

ВЛИЯНИЕ ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРААЦЕТАТА, ЛЕЦИТИНА И КАЗЕИНА НА АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОЦИНОПОДОБНОГО ИНГИБИРУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА ШТАММА *LACTOBACILLUS PARACASEI* SPP. *PARACASEI* BN ATS 8W

Абдуллаева Н.Ф.¹, Таги-заде З.А.²©
¹Доктор философии; ²доцент кафедры.
Бакинский государственный университет

Аннотация

*Изучено влияние этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), лецитина и казеина на антимикробную активность бактериоциноподобного ингибирующего вещества (БПИВ) штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w. Обнаружен антагонистический эффект лецитина и казеина на активность данного бактериоцина. Активность сильно варьировала в зависимости от видовой принадлежности пассивных культур, а также и от концентрации антагонистов. Синергетический эффект ЭДТА наблюдался при его концентрации от 0,8 мМ до 1,8 мМ. Полученные результаты имеют большое прикладное значение.*

ВВЕДЕНИЕ

Молочнокислые бактерии представляют собой вид бактерий полезных для человеческого организма. В процессе своего питания эти бактерии способны сбрасывать углеводы с помощью молочной кислоты, которую выделяют. Молочнокислые бактерии представляют собой группу бактерий, в которую входят представители родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Sreptococcus* и др. С точки зрения классификации бифидобактерии, в эту группу не попадают, хотя демонстрируют схожие физиологические признаки.

Молочнокислые бактерии способны синтезировать разнообразные биологически активные вещества: органические кислоты, этанол, углекислоту, ферменты. Характерное свойство молочнокислых бактерий – их способность продуцировать вещества с антибиотической активностью, что позволяет им проявлять выраженный антагонизм в отношении различных микроорганизмов, в том числе и фитопатогенных [1, 2, 7].

Лактобактерии не имеют содержащих цитохром дыхательных систем, неподвижны, не образуют каталазу, не восстанавливают нитраты в нитриты, не разжижают желатину, не образуют спор и пигмента. Эти бактерии строгие анаэробы или факультативные, обладают протеолитической активностью, обусловливаемой действием протеаз и пептидаз, липолитической активностью не обладают. Среди молочнокислых бактерий встречаются патогенные для человека и животных микроорганизмы [1,2,8,11].

Тем не менее, гораздо чаще они оказывают положительное действие на человеческий организм. Играют очень важную роль в приготовлении пищи, причем встречаются не только в кисломолочных продуктах. Не все молочнокислые бактерии могут проявлять свойства пробиотиков, поскольку лишь некоторые из них при употреблении в пищу в состоянии доходить до нижних отделов желудочно-кишечного тракта, избежав переваривания [7]. Сведения о взаимодействии бактериоцинов с ингредиентами пищи ограничены и касаются только активности низина против ограниченного числа патогенных и условно патогенных микробов. Учитывая важность исследований с бактериоцинами молочнокислых бактерий, целью настоящей работы явилось изучение влияния некоторых важных компонентов ферментированных пищевых продуктов, таких как этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), лецитина и казеина на антимикробную активность бактериоциноподобного ингибирующего

вещества штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w против грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Используемые микроорганизмы, питательные среды и реактивы. В качестве тест-культуры использовали штаммы *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Escherichia coli* H101, *Staphylococcus aureus* Cip 9973, *Listeria innocua* DSM20649. В качестве продуцента бактериоциноподобного ингибирующего вещества использовали штамм *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w. Организмы культивировали в модифицированной МРС среде (мМРС) [8]. В одном литре среды содержалось: 10 г - триптона, 5 г – дрожжевого экстракта, 2 г - K_2HPO_4 , 2 г - диаммоний-цитрата, 1 г -Твина 80, 0,1 г - $MgSO_4 \cdot XH_2O$, 0,05 г - $MnSO_4 \cdot XH_2O$, 20 г - глюкозы (все реактивы фирмы Merck, Darmstadt, Germany). После стерилизации среды значение pH в ней составило 6,4-6,5.

Молочнокислые бактерии выращивали в анаэробных условиях при 30⁰С, все остальные штаммы – в аэробных условиях при 37⁰С. Препарат бактериоцина готовили по ранее описанной методике [7].

