоциногенных молочнокислых бактерий осуществлялся в коккообразных бактериальных штаммах.

Из трех образцов кисломолочных продуктов, приобретенных в Сабирабаде, в общей сложности выделены 24 колонии бактерий коккообразной формы: 7 из них изолированы из первого образца айрана, 9 – из второго образца айрана и 8- из сыра. Именно эти колонии стали объектами дальнейших исследований.

Скрининг бактериоциногенных энтерококков в следующих сырных образцах был осуществлен, как и в предыдущих образцах. Из сырных образцов Лерикского района выделены 56 штаммов бактерий, 11 штаммов из которых образовывали чистую зону в газоне тест-культуры. Иными словами, 11 колоний коккообразных бактерий обладали антибактериальной активностью.

2. Идентификация выделенных штаммов, обладающих антимикробной активностью. Следующая серия экспериментов была посвящена фенотипической идентификации 8 изолированных бактериоциногенных штаммов молочнокислых бактерий. Все изолированные штаммы обладали схожими морфологическими свойствами: имели шарообразную (кокковую) форму, были неподвижными и не образовывали спор. По своему окрашиванию оказались грамположительными. Каталазу и оксидазу не синтезировали. Обнаружили рост в присутствии 6.5% раствора NaCl и при исходной кислотности среды, равной pH 9,6. Эти штаммы росли при температуре 15°C, 30°C, 37°C и 45°C, не образовали газ (не сбра-

живали) из глюкозы и свертывали молоко. После длительного (ночного) культивирования кислотность питательного бульона снижалась до pH от 4.22 до 4.52. Все эти свойства изолированных штаммов дают возможность идентифицировать их как бактерии, относящиеся к роду *Enterococcus*.

3. Отношение штаммов МКБ к углеводам. Полученные нами результаты, касающиеся отношения штаммов молочнокислых бактерий к углеводам, согласуются с литературными данными, подтверждающими, что глюкоза является наиболее потребляемым углеводом, а гексозы потребляются легче и быстрее, чем пентозы (Стоянова, 2006). Также имеются сведения о способности определенных видов дрожжей использовать только свойственные для них углеводы (Ганбаров, 2005).

Показано, что наилучший рост исследованных нами штаммов МКБ (с некоторыми различиями) отмечается при потреблении глюкозы, фруктозы, сахарозы, галактозы и инулина, некоторые штаммы хорошо используют и раффинозу. Кроме того, все испытанные штаммы хорошо использовали лактозу, но не были способны утилизировать мальтозу.

4. Очистка и электрофоретическое исследование энтероцина молочнокислой бактерии *Enterococcus faecium* штамм S5. Оптимизировав условия продуцирования бактериоцина, далее мы задались целью получения высокоочищенного энтероцина исследуемого штамма. Для этого использовали трехэтапную схему хроматографирования: катионообменную хроматографию на Streamline SP колонке, препаративную обратнофазную хроматографию (Poros R1), обратнофазную высокоэффективную жидкостную хроматографию (RP-HPLC, column 18). На первом этапе стерильную культуральную жидкость пропустили через колонки катионообменной хроматографии на Streamline SP при pH 7.0 (табл 1). Собранные на этом этапе активные фракции катионообменной хроматографии были нанесены на обратнофазовую высокоэффективную жидкостно-хроматографическую Source RPC 15 – колонку.

Выявлено, что антимикробной активностью обладают фракции, элюируемые 70% буфером Д (80% ацетонитрил, 0,09% трифторуксусная кислота) что указывает на строгую гидрофобность молекул бактериоцина. На втором этапе очистки с помощью высокоэффективной жидкостной обратнофазной хроматографии специ-

фическая активность энтероцина была более чем в 2300 раза выше по сравнению с активностью активного штамма в культуральной жидкости. Следует отметить, что из 500 мл исходной культуральной жидкости, используемой для очистки, было получено 1,6 мг энтероцина.

