

BİOLOGİYA

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И НЕКОТОРЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ТРАДИЦИОННЫХ СЫРОВ АЗЕРБАЙДЖАНА

**А.Ф.АХМЕДОВА, С.Г.ГЮЛЬАХМЕДОВ,
Р.С.МУСТАФАЕВА, А.А.КУЛИЕВ**

*Бакинский Государственный Университет
biochem@mail.az*

Целью данной работы было изолирование и изучение штаммов МКБ, продуцирующих протеолитические ферменты, из традиционных сыров Азербайджана. 6 штаммов МКБ были изолированы и идентифицированы как продуценты протеолитических ферментов при помощи электрофоретического анализа гидролиза белков молока. Наличие гидролиза белков молока проверяли с помощью электрофореза в додецилсульфат-натрий-полиакриламидном геле. Протеолитические энзимы выделяемые исследуемыми штаммами расщепляли α_{S1} -, α_{S2} -, и β -казеины, а также α -лактоглобулин (БЛГ) молока. Ферментативная активность изолированных штаммов также была изучена с помощью API-ZYM системы. Все штаммы проявили C-4 эстераза и C-8 эстераза липаза активность, а также фосфогидролитическую и кислотно-фосфотазную активность, что показывает их потенциально положительную роль для производства ферментированных молочных продуктов. Полученные штаммы МКБ являются потенциальными кандидатами в качестве стартерных культур для использования в молочной промышленности.

Молочнокислые бактерии (МКБ) широко используются в пищевой промышленности в производстве ферментированных молочных продуктов, таких как сыры и йогурты. Некоторые метаболиты МКБ напрямую или опосредованно влияют на вкусовые, ароматические и текстурные свойства, а также на созревание ферментированных молочных продуктов [13].

Рост и развитие МКБ в молочных продуктах являются важными условиями для проявления их метаболической активности. Это обеспечивается протеолитической системой МКБ, которая является многокомпонентной и выполняет ряд важных функций [1]. Как известно, молоко богато различными белками, из которых 80% составляют казеины. МКБ для роста и развития нуждаются в аминокислотах и как источник аминокислот используют казеины молока. Протеолитическая система МКБ обеспечивает их аминокислотами, необходимыми для роста и жизнедеятельности, и состоит из 3 компонентов:

экзопротеазы, которые связаны с клеточной стенкой и осуществляют первоначальный гидролиз казеинов молока до олигопептидов; транспортная система – осуществляет транспорт олигопептидов через клеточную стенку в цитоплазму; эндопептидазы – большое количество олиго-ди и трипептидаз, которые осуществляют дальнейший гидролиз внутри клетки до аминокислот [9]. Кроме того, гидролиз казеинов играет важную роль в созревании и формировании текстуры ферментированных молочных продуктов [11].

Данные о протеолитической системе нестартерных МКБ, которые являются доминирующей микрофлорой традиционных сыров домашнего производства, крайне ограничены. Изолирование и изучение протеолитических штаммов МКБ из ферментированных молочнокислых продуктов открывает огромные перспективы в плане разработки новых стартерных культур. Более того, применение протеолитических штаммов МКБ в качестве стартерных культур позволит снизить аллергенность молочных белков и разработать гипоаллергенные молочные продукты, а также ферментированные продукты содержащие биологически активные пептиды [3, 12].

Целью данной работы было изолирование и изучение штаммов МКБ, производящих протеолитические ферменты, из традиционных сыров Азербайджана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Скрининг БПИВ-продуцирующих штаммов МКБ. Штаммы МКБ были изолированы из 13 сортов традиционных сыров Азербайджана, приготовленных в домашних условиях. Образцы сыров были приобретены из различных регионов Азербайджана, различающихся своими экологическими, климатическими, рельефными особенностями. 1 г каждого образца сыра гомогенизировали в физиологическом растворе (0,9% м/о) NaCl с последующим десятикратным разбавлением. Затем из различных степеней разбавления делали высып (1 мл) на чашки Петри, куда предварительно наливали 18 мл агаризованной (1,5%) МРС-среды и 2 мл обезжиренного молока. Чашки Петри культивировали 48ч при температуре 37°C. Колонии, продуцирующие зоны просветления на поверхности молоко-среды были первично идентифицированы как продуценты протеолитических энзимов [14] и были перенесены в МРС-среду для дальнейшей очистки. Изолированные штаммы были идентифицированы как МКБ на основе микробиологических тестов (Грамм тест, каталаза тест, морфологически). Чистые культуры изолированных МКБ хранили в виде сток-культур при температуре - 80°C в МРС-среде, содержащей 25% глицерина.

