

УДК579.222.3

А. Г. Мерліч, Н. В. Коротаєва

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна, 65082;
тел. +38(0482)68 79 64; e-mail: andriymerlich@gmail.com

СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ БАКТЕРІЙ ШТАМУ *ENTEROCOCCUS ITALICUS* ОНУ547

Мета. Визначення складу жирних кислот бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 продуцента бактеріоцину та його попередньої ідентифікації. **Методи.** У роботі використовували штам *E. italicus* ОНУ547, який було виділено з ферментованої капусти з Таїланду. Бактерії культивували на 1,5% агаризованому середовищі *de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)*. Жирнокислотний склад бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 визначали за допомогою газового хроматографа *Agilent 7890*, оснащеного колонкою *Ultra 2 (25 м x 0,2 мм)* (*Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія, США*) з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів *MIDI Sherlock*. **Результати.** Вперше показано, що домінуючими жирними кислотами бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 є октадеценоні кислоти (61,52%). Гексадеканова кислота також присутня у відносно високій концентрації та складала 26,41% від загальної кількості. Інші виявлені жирні кислоти ($C_{17:0}$, $C_{20:1}$, $w7c$, $C_{12:0}$, $C_{19:0}$ цикло $w8c$, $C_{18:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:1}$) присутні в значно менших кількостях, та складала від 0,18% до 6,30%. **Висновки.** У складі ліпідів досліджуваних бактерій переважають ненасичені жирні кислоти. За спектром жирних кислот досліджувані бактерії віднесено до виду *E. italicus*.
Ключові слова: жирні кислоти, газова хроматографія, *E. italicus* ОНУ547.

Вперше представника молочнокислих бактерій виду *Enterococcus italicus* було виділено та описано відносно недавно. В якості характерних ознак бактерій цього виду відмічено здатність до слабого росту при температурі 10 °C та нездатність зростати в присутності 6,5% NaCl, відсутність пігментоутворення, нездатність утилізувати деякі цукри. Домінуючими жирними кислотами є $C_{18:1}$ $w7c$ та $C_{16:0}$ [3]. Дослідниками було показано перспективи застосування бактерій цього виду у харчовій промисловості [4].

У попередніх дослідженнях з ферментованої капусти (Таїланд) нами було виділено штам *E. italicus* ОНУ547 продуцент бактеріоцину, що також проявляв властивості, які вказують на можливість його застосування у харчовій промисловості. Належність виділеного штаму до виду *E. italicus* було встановлено на основі результатів секвенування 16S рДНК [1]. Однак для надійної ідентифікації бактерій бажано використовувати різні підходи, що включають класичні мікробіологічні методи, генетичний аналіз та методи хемотаксономії [7], серед яких інформаційним вважається порівняння спектрів жирних кислот [3]. У зв'язку з цим метою роботи було визначення спектру жирних кислот бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 та підтвердження його попередньої ідентифікації.

© А. Г. Мерліч, Н. В. Коротаєва, 2018



Матеріали і методи

У роботі використовували штам бактерій *E. italicus* ОНУ547, який було виділено нами з ферментованої капусти Таїланду та попередньо ідентифіковано на основі результатів секвенування 16S рДНК [1]. Бактерії культивували на 1,5% агаризованому середовищі de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) за температури 28 °С.

Аналіз складу жирних кислот було виконано згідно з [5]. Підготовку проб здійснювали в декілька етапів. Спочатку, з метою здійснення омилення, до біомаси добової культури бактерій додавали 1 мл реагенту № 1 (NaOH – 45 г, метанол – 150 мл, дейонізована дистильована вода – 150 мл), перемішували на вортексі впродовж 5–10 сек і прогрівали при 100 °С впродовж 5 хв. Потім, знову перемішували на вортексі, прогрівали при 100 °С впродовж 25 хв і охолоджували. Для здійснення метилування додавали 2 мл реагенту № 2 (6Н HCl – 325 мл, метанол – 275 мл), перемішували на вортексі впродовж 5–10 сек, прогрівали на водяній бані за 80 °С впродовж 10 хв і швидко охолоджували. Наступним етапом було екстрагування жирних кислот шляхом додавання 1,25 мл реагенту № 3 (гексан – 200 мл, метил-трет-бутиловий етер – 200 мл) та перемішування впродовж 10 хв, після чого суміш розділялась на дві фракції. До відібраної верхньої фракції, з метою здійснення промивання, додавали 3 мл реагенту № 4 (NaOH – 10,8 г, дейонізована дистильована вода – 900 мл), перемішували впродовж 5 хв і відбирали верхню фракцію, яка містила виділені жирні кислоти [8].