Хроматограмма третьего финального этапа очистки энтероцина, осуществленного методом высокоэффективной жидкостной обратнофазной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на колонке RPNuc C₁₈, показала присутствие двух основных пиков: первый, сравнительно слабый пик, был элюирован при градиенте буфера Д, равном 85%.; второй, более высокий пик, появлялся при 96% градиенте буфера Д. Эти пики появились на хроматограмме через 15,7 мин и 16,4 мин, соответственно. Хроматограмма представлена на рис.1.

Из рисунка видно, что непосредственно перед элюцией главных пиков обнаруживаются еще два едва заметных пика. Фракции этих малых пиков в наших экспериментах не обладали антимикробной активностью. Фракции, соответствующие главным пикам, собирали отдельно и подвергали повторной хроматографии в тех же условиях. Данную процедуру проводили для подтверждения чистоты собранных фракций (результаты не показаны). Таким образом, из культуральной жидкости штамма *Enterococcus faecium* S5 методами катионообменной и двухэтапной обратнофазной хроматографии выделены и очищены два энтероцина.

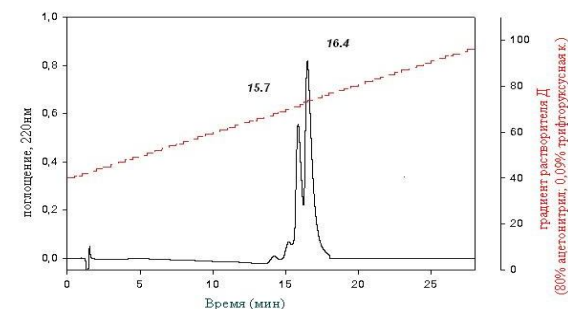


Рис. 1. Высокоэффективная жидкостная обратнофазная хроматограмма (ОФ-ВЭЖХ) энтероцина, продуцируемого *Enterococcus faecium* S5. Элюция осуществлена на колонке C₁₈ с линейным градиентом 40%-100% буфера Д.

Таблица 1. Очистка энтероцина, продуцируемого штаммом *Enterococcus faecium* S5

Этапы очистки	Объём фракции (мл)	Общее количество белка (мг)	Общая активность (ПЕ)	Удельная активность (ПЕ/мг белка)	Степень очистки (x)	Выход (%)
Культуральная жидкость	500	4416	92x10 ⁴	208	1	100
Катионообменная хроматография	200	116	167x10 ⁴	14396	69	181
Обратнофазная хроматография, RPC 15	60	1,64	80x10 ⁴	487804	2345	86
Обратнофазная высокоэффективная жидкостная хроматография, C ₁₈						
Фракция 1	1	0,42	15,1x10 ⁴	358680	1724	16
Фракция 2	1	1,08	51,7x10 ⁴	479440	2305	56

В последующих экспериментах обе указанные фракции энтероцинов, полученные путем высокоэффективной жидкостной обратнофазной хроматографии C₁₈, были проанализированы с помощью ДС-Na-ПААГ электрофореза для обнаружения их активности непосредственно в геле. Результаты этих исследований

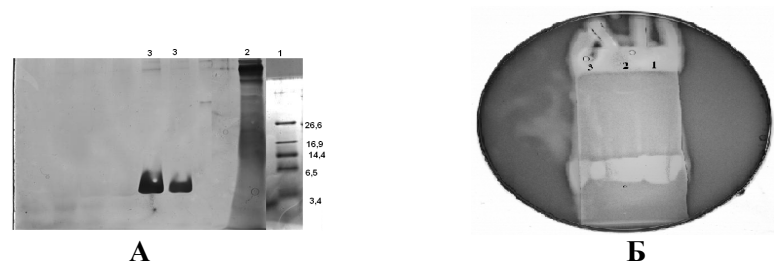


Рис. 2. ДС-Na-ПААГ электрофорез очищенных энтероцинов штамма *Enterococcus faecium* S5 и обнаружение их антимикробной активности в геле (тест-культура- *L. brevis* F 1.14):

А. Окрашенный нитратом серебра гель:

