

Биология

УДК 579.222.3

К. Дж. КАРАПЕТЯН, А. С. АКОПЯН, Ф. Н. ТХРУНИ, Ц. Р. БАЛАБЕКЯН

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ПРОЯВЛЕНИЕ
АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ
БАКТЕРИЙ

Изучено влияние полученной различными способами сыворотки, некоторых компонентов питательной среды и условий культивирования (температура, длительность инкубации) на проявление антимикробных свойств некоторых молочнокислых бактерий. Полученные супернатанты обладали различной антимикробной активностью и чувствительностью к нагреванию.

Введение. Антагонистические свойства молочнокислых бактерий (МКБ) связаны с продукцией органических кислот, термолабильных и термостабильных высоко- и низкомолекулярных антибактериальных субстанций и антибиотиков. К низкомолекулярным антибактериальным субстанциям относят перекись водорода и диацетил, которые обладают антимикробной активностью по отношению к широкому кругу патогенных и условно патогенных микроорганизмов. Исследованиями последних лет показано, что МКБ продуцируют бактериоцины и микоцины, которые являются протеинами или веществами белковоподобной природы, например пептидами, и обладают специфическим действием на различные микроорганизмы [1–3].

Изучение условий образования бактериоцинов рядом МКБ (*Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides*) показало, что факторы, способствующие накоплению клеточной массы, обеспечивают и наибольший синтез этих соединений.

На биосинтез бактериоцинов, как и других биологически активных веществ, оказывают влияние условия культивирования продуцента: состав питательной среды, ее pH, температура и время инкубации [3–5]. Важность оптимизации среды культивирования с целью выявления антибактериальных свойств показана для процессов синтеза низина, педиоцина, баварицина и лактацина [6–8].

Для выращивания штаммов МКБ обычно используется обезжиренное молоко или молочная сыворотка. В лабораторных условиях при исследовании антибактериальных свойств МКБ и с целью получения бактериоцинов используют питательную среду MRS [9]. Известно, что состав сыворотки

подвержен значительным колебаниям в зависимости от исходного сырья (цельное или обезжиренное молоко) и способа отделения белка (сбраживание, действие органических и минеральных кислот, ферментативный способ). Наличие в сыворотке легкоусвояемых многими видами микроорганизмов источников углеродного питания, а также различных ростовых факторов выдвигает ее в ряд наиболее ценных питательных сред для получения продуктов микробного синтеза. Естественно было предположить, что сыворотки, полученные различными способами, влияют на процессы роста МКБ и соответственно на синтез биологически активных веществ, обладающих антибактериальными свойствами.

Целью данной работы являлось изучение влияния различных сывороток, ряда компонентов питательной среды и условий выращивания на рост и проявление антимикробных свойств некоторых штаммов МКБ.

Материалы и методы. В работе наряду с штаммом *Lactobacillus acidophilus* 1991 (ВКПМ-6527) исследовали также применяемые в молочно-кислых заквасках *Lactobacillus ramnosus* 28 и *Streptococcus thermophilus* LMD9. При определении антагонистических свойств супернатантов, полученных после выращивания МКБ, в качестве тест-культур использовали непатогенные и условно патогенные бактерии *Bacillus subtilis* 17–89, *Salmonella typhimurium* Г–38, хранящиеся в коллекции лаборатории микробиологических технологий НИИ Биотехнология. Антимикробную активность супернатантов проверяли методом диффузии в агар. Результаты оценивали по размеру зон ингибирования роста тест-культур (\varnothing , мм).

В работе с МКБ и тест-культурами использовали известные по литературе и применяемые в лабораторной практике питательные селективные среды и методы определения кислотности среды и титра клеток [10, 11].

Подготовка сыворотки для использования в составе питательной среды. Для отделения сывороточных белков свежую молочную творожную или подсырную сыворотку нагревали до 80–90⁰С и выдерживали в течение 15 минут. Сывороточные белки отделяли центрифугированием (сепарированием). Для приготовления питательной среды сыворотку нагревали до 30–37⁰С и вносили необходимые компоненты в определенных количествах (% от объема среды).

МКБ поддерживали в жизнеспособном состоянии путем пересевов на молочный агар с лактозой раз в месяц. Рабочие пробирки (6–8 шт.) с обезжиренным молоком засеивали чистой культурой и помещали в термостат при 30⁰С на 16 ч. Затем при тех же режимах МКБ выращивали в 100 мл питательной среды, после чего полученный посевной материал переводили в малый инокулятор (объем 10 л). Процесс вели в анаэробных условиях. Культивирование в инокуляторе проводили в течение 48–72 ч. По окончании выращивания биомассу МКБ отделяли центрифугированием 30 минут при 6000 об/мин. Для выращивания МКБ использовали следующие питательные среды.