Определение активности бактериоцинов. Активность бактериоцинов определяли методом диффузии в агар как величину, обратную наибольшему разбавлению препарата, при котором проявлялась зона ингибирования пассивных штаммов (более чем на 2 мм) и выражали в условных единицах на мл культуральной жидкости (Е/мл).

Влияние различных компонентов на активность бактериоцина. Лецитин из яичного желтка (Serva, Heidelberg, Germany), казеин, ЭДТА (все реактивы фирмы Sigma, Deisenhofen, Germany) растворяли в мМРС среде в нужных концентрациях. pH растворов установили при помощи 4М HCl и 4М NaOH и стерилизовали путем фильтрации. Влияние каждого компонента среды на активность бактериоциноподобного ингибирующего вещества определяли отдельно при стандартных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Зависимость активности бактериоцина от различных концентраций лецитина по отношению к изученным штаммам пассивных культур отражена в таблице 1. Из таблицы следует, что добавление в среду лецитина в концентрации 3% приводит к полному исчезновению бактериоциновой активности против всех пассивных штаммов. Лецитин в концентрации 0,3% в зависимости от видовой принадлежности пассивных культур, понижает активность бактериоцина на 50-75%. Выбор таких концентраций лецитина не является случайным. Так, его количество в яичном желтке составляет 0,9%, а в составе молока количество фосфолипидов составляет 0,08%.

По литературным данным, нейтральные эмульгаторы, такие как монолаурин, моноолеат и твин-80 стимулируют активность низина [6]. Однако, соединения с амфотерными свойствами, например как лецитин даже при низких концентрациях (0,1%) угнетают ее активность [5]. Это обстоятельство объясняется тем, что низин образует стабильный комплекс с фосфолипидной молекулой, обладающей амфотерными свойствами.

Таблица 1

Влияние лецитина на активность БПИВ штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w

[Лецитин] (%)	Активность БПИВ		
	0,3	0,5	3
Пассивные микроорганизмы			
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 340	0,48 [▼]	0,11	0
<i>Staphylococcus aureus</i> Cip 9973	0,32 [▼]	0,07	0
<i>Listeria innocua</i> DSM20649	0,24 [▼]	0,01	0

▼ Относительная активность (активность БПИВ в стандартных условиях равна 1, рН 6,5)

Таблица 2 отражает зависимость активности бактериоцина от различных концентраций казеина по отношению к разным штаммам тест-культур. Эти опыты показали, что казеин, так же как и лецитин, угнетающе действует на активность бактериоцина. Степень угнетения зависела от видового разнообразия пассивных культур. Так, если активность бактериоцина против *L.bulgaricus* и *S. aureus* была понижена в присутствии 3 г/л казеина на 70%, то по отношению к *L. innocua* такой ингибирующий эффект казеина был достигнут концентрацией 10 г/л.

Причиной наблюдаемого в наших опытах снижения антимикробной активности бактериоцина в присутствии казеина, может служить взаимодействие этих молекул. Известно, что амфифильная молекула казеина содержит отрицательный заряд и гидрофобный домен. Эти свойства благоприятно влияют на образование стабильного комплекса положительно заряженной молекулы бактериоцина с казеином.

Таблица 2

Влияние казеина на активность БПИВ штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w

[Казеин] (г/л)	Активность БПИВ			
	0,1	3	5	10
Пассивные микроорганизмы				
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 340	0,82▼	0,48	0,36	0,11
<i>Staphylococcus aureus</i> Cip 9973	0,88▼	0,56	0,46	0,08
<i>Listeria innocua</i> DSM20649	0,96▼	0,76	0,72	0,48

▼ Относительная активность (активность БПИВ в стандартных условиях равна 1, рН 6,5)

Следующая серия экспериментов была посвящена изучению влияния этилендиаминтетраацетата на антимикробную активность исследуемого бактериоцина. Результаты этих опытов представлены на рисунке 1.