Газову хроматографію виконували за допомогою хроматографа Agilent 7890, який оснащений колонкою Ultra 2 з 5% фенілметилсилоксану (25 м x 0,2 мм) (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія, США). В якості рухомої фази використовували водень [8].

Результати та їх обговорення

У результаті проведених досліджень вперше виявлено, що до складу клітин бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 входять як насичені так і ненасичені жирні кислоти (табл.).

Серед насичених виявлено додеканову ($C_{12:0}$), тетрадеканову ($C_{14:0}$), гексадеканову ($C_{16:0}$), гептадеканову ($C_{17:0}$), октадеканову $C_{18:0}$ та циклопропанову ($C_{19:0}$ цикло w8c) кислоти, тоді як серед ненасичених – суміш гексадеценоних кислот ($C_{16:1}$ w7c/ $C_{16:1}$ w6c), суміш октадеценоних кислот ($C_{18:1}$ w7c/ $C_{18:1}$ w6c) та ейкозенову кислоту ($C_{20:1}$ w7c). Загалом насичені жирні кислоти бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 складають 31,7% від загальної кількості екстрагованих, тоді як ненасичених – 68,3%. При порівнянні вмісту насичених та ненасичених жирних кислот їх співвідношення складає приблизно 1:2, отже, в складі клітин досліджуваного ентерококу переважають ненасичені жирні кислоти.

Аналіз складу ненасичених жирних кислот клітин *E. italicus* ОНУ547 виявив, що найбільший вміст серед них має суміш $C_{18:1}$ w7c/ $C_{18:1}$ w6c (90%), тоді як суміші $C_{16:1}$ w7c/ $C_{16:1}$ w6c та $C_{20:1}$ w7c наявною є в значно меншій кількості та складають 9,2% та 0,8%, відповідно. Серед насичених жирних кислот у найбільшій кількості представлені $C_{16:0}$ (83,4%) та $C_{14:0}$ (7,8%). Жирні кислоти $C_{12:0}$, $C_{17:0}$, $C_{18:0}$ та $C_{19:0}$ цикло w8c присутні в значно меншій кількості



та складають лише 2%, 0,6%, 3,7% та 2,4% від загальної кількості насичених жирних кислот, відповідно.

Таблиця

Склад жирних кислот бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547

Table

Composition of fatty acids of bacteria of the strain *E. italicus* ONU547

Час утримання, хв	Жирна кислота	Частка (%)
0,7137	-	-
0,7345	Пік сольвента	-
1,6165	12:0	0,65
2,0333	-	-
2,1169	-	-
2,1643	14:0	2,47
2,4709	15:0	-
2,7351	16:1 w7c/16:1 w6c 16:1 w6c/16:1 w7c	6,30
2,7676	-	-
2,7857	16:0	26,41
3,1027	17:0	0,18
3,3696	18:1 w7c 18:1 w6c	61,52
3,4171	18:0	1,18
3,7041	19:0 cyclo w8c	0,77
3,9832	20:1 w7c	0,52

Аналіз сумарного складу насичених і ненасичених жирних кислот клітин бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 показав, що суміш октадеценних жирних кислот домінує серед інших та складає 61,52%, а гексадеканова і циклопропанова – 26,41% і 0,77%, відповідно (рис.). Отримані нами результати повністю узгоджуються з даними наведеними у єдиній відомій публікації що до складу жирних кислот у *E. italicus*. У типового штаму *E. italicus* TP1.5^T домінують жирні кислоти C_{18:1} (60,6%) та C_{16:0} (27,9%), тоді як жирні кислоти C_{19:0} виявлені у меншій кількості – лише 2,5% [3].

Оскільки штам *E. italicus* ОНУ547 ізольовано нами із рослинного матеріалу [1], а штам *E. italicus* TP1.5^T було виділено із молочних продуктів [2, 3] то узгодження результатів їх жирнокислотного складу може вказувати на те, що він не залежить від джерела виділення. Це підтверджує можливість для надійного застосування аналізу складу жирних кислот для ідентифікації бактерій виду *E. italicus*.

Склад жирних кислот (особливо визначення складу C16:1) може бути також використаний для розмежування видів *E. italicus* та *E. camelliae*, оскільки ці два види ентерококів мають високу схожу послідовність нуклеотидів



гену 16S рРНК (на 99,2%) [6]. У наших дослідженнях концентрація ненасичених жирних кислот $C_{16:1}$ у *E. italicus* ОНУ547 складала лише 6,3% від загальної кількості виділених жирних кислот, тоді як для *E. camelliae* FP15-1^T їх концентрація складає 30,5%. Крім того, концентрація іншої головної жирної кислоти – $C_{18:1}$ була значно меншою для *E. camelliae* FP15-1^T (20,9%) [6].