1. Маркерные пептиды;
2. Культуральная жидкость;
3. Активные фракции высокоэффективной жидкостной обратнофазной хроматографии

Б. Гель, наслоенный газонем культурой, для выявления

антимикробной активности очищенных энтероцинов:

1. Активная фракция высокоэффективной жидкостной катионообменной хроматографии
2. Активная фракция высокоэффективной жидкостной обратнофазной хроматографии (16,4 мин)
3. Активная фракция высокоэффективной жидкостной обратнофазной хроматографии (15,7 мин)

показаны на рис. 2. В геле, окрашенном нитратом серебра, видны полосы низкомолекулярных маркерных пептидов (1 колонка), культуральной жидкости (2 колонка) и очищенные белки с энтероциновой активностью (3 колонка) (рис. 2, А). Сравнение степеней подвижности этих полос показывает, что значение молекулярных масс этих пептидов находится между 3,4 и 6,5 кДа. Далее первая и вторая фракции энтероцинов, полученные путем аналитической высокоэффективной жидкостной обратнофазной хроматографии C₁₈, повторно пропускались через те же колонки в аналогичных условиях проведения хроматографии и затем исследовались масс спектрометром. Эти исследования показали, что молекулярная масса фракции 1 и фракции 2 равны 5219 Да и 5206 Да, соответственно.

5. Изучение молекулярных свойств и антимикробной активности очищенного энтероцина и его индивидуальных пептидов, выделенных из штамма *Enterococcus faecium* S5. Штаммы *Enterococcus faecium* CTC492, T136, WHE 81 и BFE 900 кроме энтероцина А продуцируют также энтероцин В (Абдуллаева, 2009; Ганбаров и др., 2006; Хавкин, 2007; Chen, Hoover, 2003). Энтероцин L50 выделен из штаммов *Enterococcus faecium* L50 и 6T1a (Berjeaud, Senatiempo, 2004), а также *Enterococcus faecium* F58, изолированного из марокканского сыра (Ганбаров и др., 2011). Выявлено, что он состоит из двух полипептидных цепей- L50А и L50В. Генные локусы данного бактериоцина идентичны в штаммах L50 и 6T1a. Более того, оба энтероцина L50А и I состоят из 44 аминокислот и обладают одинаковой молекулярной массой, равной 5190Да. В молекуле энтероцина L50В также имеются две полипептидные цепи, состоящие из 43 аминокислотных остатков. Их молекулярная масса равна 5178Да (Berjeaud, Senatiempo, 2004).

Все вышеперечисленные бактериоцины с двумя разными

пептидами обладают индивидуальной активностью, которая усиливается при их комбинированном состоянии. Совместно эти бактериоцины имеют широкий спектр антимикробной активности в отношении грамположительных бактерий, относящихся к родам *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus* и *Listeria* (Абдуллаева, 2009; Ганбаров и др., 2006; Хавкин, 2007; Chen, Hoover, 2003; Гюльяхмедов, 2007; Verjeaud, Senatiempo, 2004). По значениям молекулярных масс очищенные нами энтероцины были близки к этим бактериоцинам.

Для определения спектра ингибиторной активности индивидуальных пептидов были проведены специальные опыты. Проверялась активность пептидов как каждого в отдельности, так и в их комбинированном состоянии по отношению к более широкому кругу пассивных штаммов, чем были использованы в случае проведения первичного скрининга энтерококков с целью обнаружения штаммов с антимикробными свойствами. Проведение этих исследований представляло интерес и для выяснения вопроса, отражается ли процесс очистки энтероцинов на спектре их антимикробной активности. Результаты опытов даны в табл. 2. Из таблицы видно, что очистка энтероцина положительно влияет на спектр его антимикробной активности. Так, если исходная культуральная жидкость штамма *E. faecium* S5 подавляла рост 16 из взятых 27 тест-культур, то очистка этих пептидов расширила этот список до 23 пассивных штаммов, а именно за счет испытывающих ингибирование роста штаммов *E. coli* (2 штамма), *Pseudomonas* sp. (3 штамма), а также микроскопических грибов *Candida pseudotropicalis* и *Saccharomyces cerevisiae*. Судя по диаметру чистых зон на газоне, очистка энтероцина повышала также степень ингибирования им роста различных пассивных культур в 2 или в 3 раза. Что касается спектра ингибиторной активности индивидуальных пептидов, то здесь наблюдалась иная картина. Так, при воздействии этих пептидов каждого в отдельности спектры их антимикробной активности не отличались от спектров активности культуральной жидкости штамма – продуцента.

