

УДК 579.62:575.58

М.С.Уразова*, А.К.Молдагулова, М.Ж.Каирова, К.Г.Ли, Э.Е.Бекенова, А.Кажыбаев,
А.Б.Абдыкадырова, Р.Н.Келдибекова, С.М.Шайхин

РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» МОН РК, г. Астана, Казахстан

*e-mail: maira_01@mail.ru

Активность бактериоцинов молочнокислых бактерий, выделенных из казахского национального мясного продукта қазы

Выделены и определены до вида 17 культур молочнокислых бактерий из национального мясного продукта Қазы. Отобраны штаммы обладающие бактериоциногенной активностью. Для постановки турбидиметрического метода определения активности бактериоцинов были применены два способа нейтрализации супернатантов двух культур молочнокислых бактерий. Изучено влияние данных бактериоцинов на рост *S.aureus* в жидкой среде.

Ключевые слова: бактериоцин, термостабильность, активность, молочнокислые бактерии.

М.С.Уразова, А.К.Молдагулова, М.Ж.Каирова, К.Г.Ли, Э.Е.Бекенова, А.Кажыбаев,
А.Б.Абдыкадырова, Р.Н.Келдибекова, С.М.Шайхин

Қазақ ұлттық Қазы ет өнімінен бөлінген сүт-қышқылды бактериялардың бактериоциндерінің белсенділігі

Ұлттық ет тағамы Қазыдан сүтқышқылды бактерияларының 17 түрлі культуралары бөлініп алынды және анықталды. Бактериоциногенді белсенділігіне қабілетті штаммдар алынған. Бактериоциндердің белсенділігін анықтауына турбидиметриялық әдісін қою үшін сүт қышқылды бактериялардың екі дақылдарының супернатанттарын нейтрализациялауына екі тәсіл қолданылған. Сұйық ортада екі белсенді штамм бактериоцинінің *S.aureus* өсуіне әсері зерттелді.

Кілт сөздері: бактериоцин, термостабильность, белсенділік, сүтқышқылды бактериялар.

M.S.Urazova, A.K.Moldagulova, M.Z.Kairova, K.G.Lee, E.E.Bekenova, A.Kazhybaev,
A.B.Abdykadyrova, R.N.Keldibekova, S.M.Shaikhin

Activity of lactic acid bacteria bacteriocins isolated from Kazakh national meat product Khazy

17 cultures of lactic acid bacteria were isolated and identified from Kazakh national meat product Khazy. Strains which possess bacteriocinogenic activity were defined. Two ways of supernatants neutralization were used for definition of bacteriocin activity by turbidimetric method. Two strains bacteriocinogenic activity to *S.aureus* growth in nutrient broth was determined.

Key words: bacteriocin, thermoresistance, activity, lactic acid bacteria.

Лактобактерии в силу их безвредности для человеческого организма считаются основными источниками получения практически ценных бактериоцинов. Наиболее изученным из них в настоящее время является антибиотик низин, секретлируемый *Lactococcus lactis*. Широкое применение в целях биоконсервации продовольствия также получил запатентованный в США и Европе педиоцин. Ферментаты, содержащие этот бактериоцин под маркой Alta™, продаются как консервант продовольствия, увеличивающий сроки хранения и подавляющий рост преимущественно *L. monocytogenes* в мясных полуфабрикатах. Хотя эти бактериоцины практически не активны против

грамотрицательных бактерий, но им находят применение в нетепловых методах обработки продовольствия, которые, как утверждают разработчики, улучшают органолептические качества пищи и сроки ее хранения [1,2].

Исследований, касающихся выделения и изучения активности бактериоцинов проводилось и проводится достаточно много. Имеются также данные, что в процессе длительного хранения пищевой продукции бактериоцины не способны сохранять активность вследствие частичного или полного разрушения, а также из-за взаимодействия с белками и липидами, содержащимися в продуктах. Для решения этой задачи при производстве применяются непосредственно

бактериоцинопродуцирующие штаммы молочнокислых бактерий. При этом наблюдается аккумулярующий эффект, за счет продукции этими бактериями не только бактериоцинов, но также и молочной кислоты, перекиси и др. метаболитов, обладающих антимикробным эффектом [3,4].

В данных исследованиях нами была изучена бактериоциногенная активность штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из казахского национального продукта питания Қазы и воздействие данных бактериоцинов на рост *S.aureus*.

Материалы и методы

Объектами исследования стали 17 культур молочнокислых бактерий, которые были выделены нами из казахского национального продукта казы (Караганда) в апреле 2012.