Среда 1: MRS (Merck).

Среда 2: подтворожная сыворотка с добавлением 0,6% цитрата натрия, 0,018% сульфата марганца, рН=5,0–5,5, кислотность по Тернеру 60–70⁰Т [10]. Среду готовили на основе подтворожной сыворотки, полученной различными способами осаждения (ферментативным, цитратом натрия или хлористым кальцием) как в лабораторных, так и в промышленных условиях на фирмах

«Мультигрупп» и «Аштарак-кат» (РА). Полученные сыворотки имели следующие характеристики: СВ=6,0–6,5, рН=6, 60–70⁰T.

Среда 3: подтворожная сыворотка с добавлением 0,6% цитрата натрия, 0,018% сульфата марганца, 0,5% уксуснокислого натрия, 0,5% дрожжевого экстракта, 1,0% пептона, 1,0% лактозы, 0,5–1,5% сульфата аммония, 0,2% сульфата магния.

Среда 4: 7%-ое обезжиренное молоко.

Статистический анализ полученных данных проводили методами корреляционного и регрессионного анализов.

Результаты и обсуждение. Определена антимикробная активность выращенных на различных питательных средах МКБ. Контролем служили показатели, полученные при выращивании на среде 1 (табл. 1).

Таблица 1

Влияние состава питательной среды на антимикробную активность исследуемых МКБ (48 ч, 37⁰C, тест-культура *B.subtilis*)

Среда	<i>L. ramosus-28</i>			<i>Str. thermophilus</i> LMD9			<i>L. acidophilus</i> 1991		
	Титр, 10 ⁸ кое/мл	Кислотность, °T	Ø, мм	Титр, 10 ⁸ кое/мл	Кислотность, °T	Ø, мм	Титр, 10 ⁸ кое/мл	Кислотность, °T	Ø, мм
1	3,7	280	10	1,8	140	4	1,7	280	10
2	1,2	160	10	0,25	110	0	1,2	220	14
3	1,5	315	17	1,85	310	10	3,8	410	20
4	1,2	195	12	0,2	120	8	1,2	380	16

Как видно из приведенных данных, при выращивании исследуемых МКБ на разных питательных средах наблюдается различный выход биомассы. На среде 3, содержащей сыворотку с добавлением способствующих росту МКБ компонентов, наблюдаются увеличенный выход биомассы для всех исследуемых бактерий и, как следствие, увеличенные размеры зон подавления роста тест-культуры. При этом проявляются различия в показателях кислотности после выращивания. Между показателями кислотности и размерами зон подавления роста тест-культур корреляции не наблюдается.

Таблица 2

Влияние различных видов сыворотки в составе питательной среды на антимикробную активность исследуемых МКБ (48 ч, 37⁰C, тест-культура *B. subtilis*)

Способы осаждения белка	<i>L. ramosus</i> 28			<i>L. acidophilus</i> 1991		
	Титр, 10 ⁸ кое/мл	Кислотность, °T	Ø, мм	Титр, 10 ⁸ кое/мл	Кислотность, °T	Ø, мм
творожная закваска	12,1	220	18	2,9	210	20
хлористый кальций	1,7	288	12	1,3	256	14
цитрат натрия	0,1	260	14	0,2	200	10
пепсин	2,5	250	14	2,7	180	14
сухая сыворотка (6%)	1,6	170	10	0,7	150	10

Далее исследовали влияние сывороток, полученных различными способами, применяемыми в производственных условиях, на антимикробную активность МКБ (табл. 2).

Наибольшие зоны подавления роста тест-культуры *B. subtilis* исследуемыми МКБ наблюдаются на питательной среде с сывороткой, полученной

после обработки молока творожной закваской (смесь бактерий). Аналогичные результаты получены и при выращивании *Str. thermophilus*.

С целью оптимизации состава питательной среды на основе подтворожной сыворотки исследовали влияние различных компонентов среды на размеры зон ингибирования роста тест-культуры супернатантами, полученными после выращивания МКБ. Контролем послужили характеристики супернатантов, полученных после выращивания МКБ на среде 2 (табл. 3).