Изучение спектра ингибирующего действия энтероцина, полученного из *Enterococcus faecium*, показало, что очищенный метаболит проявляет высокую антимикробную активность по отношению к *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Lactobacillus casei* DSM 20011,

Lactobacillus plantarum ATCC 14917, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 101028 T, *Lactobacillus helveticus* 103146T, *Lactobacillus brevis* F 145 и F 1.14, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CIP 5345, *Leuconostoc gelidum* DSM 5578, *Listeria innocua*, CIP 80.11, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* P13, *Pseudomonas* sp. 131, *Streptococcus. epidermis* ATCC 25922, *Campylobacter jejuni* (табл. 2).

Вместе с тем, энтероцин не подавлял рост *E. coli* ATCC 23355 и PQ37 CIP 104368, *Pseudomonas* sp. 38 и 54, *Pseudomonas fluorescens* CIP 69.13 T, *Salmonella enterica*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922. Энтероцин не проявлял активность и по отношению к дрожжевым грибам *Candida pseudotropicalis* и *Saccharomyces cerevisiae* (табл. 2).

Таблица 2. Спектр ингибирующего действия энтероцина, полученного из *Enterococcus faecium* штамм S5

№	Тест-культуры	Среда	Активность
1	<i>Campylobacter jejuni</i>		+
2	<i>Candida pseudotropicalis</i>	YPD	-
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	BHI	+
4	<i>Enterococcus faecium</i> P13	MRS	+
5	<i>E. coli</i> ATCC 23355 (BAS)	BHI	-
6	<i>E. coli</i> PQ37 CIP 104368	LB	-
7	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 340	MRS	+
8	<i>Lactobacillus brevis</i> F145	MRS	+
9	<i>Lactobacillus brevis</i> F. 1.14	MRS	+
10	<i>Lactobacillus casei</i> DSM 20011	MRS	+
11	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 101028	MRS	+
12	<i>Lactobacillus helveticus</i> 103146T	MRS	+
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	MRS	+
14	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CIP 5345	MRS	+
15	<i>Leuconostoc gelidum</i> DSM 5578	BHI	+
16	<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11	BHI	+
17	<i>Listeria monocytogenes</i>	BHI	+
18	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13 T	BHI	-
19	<i>Pseudomonas</i> sp. 38	BHI	+
20	<i>Pseudomonas</i> sp. 54	BHI	-
21	<i>Pseudomonas</i> sp. 131	BHI	+
22	<i>Salmonella enteric</i>	BHI	-

23	<i>Salmonella Montevideo</i>	BHI	-
24	<i>Salmonella thyphimurium</i>	BHI	-
25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YPD	-
26	<i>Stapylococcus aureus ATCC 25922</i>	BHI	-
27	<i>Streptococcus epidermis ATCC 25922</i>	BHI	+

6. Влияние различных факторов на активность энтероцина S5. Изучение влияния некоторых экологических факторов на антимикробную активность энтероцина *Enterococcus faecium* S5 выявило, что в пределах pH среды от 2 до 10 антимикробная активность изучаемого энтероцина практически не меняется и полностью сохраняется. Энтероцин является также термостабильным, кроме того, длительное время сохраняет свою активность под воздействием 5 и более процентного раствора этанола. Инкубация энтероцина с разными ферментами неодинаково влияет на его антимикробную активность. Так, каталаза, липаза и α -амилаза практически не оказывали какого-либо влияния на активность. Однако, под воздействием протеолитических ферментов химотрипсина, протеиназы К и проназы энтероцин S5 полностью терял свою ингибиторную активность. При инкубации энтероцина с трипсином и пепсином наблюдалась иная картина: под воздействием трипсина потеря активности составила 75%, а пепсина –50%.