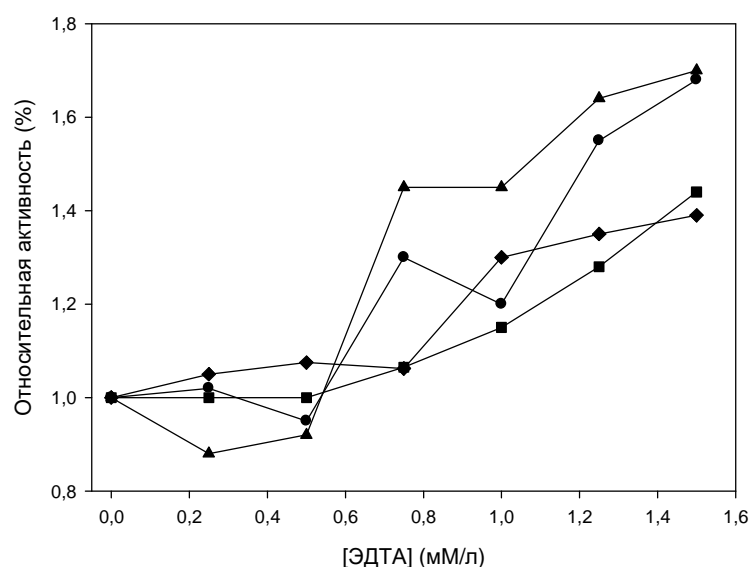


Рис. 1. Влияние ЭДТА на активность БПИВ штамма *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w против *E.coli* H101 (-■-); *L.bulgaricus* 340 (-▼-); *S.aureus* Cip 9973 (-◆-) и *L.innocua* DSM20649(-●-).

Как видно, при низких концентрациях (до 0,5мМ/л) влияние ЭДТА на активность бактериоцина против различных культур проявляется неоднозначно. Так, если в присутствии малых доз ЭДТА активность бактериоцина против *Escherichia coli* практически не менялась, то против *L.bulgaricus* и *L.innocua* наблюдалось ее снижение. В аналогичных условиях на активность бактериоцина против *S.aureus*, ЭДТА оказывал положительное влияние. Однако высокая концентрация ЭДТА стимулировала антимикробную активность бактериоцина по отношению всех без исключения пассивных микроорганизмов. При этом стимулирующий эффект ЭДТА зависел от видового состава пассивных штаммов.

ЭДТА во взаимодействии с грамотрицательными бактериями деструктивно влияет на функциональное равновесие их наружной мембраны [13]. Этот детергент в концентрации 1-20 ммоль/л, совместно с низином приводил к инаktivации штаммов кишечной палочки, включая штаммы *E.coli* O157:H7 и *Salmonella* [3,11]. Наши результаты в аналогичных опытах совпали с результатами этих авторов. Синергетический эффект ЭДТА с бактериоцином может иметь прикладное значение, так как было показано, что совместное применение ЭДТА с низином приводит к уменьшению количества живых клеток *E.coli* и *Salmonella* в птичьей мясе [10].

Таким образом, полученные в наших исследованиях результаты способствуют расширению научных данных, которые основывались на взаимодействии низина с грамположительными бактериями и углубляют наши познания о механизме влияния бактериоцинов на тест-культуры в целом.

Литература

1. Гюльяхмедов С. Г., Абдуллаева Н.Ф., Гусейнова Н. Ф., Кулиев А.А., Иванова И.В., Дальгальарондо М., Шобер Ж.-М. Хаэртле Т. 2009. //Прик. Биохим. и Микробиол. 45. № 3. с.1-7.
2. Abee, T., Hill, C. 2005. //Int. J. Food Microbiol. 28. P.169-185.
3. Cutter, C.N., Siragusa, G.R. 1995. //J. Food Prot. 58. P. 977-983.
4. Gulahmadov, S.G., Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Chobert, J-M., Kuliev, A.A., Haertlé, T. 2006. //Eur Food Res Technol.224. P.229-235.
5. Henning, S., Metz, R., Hammes, W.P. 1996. //Int. J. Food Microbiol. 3. P. 121-134.
6. Jung, D.-S., Bodyfelt, F.W., Daeschel, M.A., 1992. J. Dairy Sci. 75, 387-393.
7. Mazzotta, A.S., Montville, T.J. 1997. //J. Appl. Microbiol. 82. P. 32-38.
8. De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960. //J. Appl. Bacteriol. 23. P. 130-135.
9. Montville, T.J., Winkowski, K., Ludescher, R.D. 2005. //Int. Dairy J. 5. P. 797-814.
10. Shefet, S., Sheldon, B.W., Klaenhammer, T.R.. 1995. //J. Food Prot. 58. P. 1077-1082.
11. Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R.. 1991. //Appl. Environ. Microbiol. 57. P. 3613-3615.
12. Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. //Antonie van Leeuwenhoek 70. P. 331-345.
13. Vaara, M. 1992. //Microbiol. Rev. 56. P. 395-411.