

УДК: 581.19:577.157

Мустафаева Р.С., Гюльяхмедов С.Г., Кулиев А.А.
Бакинский государственный университет

ВЛИЯНИЕ ПРОТЕАЗ ШТАММА ENTEROCOCCUS FAECALIS AN1 НА ОБРАЗОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ КАЗЕИНОВ И ИХ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ В УСЛОВИЯХ IN VITRO СТИМУЛИРОВАННОЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ

R. Mustafayeva, S. Qulahmadov, A. Kuliyeu
Baku State University (Baku, Azerbaijan)

EFFECT OF PROTEASES FROM STRAIN ENTEROCOCCUS FAECALIS AN1 ON LIBERATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM CASEINS AND THEIR STABILITY IN THE IN VITRO SIMULATED GASTROINTESTINAL SYSTEM

Аннотация. Целью исследования было изучить потенциал протеолитического штамма *Enterococcus faecalis* AN1, генерировать антимикробные пептиды из казеинов, а также определить влияние последующего гидролиза пепсином и панкреатином в условиях *in vitro* симулированной желудочно-кишечной системы на данную активность. Анализ гидролиза субстрата и образования пептидов проводили при помощи SDS-ПААГ-электрофореза и ОФ ВЭЖХ. Гидролизат казеинов протеазами штамма проявил антимикробную активность против *Listeria monocytogenes* EGDe107776. Антимикробная активность в гидролизате сохранялась после гидролиза пепсином, однако при воздействии панкреатина полностью исчезла. Более того, предварительный гидролиз казеинов протеазами штамма *Enterococcus faecalis* AN1 улучшал их переваривание пепсином. Исследуемый штамм обладает потенциалом в производстве функциональных молочных продуктов.

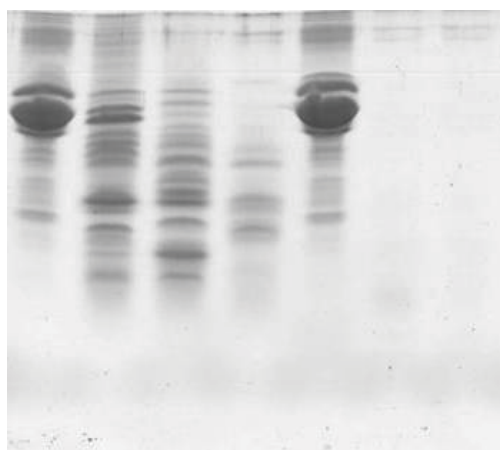
Ключевые слова: протеазы, казеины, антимикробные пептиды.

Abstract. The aim of the present research was to study the effect of proteolytic strain *Enterococcus faecalis* AN1 on liberation of casein-derived antimicrobial peptides, as well as also to determine the influence of the subsequent hydrolysis by pepsin and pancreatin in the *in vitro* stimulated gastrointestinal system on this activity. The protein hydrolysis and peptide production were analyzed with the help of SDS PAGE and RP-HPLC. The peptides released upon hydrolysis of caseins with the studied strain presented antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* EGDe107776. Antimicrobial activity of casein-derived peptides was stable after pepsin hydrolysis; however, the effect totally disappeared after pancreatic digestion. Moreover, prehydrolysis of caseins by proteases from strain *Enterococcus faecalis* AN1 increased their digestion by pepsin. The strain under study could be a potential starter for production of functional dairy products.

Key words: proteases, caseins, antimicrobial peptides.

Молоко является богатым источником биологически активных пептидов, обладающих антимикробной, АПФ-ингибирующей, иммуностимулирующей, опиоидной и др. активностями [5; 6]. Примером антимикробных пептидов, образующихся из молочных белков, могут служить казецин, израцидин, лактоферрин и др. [9]. Эти биологически активные пептиды заложены в первичной последовательности молочных белков, таких, как казеины и белки сыворотки молока. Высвобождение биологически активных пептидов происходит в результате протеолитической деградации белков молока и лежит в основе продукции функциональных молочных продуктов.

Протеолиз белков молока – это сложный ступенчатый процесс, который протекает в результате воздействия протеолитических ферментов молока, стартерных культур, используемых в процессе ферментации, а также продолжается в желудочно-кишечной системе конечного потребителя ферментированного молочного продукта. В последнем случае может происходить



I II III
 — — —
 1 2 3 4 5 6

Рис. 1. Протеолиз казеинов протеазами штамма *E. faecalis* AN1, пепсином и панкреатином. Линии 1, 3, 5 соответствуют контролям, линии 2, 4, 6 гидролизатам казеинов штаммом *E. faecalis* AN1. I этап – гидролиз штаммом, II этап – гидролиз пепсином, III этап – гидролиз панкреатином.

как образование, так и деградация ранее высвобожденных биологически активных пептидов в результате расщепления активной аминокислотной последовательности.