Протеолитическая активность. Изолированные МКБ культивированные в МРС и в M17 среде (16 часов) инокулировали (5 %) в обезжиренное молоко для индукции протеолитических энзимов и инкубировали при 37°C 24 ч. В качестве контроля использовали молоко без добавления культуры МКБ. Наличие гидролиза белков молока проверяли с помощью электрофореза в 12% додецилсульфат-натрий-полиакриламидном геле (ДС-На-ПААГ), с концентрацией акриламида 12%.

Электрофорез был проведен в аппарате Mini Protean II Gel Electrophoresis (Bio-Rad Hercules, Калифорния, США) по методу Laemmli [10]. Образцы ферментированного молока для введения в гель смешивались в равном количестве с раствором для введения образцов в гель (ДС-На 4%; Трис HCl 50 mM pH 6,8;

глицерин 20%; бромфенол синий; β -меркаптоэтанол) и подвергались термической обработки для денатурации белков (100°C 3 мин).

API-ZYM тест. Свежие культуры изолированных МКБ разбавляли для получения оптической плотности (600nm) в пределах от 10 до 12. Полученные разбавленные культуры центрифугировали для осаждения клеток (5000 об/мин, % мин). Клетки были разбавлены в 2.5 мл дистиллированной воды и полученные суспензии использовали для нанесения на API-ZYM стрипы (Bio-Merieux, Франция). Тест проводили в соответствии с инструкцией производителя. Энзиматическая активность оценивалась в виде чисел от 0 (отсутствие активности) до 5 (максимальная активность), соответственно, цветовому окрашиванию стрипов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для первичного скрининга протеолитических МКБ мы использовали селективную среду, содержащую обезжиренное молоко [14]. Изолирование штаммов осуществлялось, как уже было описано в разделе Материалы и методы. Позитивным параметром для скрининга протеолитических колоний являлось появление зон просветления на поверхности молоко-среда в чашках Петри. Из 13 экземпляров сыров мы получили 38 колоний, продуцирующих зоны просвятления (рисунок 1). Колонии были первоначально признаны как продуценты протеолитических энзимов и были перенесены в MPC-среду для дальнейшей очистки. Изолированные штаммы были идентифицированы как МКБ на основе микробиологических тестов (Грамм тест, каталаза тест, морфологически). Из 38 изолированных позитивных штаммов 34 были грамм-положительными и каталаза-негативными, и, таким образом, были идентифицированы как МКБ. Микроскопическое исследование показало, что из них 8 штаммов являются бациллами, остальные кокками, образующими цепочки средних размеров.

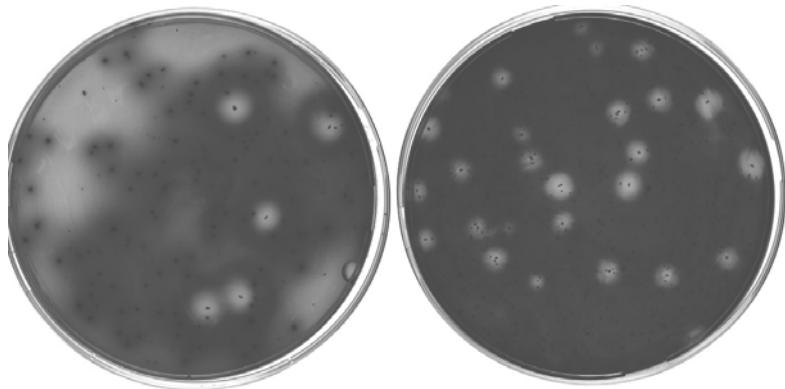


Рис. 1. Скрининг протеолитических колоний на чашках Петри.