Для получения чистых культур был использован метод десятичных разведений с последующим пересевом на твердую питательную среду (MRS, HiMedia), селективную по отношению к МКБ. Были отобраны грамположительные кокки и палочки, каталазонегативные и не образующие колонии на мясопептонном агаре. Тест-штаммы *E.coli*, *S.marcescens*, *P.vulgaris*, *S.aureus* были взяты из музея РГП «РКМ».

Для определения нуклеотидной последовательности 16S rDNA проводили ПЦР с использованием праймеров 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 806r (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3'), которые являются универсальными для бактерий. (Applied Biosystems, США), согласно инструкциям фирмы-производителя.

Антагонистическую активность МКБ по отношению к тест-культурам: *E.coli*, *S.marcescens*, *S.aureus* изучали методом отсроченного антагонизма. Для изучения бактериоциногенной активности использовали метод диффузии в агар, описанный Yang et al. (2012г), с тремя видами супернатантов: 1 – чистый; 2 - с добавлением NaOH, для подавления действия кислоты; 3 - с добавлением NaOH и каталазы, для нейтрализации, как кислоты, так и перекиси водорода. Супернатанты молочнокислых бактерий получали в результате осаждения 16-часовой культуры, выращенной на жидкой среде МРС, на центрифуге при 15 тыс. оборотов в течение 5 мин. После добавления

реагентов супернатанты фильтровали (0,40µМ – Millipore, США) в целях стерилизации. Для нейтрализации внеклеточных протеаз и перекиси водорода применяли также другой метод, где после добавления щелочи в супернатант, проводили его термообработку на жидкостном термостате при 80°C в течение 10 мин [4,5].

Оценку влияния бактериоцинов штаммов 24А - *Lactobacillus sakei* и 10А – *Lactococcus garvieae* на рост тест-культуры *S.aureus* в питательном бульоне производили измеряя оптическую плотность (OD 600 nm) на спектрофотометре (PD-303UV, Япония). Супернатанты штаммов молочнокислых бактерий добавляли к среде, содержащей *S.aureus* на ранней экспоненциальной фазе (OD = 0,02), в соотношении 1:5 (Todorov, 2008). Культура *S.aureus* в питательном бульоне без внесения супернатантов являлась позитивным контролем активной пролиферации [5].

Результаты и их обсуждение

В результате идентификации методом анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA были определены виды молочнокислых бактерий, выделенных из казы. Согласно генетической идентификации 17 культур были отнесены к семи различным видам: *Lactobacillus sakei* (4), *Leuconostoc garlicum* (1), *Weissella spp.* (5), *Pediococcus spp.*(2), *Lactococcus garvieae*(2), *Lactococcus lactis*(2), *Leuconostoc mesenteroides*(1).

При помощи метода отсроченного антагонизма были отобраны 4 наиболее активных штамма, обладающие высокими показателями антагонистической активности в отношении всех четырех тест-культур: *Pediococcus spp-8A*, *Lactococcus garvieae-10A*, *Lactococcus lactis-17A*, *Lb.sakei -24A*.

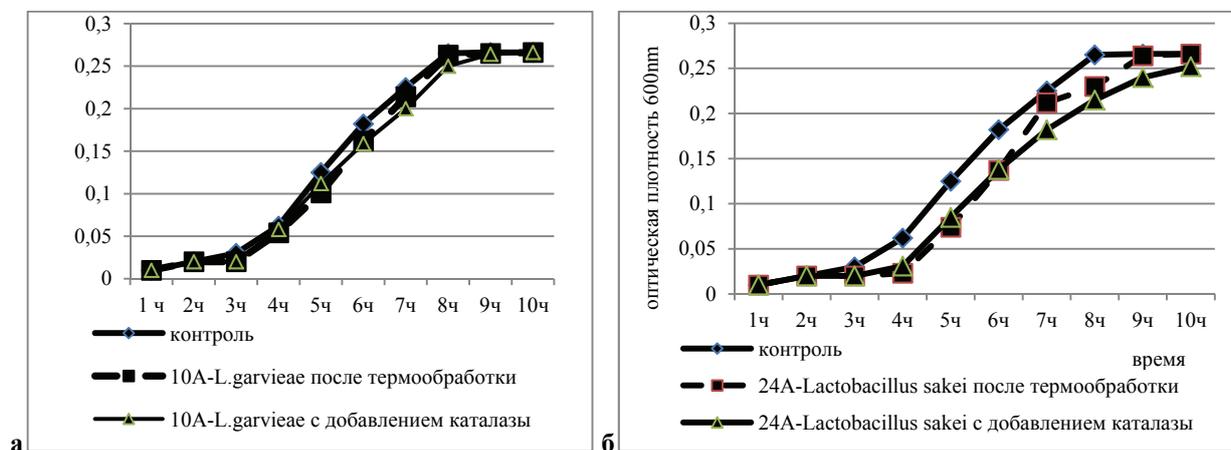
Далее, с применением методики Yang et al. (2012) была исследована бактериоциногенная активность у всех 17 выделенных культур. В итоге только у двух штаммов было подтверждено наличие в супернатантах бактериоцинов, а именно у *Lactococcus garvieae - 10A* и *Lactobacillus sakei -24A*.