Обнаруженная полная резистентность исследуемого активного компонента к влиянию каталазы исключает участие перекиси водорода в проявлении антимикробной активности данного штамма. Устойчивость активности энтероцина к действию α -амилазы и липазы связана, по-видимому, с отсутствием в его составе компонентов липидного и углеводного происхождения.

ВЫВОДЫ

1. Из сыров, изготавливаемых и используемых на разных территориях Азербайджана, выделены и отобраны наиболее перспективные бактериоцинообразующие природные штаммы молочнокислых бактерий. Штамм S5 1800ПЕ/мл⁻¹, синтезирующий антибиотический комплекс широкого антимикробного спектра действия, с помощью молекулярных и генетических методов идентифицирован как *Enterococcus faecium*.

2. Изучены фенотипические признаки отобранных штаммов с антимикробной активностью, выделены колониально-морфологические варианты этих бактерий, показаны их различия по ростовым признакам.

3. Выявлено, что молочнокислые бактерии рода *Enterococcus* синтезируют энтероцин параллельно росту продуцентов при разных температурах и pH среды, в присутствии NaCl (6,5%). Проявление антимикробной активности в активной фазе роста популяции может свидетельствовать о мембранном механизме их действия.

4. Оптимизирован синтез энтероцина штаммами молочнокислых бактерий рода *Enterococcus* с помощью подбора питательных сред и условий культивирования, что позволило получить продукт в достаточном количестве. С использованием специфических методов белковой химии выявлена белковая природа энтероцина.

5. Показано, что энтероцин, выделенный из культуры *Enterococcus faecium* S5, имеет две полипептидные цепи с молекулярными массами 5219 Да и 5206 Да, каждая из которых обладает индивидуальной активностью. Совместно этот энтероцин имеет широкий спектр антимикробной активности по отношению к грам-положительным (*Listeria*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*) и грам-отрицательным бактериям (*Campylobacter*, *Pseudomonas*).