Дальнейшие эксперименты были направлены на подтверждение продукции протеолитических энзимов изолированными штаммами. Для этого мы использовали метод электрофоретического исследования гидролиза белков молока. Этот метод позволяет не только наглядно увидеть расщепление белков

и образующиеся при этом пептиды, но также определить субстрат специфичность протеаз МКБ. Для этого МКБ культивированные в MPC (бациллы) и в M17 (кокки) среде (16 часов) инокулировали в обезжиренное молоко и инкубировали при 37°C 24 ч. При использовании этого метода протеолитическая активность проверяется в условиях экспоненциальной фазы роста клеток и неконтролируемых значениях pH среды. Все исследуемые штаммы проявили способность роста в молоке, поскольку через 24 ч инкубации наблюдалось коагуляция молока и кислые значения pH среды.

Анализ гелей после электрофореза показал, что только 6 штаммов из исследуемых 34 расщепляли белки молока (рис. 2). Как известно, протеолитическая активность каждого штамма строго специфична и зависит от многих факторов, в том числе и от значений кислотности среды. МКБ продуцируют экзопротеазы, которые обладают различными оптимумами pH [5]. Мы можем предположить, что в условиях эксперимента не все штаммы смогли проявить активность в связи с кислым значением среды. Возможно, что штаммы, не проявившие активность продуцируют протеазы с нейтральным pH оптимумом.

Как видно на геле, протеолитические энзимы выделяемые исследуемыми штаммами расщепляли α_{s1} -, α_{s2} -, и β -казеины, а также α -лактоглобулин (БЛГ). Тем не менее, ни для одного из штаммов не наблюдался гидролиз α -лактоальбумина (АЛА). Наибольший процент гидролиза наблюдался для β -казеина. Гидролиз α_{s1} -, α_{s2} -казеинов протеолитическими энзимами штаммов был более слабым. Похожие результаты наблюдались и в других исследованиях, где авторы наблюдали, что протеазы МКБ расщепляют β -казеин легче чем другие казеины молока [4, 15, 17].

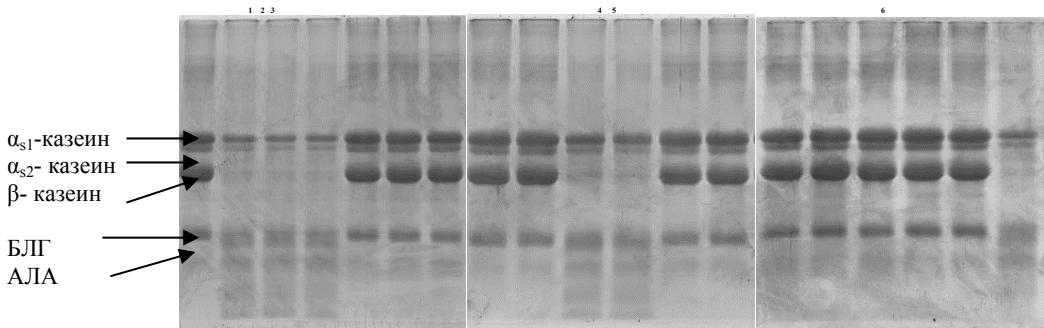


Рис. 2. Протеолитическая активность изолированных штаммов МКБ на геле. Линии 1-6 - Штаммы AN1, A12-1, A12-2-1, A12-4, A12-3-2 и A7-1, соответственно.

Различают 2 основных класса протеаз согласно их субстрат-избирательности: протеазы класса I – расщепляют исключительно β -казеин молока; протеазы класса III – расщепляют α_{s1} -, α_{s2} -, и β -казеины молока [9]. Исходя из этой классификации, мы можем заключить, что протеазы, продуцируемые нашими штаммами МКБ относятся к классу III.

Морфологические и некоторые физиологические характеристики исследуемых протеолитических штаммов описаны в таблице 1. Все 6 штаммов являются грамм-положительными, каталаза-негативными кокками, образующими цепочки средних размеров. Все они проявили способность роста при температуре

ре 45°C и в присутствии 6%NaCl. Согласно литературным данным все эти физиологические и морфологические параметры характерны для рода *Enterococci* [6, 8]. Однако более точная идентификация необходима для окончательного заключения.

