

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ФИЛЛОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ

PROTEOLITIC ACTIVITY OF LACTIC BACTERIA ISOLATED FROM THE PHYLLOSHERE OF PLANTS

**S. Mirzaeva
K. Ganbarov**

Summary. This work is devoted to the study of the protease activity of lactic acid bacteria isolated from the phyllosphere of fruit plants in Azerbaijan. It was shown that a relatively high protease activity in bacteria of the genus *Lactobacillus* was observed in *L.helveticus* and *L.plantarum*, in the genus *Leuconostoc* — *L.citreum*, in the genus *Pedicoccus* — *P.cerevisiae*, in the genus *Peptococcus* — *P.niger*, and in the genus *Streptococcus* — *S.lactis*. It should be noted that strains and species of the same genus did not differ significantly in protease activity. However, the studied lactic acid bacteria differed significantly in protease activity at the genus level. Significant protease activity was shown by all representatives of the genera *Lactobacillus* and *Streptococcus*. Bacteria of the genera *Leuconostoc* and *Peptococcus* showed the least protease activity. Bacteria of the genus *Pedicoccus* occupied a middle position in terms of protease activity. Thus, the protease activity in representatives of the genera *Lactobacillus* and *Streptococcus* was 22.2–27.1 times greater than in bacteria of the genus *Leuconostoc*, 7.4–9.6 times greater than in bacteria of the genus *Peptococcus* and 2.1–2.6 times more than bacteria of the genus *Pedicoccus*.

Keywords: protease activity, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pedicoccus*, *Peptococcus*, *Leuconostoc*.

Мирзаева Шабнам Адалат

Докторант, Ленкоранский Государственный
Университет

sebnemmirzeyeva88@gmail.com

Ганбаров Худаверди Ганбар

Доктор биологических наук профессор, Бакинский
Государственный Университет
khudaverdig@mail.ru

Аннотация. Настоящая работа посвящена к изучению протеазной активности молочнокислых бактерий, выделенных из филлосферы плодовых растений Азербайджана. Было показано, что относительная высокая протеазная активность у бактерий рода *Lactobacillus*, наблюдалась у *L. helveticus* и *L.plantarum*, у рода *Leuconostoc* — *L.citreum*, у рода *Pedicoccus* — *P.cerevisiae*, у рода *Peptococcus* — *P.niger*, а у рода *Streptococcus* — *S. lactis*. Следует отметить что штаммы и виды одного и того же рода по протеазной активности существенно не отличались между собой. Однако, исследованные молочнокислые бактерии по протеазной активности на уровне рода существенно отличались между собой. Значительную протеазную активность показали все представители родов *Lactobacillus* и *Streptococcus*. Наименьшую протеазную активность проявляли бактерии родов *Leuconostoc* и *Peptococcus*. Бактерии рода *Pedicoccus* по протеазной активности занимали среднее положение. Так протеазная активность у представителей родов *Lactobacillus* и *Streptococcus* была в 22,2–27,1 раз больше по сравнению с бактериями рода *Leuconostoc*, в 7,4–9,6 раза больше, чем у бактерий рода *Peptococcus* и в 2,1–2,6 раза больше чем у бактерий рода *Pedicoccus*.

Ключевые слова: протеазная активность, молочнокислые бактерии, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pedicoccus*, *Peptococcus*, *Leuconostoc*.

Молочнокислые бактерии широко применяются в пищевой промышленности и в медицине. Метаболиты молочнокислых бактерий напрямую или опосредственно влияют на вкусовые, ароматические и текстурные свойства, а также на созревание ферментированных молочных продуктов (Ахмедова и др., 2010; Kermanshahi, Peymanfar, 2012).

Рост и развитие молочнокислых бактерий в молочных продуктах являются важными условиями для проявления их метаболической активности. Это обеспечивается протеолитическими ферментами молочнокислых бактерий, которые являются многокомпонентной и выполняет ряд важных функций (Oberg et al., 2002). Молоко богато различными белками, из которых 80% составляет казеин. Молочнокислые бактерии для

роста и развития нуждаются в аминокислотах и как источник аминокислот используют казеин молока. Протеолитическая система молочнокислых бактерий обеспечивает их аминокислотами, необходимыми для роста и жизнедеятельности (Molkness, 2003; Xu et al., 2015). Кроме того, гидролиз казеинов играет важную роль в созревании и формировании текстуры ферментированных молочных продуктов (Li et al., 2014).