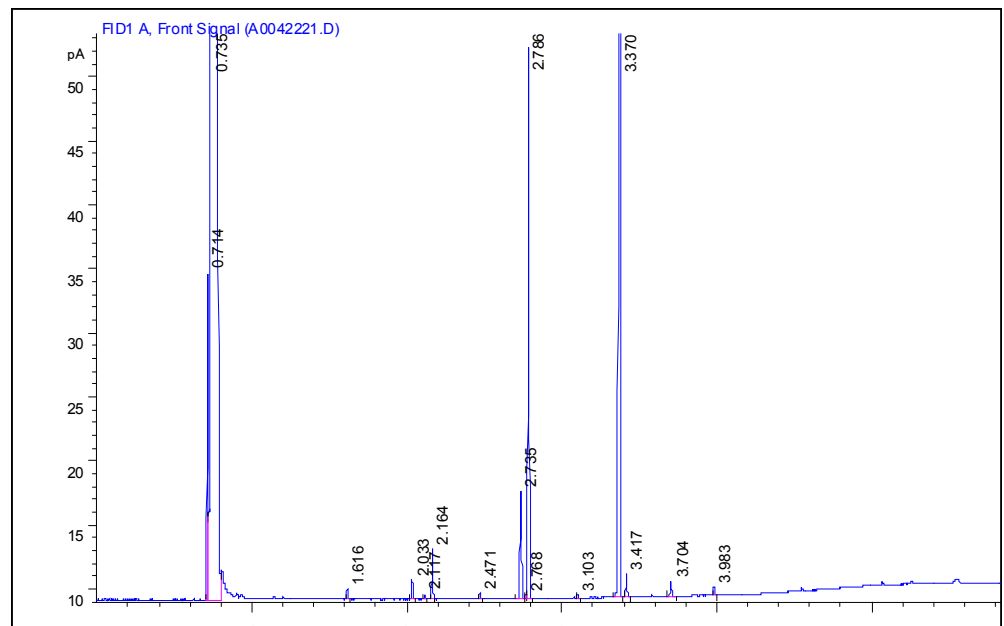


Рис. Хроматограма спектру жирних кислот бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547

Fig. Chromatogram of the fatty acid spectrum of bacteria of the strain *E. italicus* ONU547

Незважаючи на те, що інші жирні кислоти, такі як $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{17:0}$, $C_{18:0}$ та $C_{20:1}$ також є у складі клітин *E. italicus* ОНУ547, як і у *E. camelliae* FP15-1^T [6], проте вони визначені в значно меншій кількості та складають, відповідно, 0,65%, 2,47%, 0,18%, 1,18% та 0,52% від загальної кількості виділених жирних кислот.

Отже, проведені дослідження показали, що спектр жирних кислот бактерій *E. italicus* може слугувати важливою характеристикою цього виду і ознакою, яка диференціює його від генетично близького за послідовністю нуклеотидів 16S рРНК виду *E. camelliae*.

А. Г. Мерлич, Н. В. Коротаева

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, Украина, 65082,
тел. +38(0482)68 79 64, e-mail: andriymerlich@gmail.com

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ БАКТЕРИЙ ШТАММА *ENTEROCOCCUS ITALICUS* ONU547

Реферат

Цель. Определение состава жирных кислот бактерий штамма *E. italicus* ONU547 продуцента бактериоцина и его первичной идентификации. **Методы.** В работе использовали штамм *E. italicus* ONU547, который было выделено из тайской ферментированной капусты. Бактерии культивировали на 1,5% агаризованной среде de Man, Rogosa and Sharpe (MRS). Жирнокислотный состав бактерий штамма *E. italicus* ONU547 определяли с помощью газового хроматографа Agilent 7890, оборудованного колонкой Ultra 2 (25 м x 0,2 мм) (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) с использованием автоматической системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock. **Результаты.** Впервые показано, что доминирующими жирными кислотами бактерий штамма *E. italicus* ONU547 являются октадеценовые кислоты (61,52%). Гексадекановая кислота также присутствует в относительно высокой концентрации и составляла 26,41% от общего количества. Другие выявленные жирные кислоты ($C_{17:0}$, $C_{20:1}$, $w7c$, $C_{12:0}$, $C_{19:0}$ цикло $w8c$, $C_{18:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:1}$) присутствуют в значительно меньших количествах и составляли от 0,18% до 6,30%. **Выводы.** В составе липидов исследуемых бактерий преобладают ненасыщенные жирные кислоты. За спектром жирных кислот исследуемые бактерии отнесены к виду *E. italicus*.