Рис. 2. Хроматографический профиль пептидов, образующихся при гидролизе казеинов протеазами штамма *Enterococcus faecalis* AN1.

Протеолитическая система молочнокислых бактерий (МКБ) 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 пептидов внутри клетки до аминокислот [7]. Первичный гидролиз казеинов молока осуществляется протеазами МКБ, присутствующих как в качестве стартерных, так и в качестве добавочных культур в ферментированных молочных продуктах [3]. Изучение протеолитической активности МКБ имеет большое практическое значение. Протеазы МКБ обладают штамм-зависимой специфичностью, что обуславливает образование различных пептидов, которые придают вкус и аромат конечным продуктам, а также обладают биологической активностью [3; 7]. Изучение протеолитических штаммов МКБ позволит разработать функциональные молочные продукты, содержащие биологически активные пептиды.

Целью данной работы было изучить потенциал протеолитического штамма *Enterococcus faecalis* AN1 генерировать антимикробные пептиды из казеинов, а также определить влияние последующего гидролиза пепсином и панкреатином в условиях *in vitro* симулированной желудочно-кишечной системы на данную активность.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Объектом исследования был штамм из лабораторной коллекции МКБ Биологического факультета БГУ – *Enterococcus faecalis* AN1. Данный штамм был изолирован из традиционного азербайджанского сыра и является продуцентом протеолитических ферментов, которые гидролизуют α 1- и β -казеины молока [1]. Штамм хранился при температуре -80°C в MRS среде, содержа-



Рис.3. Хроматографический профиль пептидов, образующихся при гидролизе казеинов и гидролизатов штамма *Enterococcus faecalis* AN1 пепсином.

щей 30% глицерола. Перед использованием, штамм дважды культивировали в MRS среде при температуре 37 °С. Тест-организм *Listeria monocytogenes* EGD_e107776 инкубировали в ВНИ среде при температуре 37 °С.

Протеолиз казеинов проводили согласно Fira и соавт. [4]. Клетки полученные путем центрифугации (8000 об/мин) свежей культуры штамма промывали физиологическим раствором (0.8% NaCl) в присутствии 5мМ ионов Ca²⁺ и разбавляли в фосфатном буфере (100 мМ, рН 7.0) до ОП600 нм, равной 10. Клеточную суспензию смешивали в равных пропорциях с субстратом (Na-казеинат 12 мг/мл) растворенным в том же буфере и инкубировали в течении 3 ч при температуре 37 °С. После инкубации клетки удаляли (центрифугирование, 12000 об/мин) и супернатант проверяли на наличие гидролиза при помощи SDS-ПААГ-электрофореза и ОФ ВЭЖХ. Этот же супернатант использовали для дальнейших экспериментов.

Протеолиз казеинов в условиях *in vitro* симулированной желудочно-кишечной системы проводили по методике, описанной Моцесосу и соавт. [10]. Гидролизат казеинов штаммом, а также нативный субстрат, не подверженный гидролизу клетками штамма (контроль), подвергали дальнейшему гидролизу пепсином и панкреатином. Гидролиз пепсином проводили в течении 1 часа при рН

2.0 и температуре 37 °С. Концентрация пепсина (Sigma, 4720 ЕД/мг протеина) рассчитывалась из соотношения фермент/субстрат 1/400, соответственно. Следующий этап гидролиза проводили панкреатином (Sigma) при рН 8.0 и температуре 37 °С в течении 2 ч. Концентрация панкреатина составляла 0.1% (в/о). После каждого этапа гидролиза гидролизаты анализировали при помощи SDS-ПААГ-электрофореза и ОФ ВЭЖХ.

Анализ гидролиза субстрата и образования пептидов проводили при помощи SDS-ПААГ-электрофореза и обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). SDS-ПААГ-электрофорез с концентрацией акриламида 15% проводили в аппарате Mini Protean II Gel Electrophoresis (Bio-Rad Hercules, Калифорния, США) по методу Laemmli [8]. Гидролизаты смешивали в равном количестве с раствором для введения образцов в гель (SDS 4%; Трис HCl 50 мМ рН 6,8; глицерин 20%; бромфенол синий; β-меркаптоэтанол) и подвергали термической обработке для денатурации белков (100°С, 3 мин).

ОФ ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе «Waters system» (Alliance system, Milford, MA) снабженном колонкой «Symmetry C18» (5 μм, 2.1 мм x 150 мм). Элюирование проводили в условиях линейного градиента раствора В (80% ацетонитрил, 20% деионизированная вода, 0.09% трифторуксусная кислота (ТФУ)) от 0 до 100 % при расходе элюента 0.2 мл/мин. Колонку предварительно промывали раствором А (деионизированная вода, 0.11% ТФУ). Определение осуществляли при длине волны в интервале 220-330 нм при помощи диодного спектрофотометра (модель 996, Waters).