Изолирование молочнокислых бактерий и изучение протеолитической активности позволяет разработать новые штаммы в качестве заквасок. Более того, применение молочнокислых бактерий обладающие высокой протеолитической активностью, позволяют снизить аллергичность молочных белков и разработать гипоаллергенные молочные продукты, а также молочные

Таблица 1. Протеазная активность штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*

№	Виды и штаммы бактерий	Протеазная активность, ед/мг белка
1	<i>L.acidophilus</i> LDU-127	3,8 ± 0,14
2	<i>L.brevis</i> LDU-183	5,1 ± 0,26
3	<i>L.brevis</i> LDU-129	5,6 ± 0,24
4	<i>L.helveticus</i> LDU-159	8,2 ± 0,40
5	<i>L.paracasei</i> LDU-9	4,3 ± 0,21
6	<i>L.paracasei</i> LDU-170	4,8 ± 0,22
7	<i>L.plantarum</i> LDU-20	7,0 ± 0,28
8	<i>L.plantarum</i> LDU-136	7,2 ± 0,30

продукты содержащие биологически активные пептиды (Fadda et.al.,2012; Mezaini, Bouras, 2013).

Настоящая работа посвящена изучению протеолитической активности молочнокислых бактерий, выделенных из плодовых растений Азербайджана.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта использовали штаммы и виды молочнокислых бактерий родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Peptococcus* и *Streptococcus* из коллекции культур микроорганизмов Бакинского Государственного Университета, выделенные из флоры плодовых растений Азербайджана (Мирзаева, 2020; Mirzayeva, 2020).

Бактериальные культуры выращивали на среде "MRS" следующего состава (г/л): глюкоза-20,0; дрожжевой экстракт-5,0; пептон-10,0; мясной экстракт-1,0; аммоний цитрат -2,0; натрий ацетат-5,0; KH_2PO_4 -2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,05 при температуре 37°C в течение 24 часов. Биомассу отделяли фильтрованием и культуральную жидкость центрифугировали при 10.000 об/мин в течение 30 мин и надосадочную жидкость использовали в качестве ферментного раствора.

Активность протеазы определяли спектрофотометрически по методу Апсона в модификации (Дудка и др., 1982). В качестве субстрата фермента использовали 2% раствор казеината натрия. Раствор фермента (1 мл) помещали в водяной термостат при температуре 37°C на 10–15 мин. Затем добавляли 1 мл раствор субстрата, перемешивали и инкубировали при температуре 30°C на 1 мин. Реакцию останавливали добавлением равного объема 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУК). Контрольный опыт готовили также, только перед внесением раствора субстрата к реакционной смеси добавляли 10%-ный раствор ТХУК. Раствор фильтровали и в фильтрате спектрофотометрически определяли количество неосажденного ТХУ кислотой продукта реакции (тирозина).

За единицу активности принимали такое количество фермента, которое за 1 минуту при температуре 37°C превращает казеинат натрия в неосаждаемое состояние ТХУ кислотой в количестве (0,181 мг), соответствующей 1 мк моль /мин/мг белка (ед/мг белка).

Содержание белка в культурной жидкости определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм (Withakker,1980). Все опыты проводили в 4-х повторностях и статистически обрабатывали (Кобзарь,2006). Для установления достоверности данных использовали следующую формулу:

$$P = m/M \leq 0,05$$

P- критерия Стьюдента, m- квадратичное отклонение, M-среднее число повторов

Результаты и их обсуждение

Для определения протеазной активности молочнокислых бактерий отобрали штаммы, обладающие высокой антимикробной активностью (Мирзаева, Ганбаров, 2022).

Среди штаммов рода *Lactobacillus* удельная протеазная активность варьировалась в пределах 3,8–8,2 ед/мг белка. Высокая активность фермента наблюдалась у штаммов *L.helveticus* LDU-159, *L.plantarum* LDU-132 и LDU20, у которых активность была в 1,5–2,2 раза больше по сравнению с штаммами *L.acidophilus* LDU-127, *L.brevis* LDU-129 и LDU-183 *L.paracasei* LDU-9 и LDU-170 (табл. 1). Следовательно, наибольшая протеазная активность проявляли виды *L.helveticus* и *L.plantarum*.