Ключевые слова: жирные кислоты, газовая хроматография, *E. italicus* ONU547.

A. G. Merlich, N. V. Korotaieva

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvorianska str., Odesa, Ukraine, 65082,
tel.: +38(0482)68 79 64, e-mail: andriymerlich@gmail.com

FATTY ACID COMPOSITION OF BACTERIA OF *ENTEROCOCCUS ITALICUS* ONU547 STRAIN

Summary

Aim. Determination of fatty acid composition of bacteria of bacteriocin producing the strain *E. italicus* ONU547 and of its preliminary identification. **Methods.** The strain *E. italicus* ONU547, isolated from Thai fermented cabbage was used in the work. The bacteria were cultivated on the medium de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) with 1.5% agar. The fatty acid composition of bacteria of *E. italicus* ONU547 strain was determined by gas chromatograph Agilent 7890 equipped with Ultra 2 column (25 m x 0,2 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) using the automatic system of identification of microorganisms MIDI Sherlock. **Results.** Octadecenoic acids are dominating fatty acids (61.52%)



of bacteria of *E. italicus* ONU547 strain and it has been showed for the first time. Hexadecanoic acid is also present at relatively high concentration and comprised 26.41% from total amount. Other detected fatty acids ($C_{17:0}$, $C_{20:1}$, $C_{12:0}$, $C_{19:0}$, cyclo w8c, $C_{18:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:1}$) are present in much lower quantities and comprised from 0.18% to 6.30%. **Conclusions.** Unsaturated fatty acids are predominant in lipid composition of the studied bacteria. The studied bacteria were identified as *E. italicus* based on the spectrum of fatty acids.

Key words: fatty acids, gas chromatography, *E. italicus* ONU547.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Мерліч А. Г., Галкін М. Б., Ліманська Н. В., Швазе І., Ертеле Т., Іваниця В. О. Характеристика бактеріоцину *Enterococcus italicus* ONU547, виділеного з квашеної капусти Таїланду // XV з'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Одеса, 11–15 вересня, 2017 р.): тез. доп. – Львів: “Сполом”, 2017. – С. 281.
2. Fortina M.G., Ricci G., Acquati A., Zeppa G., Gandini A., Manachini P.L. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese // *Food Microbiol.* – 2003. – V. 20. – P. 397–404.
3. Fortina M.G., Ricci G., Mora D., Manachini P.L. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – V. 54. – P. 1717–1721.
4. Gaaloul N., Braiek O.B., Berjeaud J.M., Arthur T., Cavera V.L., Chikindas M.L., Hani K. and Ghrairi T. Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus italicus* GGN10 strain isolated from Tunisian bovine raw milk // *J. Food Saf.* – 2014. – V. 34 – P. 300–311.
5. *Methods in Microbiology* / Eds F. Rainey and A. Oren. Academic Presss, 2011.
6. Sukontasing S., Tanasupawat S., Moonmangmee S., Lee J.-S. and Suzuki K. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – V. 57. – P. 2151–2154.
7. Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., and Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics // *Microbiol. Rev.* – 1996. – V. 60, № 2. – P. 407–438.
8. http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf.

Reference

1. Merlich AG, Galkin MB, Limanska NV, Choiset I, Haertlé T, Ivanytsia VO. Characterization of bacteriocin from *Enterococcus italicus* ONU547, isolated from Thai fermented cabbage. XV Congress of the S.M. Vynogradskyi Society of Microbiologists of Ukraine (Odesa, 11-15 September, 2017): book of abstracts, Lviv, Spolom, 2007:281 (In Ukrainian).
2. Fortina MG, Ricci G, Acquati A, Zeppa G, Gandini A, Manachini PL. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiol.* 2003;(20):397-404.



3. Fortina MG, Ricci G, Mora D, Manachini PL. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004;(54):1717-1721. doi: 10.1099/ijs.0.63190-0.

4. Gaaloul N, Braiek OB, Berjeaud JM, Arthur T, Cavera VL, Chikindas ML, Hani K and Ghrairi T. Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus italicus* GGN10 strain isolated from Tunisian bovine raw milk. J. Food Saf. 2014;(34):300-311. doi:10.1111/jfs.12126.

5. Methods in Microbiology / Eds F Rainey and A Oren. Academic Press, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00020-6>.

6. Sukontasing S, Tanasupawat S, Moonmangmee S, Lee J-S and Suzuki K. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007;(57):2151-2154. doi:10.1099/ijs.0.65109-0.

7. Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, and Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 1996;(60):407-438.

8. http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf.

Стаття надійшла до редакції 27.08.2018 р.