Активность бактериоцинов штаммов *Lactococcus garvieae - 10A* и *Lactobacillus sakei -24A* по отношению к индикаторной культуре *S.aureus* была изучена при помощи турбидиметрического метода, описанного в работе Todorov et al. 2008 года, где активность

бактериоцина определяется при помощи измерения оптической плотности культуры в жидкой среде.

Графики показывают, что бактериоциин штамма *Lactobacillus sakei* -24А превышает по своей активности таковую штамма *Lactococcus*

garvieae - 10А, хотя и незначительно. Отрыв наблюдается на ранней экспоненциальной фазе в промежутке времени от 3 до 5 часов культивирования *S.aureus* в питательном бульоне при Т 37⁰С.



а – при внесении бактериоцинсодержащих супернатантов культуры *Lactococcus garvieae* - 10А;
б – при внесении бактериоцинсодержащих супернатантов культуры *Lactobacillus sakei* -24А

Рисунок – Активность бактериоцинов по отношению к индикаторной культуре *S.aureus* в питательном бульоне (Т 37⁰С)

В данном промежутке, при внесении в среду стерильных бактериоцинсодержащих супернатантов *Lactobacillus sakei* -24А, плотность культуры *S.aureus* в жидкой среде вдвое ниже по сравнению с контролем. Внесение стерильных бактериоцинсодержащих супернатантов штамма *Lactococcus garvieae* - 10А на плотность индикаторной культуры влияет в меньшей степени выражено и к 7-8 часам культивирования кривые роста по значениям сливаются с контролем.

В данном исследовании мы применяли два метода нейтрализации супернатантов, это термообработка при 80⁰С в течение 10 мин. для удаления протеаз и перекиси водорода, и второй метод, где нейтрализация перекиси достигается добавлением к супернатанту каталазы. Оба эти метода обработки дают практически одинаковый положительный результат. Но применение первого метода, также подтверждает термостабильность изучаемых нами бактериоцинов. Бактериоциин штамма *Lactococcus garvieae* - 10А, как и

бактериоциин *Lactobacillus sakei* -24А способны выдерживать нагревание до 80⁰С в течение 10 мин и при этом сохранять свою активность.

Несмотря на то, что нами в данном исследовании была доказана антибактериальная активность бактериоцинов двух штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из национального казахского продукта Қазы в отношении *S.aureus*, она не была столь высокой, чтобы значительно снизить концентрацию микробных клеток в среде культивирования. Известно, что сам по себе микроорганизм *S.aureus* является достаточно агрессивным. Стафилококки, помимо множества ферментов патогенности, являются продуцентами сахаролитических и протеолитических ферментов. Скорее всего, именно воздействие протеаз стафилококка явилось причиной дезактивации бактериоцинов в нашем исследовании. Подобные протеазы также могут явиться причиной разрушения промышленных бактериоцинов при длительном хранении продуктов питания.

Литература

- 1 Hartmann H., Wilke T. Efficacy of bacteriocin containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food // International Journal of Food Microbiology. – 2011. – P. 192-199.
- 2 Franciska Kruger M., Antonio M., Destro M., Todorov S. Isolation of bacteriocinogenic strain of *Lactococcus* from rocket salad and evidences of production of a variant of nisin with modification in the leader- peptide // Food control. – 2013. – P. 467-476.
- 3 Anna Sip, Michal Wieckowicz, Olejnik-Schmidt A. Anti-Listeria activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland // Food control. – 2012. - P.117-124.
- 4 Yang E., Fan L., Doucette C., Fillmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic-acid bacteria isolated from cheeses and yogurts // AMB Express a Springer Open Journal.- Canada. - 2012. – V. 73. – P.134-139.
- 5 Todorov S. Bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of adsorption of bacteriocin to *Listeria spp.*// Brazilian Journal of microbiology. – 2008. – P.178-187.