Среди представителей бактерий рода *Leuconostoc* высокую протеазную активность проявлялась у *L.citreum* LDU-31, у которой активность была в 1,3; 1,9 и 2,5 раза, соответственно, больше чем у *L.lactis* LDU-71, *L.mesenteroides* LDU-100 и LDU-6 (табл. 2)

Таблица 2. Протеазная активность штаммов молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc*

№	Виды и штаммы бактерий	Протеазная активность, ед/мг белка
1	<i>L.citreum</i> LDU-31	0,35 ± 0,017
2	<i>L.lactis</i> LDU-71	0,26 ± 0,012
3	<i>L.mesenteroides</i> LDU-6	0,14 ± 0,006
4	<i>L.mesenteroides</i> LDU-100	0,18 ± 0,009

Таблица 3. Протеазная активность штаммов молочнокислых бактерий рода *Pedicoccus*

№	Виды и штаммы бактерий	Протеазная активность, ед/мг белка
1	<i>P.acidilactici</i> LDU-42	1,8 ± 0,08
2	<i>P.cerevisiae</i> LDU-19	3,2 ± 0,15
3	<i>P.cerevisiae</i> LDU-158	3,0 ± 0,14
4	<i>P.halophilus</i> LDU-85	2,7 ± 0,13
5	<i>P.pentasaceus</i> LDU-8	2,2 ± 0,10

Таблица 4. Протеазная активность штаммов молочнокислых бактерий рода *Peptococcus*

№	Виды и штаммы бактерий	Протеазная активность, ед/мг белка
1	<i>P.activus</i> LDU-26	0,71 ± 0,035
2	<i>P.activus</i> LDU-157	0,68 ± 0,033
3	<i>P.aerogenes</i> LDU-144	0,48 ± 0,023
4	<i>P.niger</i> LDU-209	0,85 ± 0,042

Таблица 5. Протеазная активность штаммов молочнокислых бактерий рода *Streptococcus*

№	Виды и штаммы бактерий	Протеазная активность, ед/мг белка
1	<i>S.aureus</i> LDU-171	5,8 ± 0,24
2	<i>S.bovis</i> LDU-56	6,6 ± 0,32
3	<i>S.cremoris</i> LDU-35	5,4 ± 0,25
4	<i>S.lactis</i> LDU-155	8,1 ± 0,36
5	<i>S.salivarius</i> LDU-164	4,6 ± 0,22
6	<i>S.salivarius</i> LDU-15	4,0 ± 0,18

У бактерий рода *Pedicoccus* высокая протеазная активность наблюдалась у *P.cerevisiae* LDU-19 и LDU-158, у которых активность в 1,2; 1,5 и 1,8 раза, соответственно, больше по сравнению с *P.halophilus* LDU-85, *P.pentasaceus* LDU-8 и *P.acidilactici* LDU-42 (табл. 3). Следовательно, наибольшая протеазная активность проявлялась у *Pedicoccus cerevisiae*.

Бактерии рода *Peptococcus* обладали низкую протеазную активность. Однако, наибольшая активность наблюдалась у *Peptococcus niger* LDU-209, у которого протеазная активность в 1,2; 1,3 и 1,8 раза, соот-

ветственно, была больше по сравнению с штаммами *P.activus* LDU-26, *P.activus* LDU-157 и *P.aerogenes* LDU-144 (табл. 4)

У исследованных представителей бактерий рода *Streptococcus* протеазная активность варьировалась в пределах 4,0–8,1 ед/мг белка. Наибольшая активность наблюдалась у штамма *Streptococcus lactis* LDU-155, у которого активность фермента в 1,2; 1,4; 1,5; 1,8 и 2,0 раза была больше, соответственно, чем у *S.bovis* LDU-56, *S.aureus* LDU-171, *S.cremoris* LDU-35, *S.salivarius* LDU-15 и LDU-164 (табл. 5).