Таблица 1

Морфологические и физиологические свойства изолированных штаммов МКБ

Свойства	Штаммы					
	AN1	A12-1	A12-2-1	A12-4	A12-3-2	A7-1
Окрашивание по Грамму	Гр+	Гр+	Гр+	Гр+	Гр+	Гр+
Морфология клетки	кокки	кокки	кокки	кокки	кокки	кокки
Каталаза активность	+	+	+	+	+	+
Рост при 30°C	+	+	+	+	+	+
Рост при 45°C	+	+	+	+	+	+
Рост при 4%NaCl	+	+	+	+	+	+
Рост при 6%NaCl	+	+	+	+	+	+

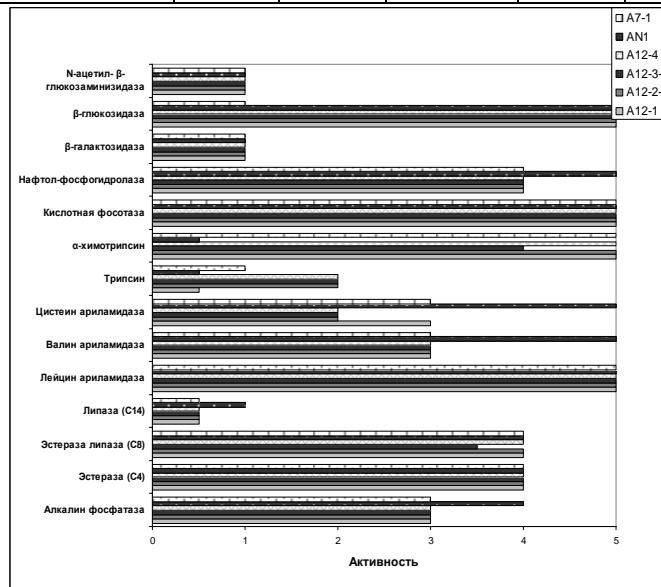


Рис. 3. Ферментативная активность исследуемых штаммов определенная с помощью API-ZYM системы.

На рис. 3 показана ферментативная активность исследуемых штаммов определенная нами с помощью API-ZYM системы. Все штаммы проявили C-4 эстераза и C-8 эстераза липаза активность, но в то же время очень слабую C-14 липаза активность. Полученные результаты соответствуют данным литературы об энтерококках, где описывается, что их эстеролитическая система более эффективна, чем липополитическая, что дает им возможность гидролизовать молочные жиры [8, 16]. C-4 эстераза и C-8 эстераза активность увеличивает концентрацию короткоцепочных жирных кислот и придает пикантный вкус сырам [18]. Исследованные штаммы также проявили фосфогидролитическую и

кислотно-фосфотазную активность, что очень важно для гидролиза фосфопептидов при созревании сыров [2, 7].

Результаты нашей работы позволяют заключить, что полученные штаммы МКБ обладают хорошими технологическими данными для потенциального использования в качестве стартерных культур в молочной промышленности. Однако, необходимы дальнейшие исследования их протеолитической активности, пробиотических свойств и безопасности для потребителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bjurlin M.A., Bloomer, S., Nelson, C.J. // Biotechnology Letters, 2002, v.24, p.191–195.
2. Centeno J. A., Menendez S., Hermida M., Rodriguez-Otero J.L. // International Journal of Food Microbiology, 1999, v.48, p.97-111.
3. Cross M.L., Stevenson L.M., Gill H.S. // Int. Immunopharmacol., 2001, v. 1, p. 891-901.
4. El-GhaishS., Dalgalarondo M., Choiset Y., Sitohy M., Ivanova I., Haertlé T., Chobert J.-M. // European Food Research and Technology, 2010, v.230, p.635-643.
5. Fira D., Kojic M., Banina A., Spasojevic I., Strahinic I., Topisirovic L. // Journal of Applied Microbiology, 2001, v.90, p.123-130.
6. Foulquié-Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., de Vuyst, L. // International Journal of Food Microbiology, 2006, v.106, p.1-24.
7. Franz C.M., Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H. // International Journal of Food Microbiology, 2003, v.88, p.105-122.
8. Giraffa G. // International Journal of Food Microbiology, 2003, v.88, p.215-222.
9. Kunji E.R.S., Mierau I., Hagfing A., Poolman B.I., Konings W.N. // Antonie van Leeuwenhoek, 1996, v.70, p.187-221.
10. Laemmli U.K. // Nature, 1970, v.227, p.680-685.
11. Lawa J. and Haandrikmat A. // Dairy Journal, 1997, v.7, p.116-120.
12. Meisel H. and Bockelman W. // Antonie van Leeuwenhoek, 1999, v.76, p.207–215.
13. Ong L., Henriksson A., Shah N.P. // International Dairy Journal, 2006, v.16, p.446-456.
14. Pailin T., Kang D. H., Schmidt K., Fung D.Y.C. // Letters in Applied Microbiology, 2001, v.33, p.45-49.
15. Psoni L., Kotzamanides C., Andrighto C., Lombardi A., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. // International Journal of Food Microbiology, 2006, v.109, p.109-120.
16. Sarantinopoulos P., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. // Applied and Environmental Microbiology, 2001, v.67, p.5482-5487.
17. Suzzi G., Caruso M., Gardini F., Lombardi A., Vannini L., Guerzoni M.E., Andrighto C., Lanorte M.T. // Journal of Applied Microbiology, 2000, v.89, p.267-274.
18. Tsakalidou E., Manolopoulou E., Tsilibari V., Georgalaki M., Kalantzopoulos G. // Netherlands Milk and Dairy Journal, 1993, v.47, p.145-150.