Таблица 3

Влияние добавления различных компонентов в питательную среду 2 на антимикробную активность исследуемых МКБ (тест-культура *B. subtilis*)

№	Добавки	Содержание, %	<i>L.acidophilus</i> 1991 (48 ч, 37°C)			<i>Str.thermophilus</i> LMD9 (48 ч, 37°C)		
			Титр, 10 ⁸ кое/мл	Кислотность, °T	Ø, мм	Титр, 10 ⁸ кое/мл	Кислотность, °T	Ø, мм
1	контроль (среда 2)	0	0,1	200	8	0,9	210	10
2	дрожжевой экстракт	0,05	0,7	183	20	0,3	175	15
		0,1	0,7	177	20	0,7	180	15
		0,5	0,7	173	20	0,9	210	15
		1,0	0,7	225	24	0,9	210	20
3	сульфат аммония	0,5	0,6	176	20	0,5	181	18
		1,0	0,6	185	24	0,6	190	20
		1,5	0,5	167	4	0,9	200	22
4	глюкоза, %	0,05	1,1	201	22	0,9	200	14
		1,0	1,3	202	20	1,0	210	19
		2,0	1,5	280	20	1,5	210	20
5	лактоза, %	0,5	0,8	166	20	1,8	250	19
		1,0	0,8	170	20	2,0	260	20
6	уксуснокислый натрий	0,5	3,5	410	26	4,5	370	20
	дрожжевой экстракт	0,5						
	пептон	1,0						
	лактоза	1,0						
	сульфат магния	0,2						
сульфат аммония	0,5							
7	MRS		1,8	260	10	3,7	280	10

Как видно из полученных данных, размеры зон ингибирования роста тест культуры *B.subtilis* супернатантами культуральных жидкостей составляют 4–26 мм. Добавление различных количеств глюкозы или лактозы в среду приводит к увеличению размеров этих зон, как и добавление дрожжевого экстракта в концентрациях от 0,05 до 1,0%. Увеличение концентрации сульфата аммония (до 1,5%) в питательной среде уменьшает антимикробную активность супернатанта *L. acidophilus* 1991, но почти не влияет на накопление биомассы и размеры зон ингибирования для супернатанта *Str.thermophilus* LMD9. Как видно из приведенных данных, наилучшие результаты роста исследуемых МКБ и наибольшие размеры зон подавления роста наблюдаются при использовании среды 6 (табл. 3), в состав которой входят оптимальные концентрации дрожжевого экстракта, пептона, лактозы, минеральных солей.

Ранее нами было показано влияние температуры и продолжительности культивирования на проявление антимикробной активности штамма *L.acidophilus* 1991 [12]. Изучено влияние этих параметров на рост и антимикробную активность и для других исследуемых штаммов. Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4

Влияние продолжительности и температуры выращивания на антимикробную активность исследуемых МКБ (питательная среда б, тест-культура *B. subtilis*)

t, °C	Штаммы	48 ч			72 ч			96 ч		
		Титр, 10 ⁸ кое/мл	Кислотность, °T	Ø, мм	Титр, 10 ⁸ кое/мл	Кислотность, °T	Ø, мм	Титр, 10 ⁸ кое/мл	Кислотность, °T	Ø, мм
30	<i>L. acidophilus</i> 1991	0,8	200	18	1,0	230	20	1,0	256	12
	<i>L. rhamnosus</i> 28	0,6	160	8	1,4	192	16	1,0	230	8
37	<i>L. acidophilus</i> 1991	1,2	240	32	1,7	288	28	1,8	240	16
	<i>L. rhamnosus</i> 28	1,1	190	16	1,3	256	18	1,0	240	8
42	<i>Str. thermophilus</i> LMD9	–	–	–	0,5	176	20	0,8	120	5

Как видно из приведенных данных, МКБ по-разному проявляют антимикробные свойства относительно тест-культуры. Наибольшая зона подавления роста (32 мм) наблюдается при выращивании штамма *L. acidophilus* 1991 при температуре 37⁰C в течение 48 ч. Оптимум антимикробной активности штамма *Str. thermophilus* LMD9 проявляется при выращивании в течение 72 ч при температуре 42⁰C, а *L. rhamnosus* 28 – при температуре 37⁰C в течение 72 ч. Увеличение времени выращивания до 96 ч с целью повышения антимикробной активности у исследуемых штаммов не дало положительных результатов.

Известно, что для оценки антимикробной активности МКБ используется критерий термостабильности культуральной жидкости (КЖ) [12]. С этой целью исследовали размеры зон подавления роста нескольких тест-культур после обработки КЖ при различной температуре (табл. 5).