Тестирование гидролизатов на наличие антимикробной активности. Антимикробную активность гидролизатов, полученных после каждого этапа гидролиза, проверяли луночно-диффузным методом [11]. В качестве тест-организма использовали *Listeria monocytogenes* EGD_e107776.

Результаты

Как уже было описано выше, гидролиз казеинов проводился в три этапа: гидролиз протеазами штамма *Enterococcus faecalis* AN1, гидролиз пепсином и гидролиз панкреатином. Профиль протеолиза казеинов на всех указанных этапах показан на Рис. 1. Как видно на рисунке, уже через 3 ч инкубации клеток штамма с субстратом происходил его частичный гидролиз с образованием большого количества пептидов (линия 2). После гидролиза пепсином, профиль пептидов на геле отличался для контроля (субстрат без предварительного гидролиза штаммом) и гидролизата (линии 3 и 4). Из этого можно заключить, что предварительный гидролиз казеинов протеазами штамма *Enterococcus faecalis* AN1 улучшает их переваривание пепсином. После гидролиза панкреатином наблюдалось полное расщепление субстрата, как в случае контроля, так и в случае гидролизата (линии 5 и 6).

Хроматографический профиль пептидов, образующихся при гидролизе казеинов штаммом *Enterococcus faecalis* AN1, показан на Рис. 2. В результате гидролиза казеинов штаммом наблюдалось образование большого количества олигопептидов среднего размера и гидрофобности, а также небольшого числа более гидрофильных пептидов меньшего размера. Гидролизат казеинов протеазами штамма проявил антимикробную активность против *Listeria monocytogenes* EGDe107776 (данные не показаны). Далее гидролиз продолжали пепсином. Антимикробная активность, ранее наблюдаемая для гидролизата казеинов клетками штамма *Enterococcus faecalis* AN1, сохранялась после гидролиза пепсином, однако при воздействии панкреатина полностью исчезала. Для контроля антимикробная активность отсутствовала на всех этапах гидролиза. Профиль пептидов, образующихся после гидролиза пепсином, различался для контроля и гидролизата наличием небольших пептидов между 15 и 20 мин элюции у последнего (Рис. 3). Вероятно, проявляемая антимикробная активность связана именно с наличием этих пептидов. В результате гидролиза панкреатином

эти пептиды частично расщеплялись (данные не показаны).

Полученные результаты позволяют заключить, что в результате воздействия протеаз штамма *Enterococcus faecalis* AN1 на казеины происходит специфичное расщепление субстрата с образованием антимикробных пептидов. Биологическая активность данных пептидов сохранялась при воздействии пепсина, однако полностью исчезала при гидролизе панкреатином, возможно, в результате их дальнейшего расщепления и деградациии активной аминокислотной последовательности. В перспективе дальнейшее изучение антимикробных пептидов, образующихся в результате протеолитической активности штамма *Enterococcus faecalis* AN1, определение их аминокислотной последовательности и оптимизация условий для их образования. Однако данные, полученные уже на этом этапе исследования, позволяют заключить, что исследуемый штамм обладает потенциалом в производстве функциональных молочных продуктов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ahmadova A., Abdullayeva N.A., Quseynova N.F., Quliyev A.A. Milk caseins hydrolysis by strain *Enterococcus faecalis* AN1 // Proceedings of the Azerbaijan National Academy of Sciences. – 2010. – № 6. – P. 25-85.
2. Centeno J.A., Menendez S., Hermida M., Rodriguez-Otero J.L. Effect of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. // International Journal of Food Microbiology. – 1999. – V. 48. – P. 97-111.
3. Exterkate F., Alting A., Bruinenberg P. Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region. // Applied and Environmental Microbiology. 1993. – V.59. – P. 3640-3647.
4. Fira D., Kojic M., Banina A. et al. Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli // J.Appl.Microbiol. 2001. – V. 90. – P. 123-130.
5. Gobetti M., Stepaniak L., De Angelis M., Corsetti A. and Di Cagno R. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2002. V. 42. P. 223–239.

6. Kamysu W., Okroj M., and Lukasiak J. Novel properties of antimicrobial peptides // *Acta Biochim. Pol.* – 2003. – V.50, P. 236–239.
7. Kunji E.R.S., Mierau I., Hagfing A., Poolman B.I., Konings W.N. The proteolytic systems of lactic acid bacteria // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 1996. – V.70, P.187-221.
8. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V.227. P. 680-685.
9. Lahov E., and Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem.Toxicol.* – 1996. V.34. P.131-145.
10. Mouecoucou J., Villaume C., Sanchez C., Mejean L. β -Lactoglobulin/ polysaccharide interactions during in vitro gastric and pancreatic hydrolysis assessed in dialysis bags of different molecular weight cut-offs.// *Biochim.Biophys.Acta*, 22.01.2004. – V.1670. – is.2. P.105–112.
11. Tagg J., Dajani A., Wannamaker L. Bacteriocins of Gram-positive bacteria // *Bacteriol.Rev.* – 1976. – V.40. P.722–756.