Таким образом, из представленных в таблицах данных видно, что относительная высокая протеазная активность у бактерий рода *Lactobacillus* наблюдалась у *L. helveticus* и *L. plantarum*, у рода *Leuconostoc* — *L. citreum*, у рода *Pedococcus* — *P. cerevisiae*, у рода *Peptococcus* — *P. niger*, а у рода *Streptococcus* — *S. lactis*. Следует отметить что штаммы и виды одного и того же рода по протеазной активности существенно не отличались между собой. Однако исследованные молочнокислые бактерии по протеазной активности существенно отличались между собой на уровне рода. Значительную протеазную активность показали все представители родов *Lactobacillus* и *Streptococcus*. Эти данные согласуются

с литературными данными, где показано высокая протеазная активность представителей родов *Lactobacillus* и *Streptococcus* (Courtin et al., 2012).

Наименьшую протеазную активность проявляли бактерии родов *Leuconostoc* и *Peptococcus*. Бактерии рода *Pedococcus* по протеазной активности занимали среднее положение. Так, протеазная активность у представителей родов *Lactobacillus* и *Streptococcus* была в 22,2–27,1 раз больше по сравнению с представителями рода *Leuconostoc*, в 7,4–9,6 раза больше, чем у бактерий рода *Peptococcus* и 2,1–2,6 раза больше, чем у бактерий рода *Pedococcus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахмедова А.Ф., Гюльяхмедов С.Г., Мустафаева Р.С., Кулиев А.А. — Протеолитическая активность и некоторые технологические свойства молочнокислых бактерий, изолированных из традиционных сыров Азербайджана. «Вести Бакинского Государственного Университета». Серия естественных наук, 2010, № 4, с. 45–51
2. Kermanshahi R., Peymanfar S. Isolation and identification of Lactobacilli from cheese, yoghurt and silage by 16SrDNA gene and study of bacteriocin and biosurfactant production // Jundishapur Journal of Microbiology, 2012, Vol. 5(4), P. 528–532
3. Oberg C.J., Broadben J.R., Strickland M., Momahon D. Diversity in specificity of the extracellular proteinases in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgarius* // Letters in Applied microbiology, 2012, Vol.34, P. 455–460.
4. Molkness T. Growth of the lactic acid bacteria on the medium, containing organic acids // Archeve of microbiology, 2003, Vol.59, № 5, P. 14–17.
5. Xu Y., Dai M., Zang J., Jiang Q., Xia W. Purification and characterization of an Extracellular acidic protease of *Pedococcus pentosaceus* isolated from fermented fish // Food Science and Technology Research, 2015, Vol.21, № 5, P. 739–744.
6. Li C.h., Xu D.F., Zhao M.M., Sum L.F., Wang Y.L. Production optimization, purification and characterization of a novel acid protease from a fusand *Lactobacillus casei* // Eur.food Res. Technol., 2014 Vol.238, p. 905–917
7. Fadda S., Oliver G., Vignola G. Protein degradation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in a sousage model system // Jour.Food sciences, 2012, Vol.67, P. 1179–1183.
8. Mezaini A., Bouras A. Antibacterial activity and probiotic properties of some lactic acid bacteria isolated from dairy products // African journal of Biotechnology, 2013, Vol. 12(20), P. 2949–2956
9. Мирзаева Ш.А. Родовой состав молочнокислых бактерий, распространенных на наземных органах шелковицы на территории Азербайджана/2-nd International scientific and practical Conference "Integration of education, science and business in modern environment". Dnipro(Ukraine), 2020, P. 322
10. Mirzayeva S.A. Generic composition of the Lactic acid bacteria isolated from the phyllosphere of plants in the Azerbaijan // Advances in Biology and earth sciences, 2020, Vol.5, № 3, P. 213–217.
11. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А., Коваль Э., Гербик Л., Билай В.И., Билай Т.И. и др. «Методы экспериментальной микологии», Киев, Наукова Думка, 1982 с. 550.
12. Withakker F.R., Granna P.E. An absolute method for protein determination based of differences in absorbance at 235 and 260 nm // Analytical Biochemistry, 1980, Vol.109, P. 156–159.
13. Кобзарь А.И. «Прикладная математическая статистика» Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2019, с. 816.
14. Мирзаева Ш.А., Ганбаров Х.Г. Антимикробная активность штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из филлосферы плодовых деревьев // Научно-практический журнал Современная наука, Серия естественные и технические науки, 2022, № 7, с. 7–12.
15. Courtin P., Monnet V., Rus F. "Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk // Microbiology, 2012, vol.148, p. 3413–3421.