Таблица 5

Термостабильность супернатантов исследуемых МКБ при различных температурах обработки (время обработки 1 ч)

Тест-культура	<i>L. acidophilus</i> 1991		<i>L. ramosus</i> 28		<i>Str. thermophilus</i> LMD9	
	Температура обработки, °C					
	50	120	50	120	50	120
Ø зоны подавления роста, мм						
<i>E. coli</i>	≥18,0	≥20,0	≥12,0	≥12,0	≥6,0	≥12,0
<i>S. typhimurium</i>	≥18,0	≥20,0	≥12,0	≥12,0	≥6,0	≥12,0
<i>B. subtilis</i>	≥18,0	≥20,0	≥12,0	≥12,0	≥6,0	≥12,0

Изменение температуры обработки КЖ от 50 до 120⁰C в течение 1 ч не оказало отрицательного влияния, а, наоборот, способствовало повышению антимикробной активности, что может быть связано со специфичностью продуктов вторичного метаболизма, образующихся в процессе выращивания различных МКБ.

Итак, исследуемые МКБ обладают различной антимикробной активностью, которая зависит от состава питательной среды, а также времени и температуры выращивания. Содержащиеся в КЖ биологически активные продукты метаболизма обладают различной чувствительностью к повышению температуры. Наиболее рациональным является использование питательной среды на основе подварочной сыворотки, полученной ферментативным способом (бактериальная закваска) с добавлением ростовых компонентов (дрожжевой экстракт, пептон и др.) и минеральных солей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта НАТО Sfp 982164 в 2007г.

Кафедра микробиологии, биотехнологии растений и микроорганизмов

Поступила 11.03.2008

ЛИТЕРАТУРА

1. **Квасников Е.И.** Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Наука, 1975, 395 с.
2. **Axelsson L.** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects. 2-nd Edition. Revised and Expanded: Edited by S. Salminen & A. von Wright, 1998, p. 51–72.
3. **Piard J.C., Desmazeaud M.** – Lait., 1991, v. 71, p. 525–541.
4. **Ogunbanwo S.T., Sanni A.L., Onilude A.A.** – African Journal of Biotechnology, 2003, v. 2, № 7, p. 179–184.
5. **Balasubramanyam B.V., Varadaj M.C.** – J. Appl. Microbiol., 1998, v. 84, p. 97–102.
6. **Yang R., Ray B.** – Food Microbiol., 1994, v. 11, p. 281–291.
7. **Rodriguez J.M., Martinez M.I., Kok J.** – Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2002, v. 42, p. 91–121.
8. **Larsen A.G., Vogensen F.K., Josephsen J.** – J. Appl. Bacteriol., 1993, v. 75, p. 112–122.
9. **Klaenhammer T.R., Murianat P.M.** – J. Appl. Environ. Microbiology, 1991, v. 57, p. 114–121.
10. **Скородумова А.М.** Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов. М.: Наука, 1963, 211 с.
11. **Биргер Р.А.** Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследований. М., 1990.
12. **Мкртчян Э.В.** Исследование антагонистического действия некоторых микроорганизмов и свойств антимикробного препарата, полученного на основе штамма *L.acidophilus* 1991: Автореф. дис. на соиск. уч. степени канд. биол. наук. Ер., 2005.

Է. Զ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ա. Ս. ՀԱԿՈԲՅԱՆ, Ֆ. Ն. ՏԽՐՈՒՆԻ, Ծ. Ռ. ԲԱԼԱԲԵԿՅԱՆ

ՄՆՆԴԱՅԻՆ ՄԻՋԱՎԱՅՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՐՈՇ
ԿԱԹՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՀԱԿԱՄԻԿՐՈԲԱՅԻՆ
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԴՐՍԵՎՈՐՄԱՆ ՎՐԱ

Ամփոփում

Հետազոտվել է տարբեր եղանակներով ստացված շիճուկի և սննդային միջավայրի կազմի մեջ մտնող նյութերի և նրանց աճեցման պայմանների (ժամանակ, ջերմաստիճան) ազդեցությունը որոշ կաթնաթթվային մանրէների աճի և նրանց հակամանրէային հատկությունների դրսևորման վրա: Ցույց է տրված, որ ստացված վերնստվածքային հեղուկները օժտված են տարբեր հակամանրէային ակտիվությամբ և ջերմության նկատմամբ տարբեր զգայունությամբ:

K. D. KARAPETYAN, A. S. HAKOBYAN, F. N. TKCHRUNI, C. R. BALABEKYAN

INFLUENCE OF CULTURAL CONDITIONS ON THE PROPERTIES
OF LACTIC ACID BACTERIA

Summary

The effect of various lactoserum, nutrient compounds and growth conditions (temperature, time) upon the cultivation of lactobacteria and their antibacterial properties was studied. The obtained supernatants were shown to have different antibacterial activity and sensibility to temperature.