AZƏRBAYCANIN ƏNƏNƏVİ PENDİRLƏRİNĐƏN AYRILMIŞ SÜD TURŞUSU BAKTERİYALARIN PROTEOLİTİK AKTİVLİYİ VƏ BƏZİ TEXNOLOJİ XÜSUSİYYƏTLƏRİ

A.F.ƏHMƏDOVA, S.Q. GÜLƏHMƏDOV, R.S.MUSTAFAYEVA, A.Ə.QULİYEV

XÜLASƏ

Tədqiqatın əsas məqsədi Azərbaycan Respublikasında ev şəraitində ənənəvi üsullarla hazırlanmış pendirlərdən proteolitik fermentlər ifraz edən STB-ları ayırmayaq və onların proteolitik sistemini öyrənmək olmuşdur. Proteolitik aktivlik nümayiş etdirən 6 STB ştamı ayrılmışdır və onların proteolitik aktivliyi elektroforetik üsulla yoxlanılmışdır. Ayrılmış

Ştamlar bütün kazein fraksiyalarını və zərdab zülallarının BLG fraksiyasını hidroliz etmişdir. Ştamların enzimatik aktivliyi, həmçinin API-ZYM sistemi vasitəsilə tədqiq olunmuşdur. Onlar C-4 esteraza, C-8 esteraza lipaza, fosfohidrolaza və turş fosfotaza aktivliyini nümayiş etdirmişlər, hansı ki, süd məhsullarının keyfiyyətinin, dad xüsusiyyətlərinin, teksturasının formalaşmasında mühüm rol oynayır. Ayrılmış fəal ştamlar proteolitik fermentlərin potensial produsentləridir. Bu ştamların öyrənilməsini davam etdirmək, onların ifraz etdiyi maddələrin təbiətini daha dərinlən tədqiq etmək yeni probiotik ştamlar əldə etmək imkanı yaradacaq.

PROTEOLYTIC ACTIVITY AND SOME TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA FROM TRADITIONAL AZERBAIJANI CHEESES

A.F.AHMADOVA, S.G. GYULAHMADOV, R.S.MUSTAFAYEVA, A.A.GULIYEV

SUMMARY

The aim of this study is to screen and isolate natural LAB isolates with proteolytic activities from different traditional homemade dairy products of Azerbaijan. For preliminary screening of proteolytic enzymes producing strains, skim milk agar technique was used. Six LAB isolates were obtained and their proteolytic activity was measured in milk by SDS-PAGE analysis. Isolated strains were able to hydrolyze α_{S1} -, α_{S2} -, and β -caseins, and β -lactoglobulin (BLG) fractions of milk. Extracellular enzymatic activity of the strains was also tested using the API-ZYM system. All the strains exhibited C-4 esterase, C-8 esterase lipase, phosphohydrolase and acid phosphatase activities, which are essential for flavour formation and hydrolysis of phosphopeptides during cheese ripening. According to the obtained data, our isolates are potential candidates for application as starter cultures in the fabrication of fermented milk products and may exert their influence on the technological and sensory properties of cheeses.