6. Установлено, что энтероцин устойчив в широком диапазоне кислотности (pH) среды и температуры. Двухвалентные катионы и лецитин полностью подавляют, а эфиры п-оксибензойной кислоты и NaCl, наоборот, стимулируют антимикробную активность энтероцина.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гюльяхмедов С.Г., Абдуллаева Н.Ф., Алиева А.А., Гусейнова Н.Ф., Ахмедова А.Ф., Мустафаева Р.С., Кулиев А.А. Некоторые характеристики бактериоцинопоподобного ингибирующего вещества (БПИВ) штамма *Lb. paracasei* spp. *Paracasei* BN AT5 // Межвузовский сборник научных трудов СНГ «Современный мир, природа и человек». Российская Федерация. Томск, 2007, Т. 4, №3, с. 81-85
2. Gulahmadov S.G., Dalgarrado M., Chobert J.-M., Kuliev A.A., Abdullayeva N., Huseynova N.F., Haertlee T. *Lb Buchneri* S2 – as a BLIS producing strain isolated from traditional Azerbaijani cheese / 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis. Czech Republic, Prague, 2007. p. 329-330
3. 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 биологических наук, 2008, №2, с. 62-70
4. Гюльяхмедов С.Г., Гусейнова Н.Ф., Абдуллаева Н.Ф. Антимикробная и протеолитическая активности штамма S5, изолированного из сыра / Сборник материалов Международной научно-практической конференции, “Актуальные проблемы биоэкологии”. МГОУ, Москва, 2008, с.147-150
5. Gulahmadov S.G., Mustafayeva R.F., Huseynova N.F. *Lb phentosus* – as a BLIS –producing strain isolated from traditional Azerbaijani cheeses / Materials of International conference “ELIAVA – 2008. Phage Biology, Ecology and Therapy Meeting, Tbilisi, Georgia 2008. p. 27
6. Ivanova I., Kirilov N., Iliev N., Danova S., Dimov T., Krasteva J., Georgieva R., Alkhaledy S.S., Husseinova N., Sitohy S.M., Akhmad A.N., Kuliev K.A.I., Gulahmadov S.G., Dalgarrado M., Chobert J., Haertlee 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, Egmond and Zee, The Netherlands 2008, D064.
7. 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. Баку, 2009, №5, т LXV, с. 95-103
8. Гюльяхмедов С.Г., Абдуллаева Н.Ф., Гусейнова Н.Ф., Кулиев А.А., Иванова И., Хертле Т., Шоберт Ж.М. Выделение и характеристика бактериоциноподобных ингибиторных веществ молочнокислых бактерий изолированных из азербайджанских сыров // Прикладная биохимия и микробиология, Москва 2009, т 45, №3, с. 297-303
9. Гюльяхмедов С.Г., Абдуллаева Н.Ф., Гусейнова Н.Ф., Гамидова К.М. Влияние температуры на рост и секреции бактериоцина штамма *Enterococcus faecium* S5 // Труды Института ботаники НАН Азербайджана Баку, 2009, №5, т XXIX, с. 638-643
10. 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, Баку, 2009, т VII, с. 156-160
11. Гюльяхмедов С.Г., Абдуллаева Н.А., Гусейнова Н.Ф., Мирхадизаде Т. Б. Влияние некоторых физико-химических факторов на антимикробную активность энтероцина Q1 / 2-я Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биоэкологии», Баку, 2010, с. 63
12. Гюльяхмедов С.Г., Абдуллаева Н.А., Гусейнова Н.Ф., Исмаилова Л.И., Кулиев А.А. Влияние двухвалентных катионов на антимикробную активность бактериоцинов, молочнокислых бактерий, изолированных из азербайджанских сыров // Труды Института микробиологии НАН Азербайджана, Баку, 2010, т VIII, с. 120-124
13. Ahmadova A.F., Abdullayeva N.A., Quseynova N.F., Quliyev A.A. Milk caseins hydrolysis by strain *Enterococcus faecalis* AN1 // Доклады НАН Азербайджана. Баку, 2010, №6, т LXVI, с. 25-32
14. Гюльяхмедов С.Г., Гусейнова Н.Ф., Абдуллаева Н.А., Кулиев А.А. Влияние хлористого натрия, парагидроксibenзойной ки-

- слоты и пропил-парабена на спектр антимикробной активности бактериоцинов молочнокислых бактерий, изолированных из азербайджанских сыров // Вестник МГОУ. Москва 2011, сер. «Естественные науки», №2, с. 120-124
15. 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
16. Гусейнова Н.Ф., Кулиев А.А. Подбор оптимальных условий для продуцирования энтероцина *Enterococcus faecium* S5 изолированного из азербайджанского сыра // Вестник Бакинского Университета, серия природоведческих наук, Баку, 2013, №4, с. 51-60

N.F. Hüseynova

**ENTEROCOCCUS CİNSLİ SÜD TURŞUSU
BAKTERİYALARINDAN AYRILMIŞ ENTEROSİNİN
BİOKİMYƏVİ VƏ ANTİMİKROB XÜSUSİYYƏTLƏRİ**

Xülasə

Dissertasiya işi ənənvi üsullarla hazırlanmış Azərbaycan süd məhsullarından izolə edilmiş *Enterococcus* cinsli süd turşusu bakteriyalarının skrininginə, eyni zamanda bakteriosin sintez edə bilən ştammların biokimyəvi və antimikrob xüsusiyyətlərinin tədqiqinə həsr olunmuşdur. Azərbaycanın müxtəlif bölgələrindən əldə olunmuş 5 (beş) süd məhsulu nümunəsindən 277 (iki yüz yetmiş yeddi) süd turşusu bakteriya ştammları alınmışdır. Aparılmış skrining nəticəsində zülal təbiətli aktimikrob komponent sintez edə bilən 8 aktiv ştamm müəyyən edilmişdir. İzolə edilmiş ştammlar morfofizioloji və biokimyəvi xüsusiyyətlərinə əsasən ilkin olaraq *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus mundtii* və *Enterococcus hirae* növləri kimi müəyyən edilmişlər. Geniş antimikrob aktivlik spektrinə malik olan S5 ştamminin genotipik identifikasiyası zamanı *Enterococcus faecium* növünə aid olduğu təsdiq olunub.

Antimikrob aktivliyə malik ştammların inhibirləşdirici təsir spektri və bu təsirin mexanizmi öyrənilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, *Enterococcus* cinsli süd turşusu bakteriyaları mühitdə temperaturun, pH-ın müxtəlif göstəricilərində və 6.5% NaCl iştirakı ilə enterosin sintez edirlər. Mühitin tərkibini dəyişməklə, *Enterococcus* cinsli süd turşusu bakteriyaları tərəfindən enterosinin sintezi optimallaşdırılmışdır və nəticə etibarilə enterosinin daha təmiz halda alınması mümkün olmuşdur. Spesifik üsullarla enterosinin zülal təbiətli olması müəyyən olunmuşdur. *Enterococcus faecium* S5 ştammindən ayrılmış enterosin 5219 və 5206 Da kütləli iki polipeptid zəncirə malikdir və hər biri individual antimikrob aktivlik göstərir. Sinergik olaraq, bu enterosin Qram-müsbət (*Listeria*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*) və Qram-mənfi (*Campylobacter*, *Pseudomonas*) bakteriyalarına qarşı antimikrob aktivlik göstərir.

N.F. Huseynova

**BİOCHEMICAL AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF
ENTEROCİN İSOLATED FROM LACTİC ACİD BACTERİA,
GENUS ENTEROCOCCUS**

Summary

This dissertation was devoted to the study of lactic acid bacteria (LAB), genus *Enterococcus*, isolated from traditional Azerbaijani fermented dairy products as well as to the research of biochemical and antimicrobial properties of bacteriocin producing strains.

277 (two hundred seventy seven) LAB strains were isolated from 5 (five) samples of traditionally fermented dairy products obtained from different regions of Azerbaijan. At the time of screening 8 (eight) active strains were obtained which had ability to produce bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS). Isolated strains have been primarily identified their morphophysiological and biochemical properties and categorized as *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus mundtii* and *Enterococcus hirae* types. The strain S5, with wide spectrum of antimicrobial activity was confirmed as an *Enterococcus faecium* as a result of genotypical identificaiton.

Inhibitory spectrum of activity and action mechanism of the isolated active strains were studied. It is revealed that LAB, genus *Enterococcus* synthesize enterocin at different indicators of temperature, pH and at the presence of 6,5% NaCl.

Synthesis of an enterocin by strains of LAB, genus *Enterococcus* is optimized by changing the environmental composition that allowed receiving the product in sufficient quantities. Enterocin isolated from strain *Enterococcus faecium* S5 has two polypeptide chains with molecular masses of 5219 and 5206 Da and each of them possess individual activity. In common this enterocin has a wide range of antimicrobial activity against Gram-positive (*Listeria*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*) and Gram-negative bacteria (*Campylobacter*, *Pseudomonas*).

Kağız formatı: 60x90 1/16

Tiraj: 100 nüsxə

“ASEL ÇAP EVİ”ndə hazırlanmışdır

Ünvan: Bakı ş. Səbail r.

M.Əfəndiyev 3/1

AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI
BOTANİKA İNSTİTUTU

Əlyazması hüququnda

NİGAR FAİQ QIZI HÜSEYNOVA

ENTEROCOCCUS CİNSLİ SÜD TURŞUSU
BAKTERİYALARINDAN AYRILMIŞ ENTEROSİNİN
BİOKİMYƏVİ VƏ ANTİMİKROB XÜSUSİYYƏTLƏRİ

2406.02 – Biokimya

Biologiya elmləri üzrə fəlsəfə doktoru elmi
dərəcəsi almaq üçün təqdim edilən dissertasiyanın

AVTOREFERATI

Bakı – 2015