

УДК: 581.19:577.157

Ахмедова А.Ф., Гюльахмедов С.Г., Кулиев А.А.
Бакинский государственный университет

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *ENTEROCOCCUS FAECALIS* AN1

A. Ahmedova, S. Gulahmedov, A. Kuliyeu
Baku State University

EFFECT OF DIFFERENT FACTORS ON PROTEOLYTIC ACTIVITY OF STRAIN *ENTEROCOCCUS FAECALIS* AN1

Аннотация: Цель данной работы состояла в изучении влияния температуры и pH среды на протеолитическую активность штамма *Enterococcus faecalis* AN1. Исследуемый штамм был изолирован из традиционного сыра, произведенного в Азербайджане. Влияние pH и температуры на протеолитическую активность исследовали с помощью непродливающей системы клеток. Наличие гидролиза белков молока проверяли с помощью электрофореза в додецил-сульфат-натрий-полиакриламидном геле. Изучение влияния pH на протеолитическую активность исследуемого штамма показало, что pH оптимум для протеолитических ферментов штамма *Enterococcus faecalis* AN1 находится в нейтральных значениях. Изучение протеолитической активности штамма при различных температурах показало наличие гидролиза субстрата при всех исследуемых значениях температуры, от 150С до 550С. Однако, температурный оптимум для протеаз данного штамма находится в пределах 30-370С.

Ключевые слова: *Enterococcus faecalis*, сыр, протеолитическая активность, pH среды, температура.

Abstract. The aim of this work was to study pH and temperature effect on proteolytic activity of strain *Enterococcus faecalis* AN1. The strain was isolated from traditional homemade dairy cheese of Azerbaijan and was identified as producer of proteolytic enzymes. Protein hydrolysis and peptides profiles arising from enzymatic activities of the studied strain were analyzed by SDS-PAGE. PH and temperature effect on proteolytic activity of the strain was studied in non proliferative cells system. Maximal protein degradation was observed in the pH range 6.0 - 7.2. Further increase or decrease of pH led to decrease in the proteolysis level. It can be concluded that the optimal pH values for proteinases activity of the strain in assayed system are in the neutral pH range. Optimal temperature for hydrolysis of caseins was found to be 30-37°C for strains A121, A124, A1221, A1232 and 37 °C in case of strains A71 and AN1. However, hydrolysis of substrate was observed in all assayed temperatures.

Key words: *Enterococcus faecalis*, cheese, proteolytic activity, pH, temperature.

Гидролиз казеинов молока играет важную роль в созревании и формировании текстуры ферментированных молочных продуктов [2, 8]. Первичный гидролиз казеинов молока осуществляется протеазами молочнокислых бактерий (далее по тексту – МКБ), присутствующих как в качестве стартерных, так и в качестве нестартерных культур в ферментированных молочных продуктах [6, 7]. Протеолитическая система МКБ обеспечивает их аминокислотами, необходимыми для роста и жизнедеятельности, и включает 3 компонента: экзопротеазы, которые связаны с клеточной стенкой и осуществляют первоначальный гидролиз казеинов молока до олигопептидов; транспортную систему, осуществляющую транспорт олигопептидов через клеточную стенку в цитоплазму; эндопептидазы – большого количества олиго- ди- и трипептидаз, которые осуществляют дальнейший гидролиз внутри клетки до аминокислот [1, 9].

Как известно, протеолитическая активность каждого штамма строго специфична и зависит от многих факторов, в том числе и от значений кислотности среды. В большинстве случаев МКБ продуцируют несколько различных экзопротеаз, которые обладают различными оптимумами pH [5]. Температура среды также имеет большое значение, поскольку температурный оптимум протеаз МКБ не всегда совпадает с оптимальной температурой для их роста [4].

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]. Цель данной работы состояла в изучении влияния температуры и pH среды на протеолитическую активность штамма *Enterococcus faecalis* AN1.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Штамм *Enterococcus faecalis* AN1, исследуемый в данной работе, был изолирован из традиционного сыра, произведенного в Азербайджане. Штамм хранился при температуре -80°C в 30% (о/о) глицероле. Перед использованием штамм дважды культивировали в M17 среде.

Влияние pH и температуры на протеолитическую активность. Влияние pH и температуры на протеолитическую активность исследовали с помощью непродливающей системы клеток. При использовании этого метода протеолитическая активность измерялась в стационарной фазе роста и при контролируемых значениях pH и температуры

среды. Свежую культуру исследуемого штамма культивировали на поверхности молоко-цитратагаризованной среды (обезжиренное молоко 4.4%, Na-цитрат 0.8%, дрожжевой экстракт 0.1%, глюкоза 0.5%, агар 1.5% (м/о)) [5] в чашках Петри для индукции протеаз. Через 48 часов клетки собирали с поверхности молоко-цитратагаризованной среды и растворяли в 100 мМ фосфатном буфере для получения клеточной суспензии с ОП600nm 20, что приблизительно равно 2×10^{10} КФЕ/мл. Далее в этом же буфере растворяли субстрат (смесь казеинов в концентрации 12 мг/мл), смешивали в равном количестве с клеточной суспензией и инкубировали в течении 24 ч. При изучении влияния температуры на протеолитическую активность для приготовления клеточной суспензии и раствора казеинов использовали 100 мМ фосфатный буфер со значением pH 7.0, и затем смесь клеток с субстратом инкубировали при различных температурах (20, 30, 37, 45 и 55°C). При изучении влияния pH на протеолитическую активность для приготовления клеточной суспензии и раствора казеинов использовали 100 мМ фосфатный буфер с различными значениями pH (5.4, 5.7, 6.0, 6.5, 7.2 and 8.0), и затем смесь клеток с субстратом инкубировали при температуре 37°C . В качестве контроля использовали раствор субстрата без клеток. В определенные интервалы времени смесь клеток с субстратом центрифугировали (10000 об /мин в течение 15 мин.) для осаждения клеток. Наличие гидролиза казеинов проверяли с помощью электрофореза в 12% додецил-сульфат-натрий-полиакриламидном геле (ДС-Na-ПААГ), с концентрацией акриламида 12%. Надосадочную жидкость смешивали в равном количестве с раствором для введения образцов в гель (ДС-Na 4%; Трис HCl 50 мМ pH 6,8; глицерин 20%; бромфенол синий; β -меркаптоэтанол) и подвергали термической обработке для денатурации белков (100°C 3 мин). Электрофорез был проведен в аппарате Mini Protean II Gel Electrophoresis (Bio-Rad Hercules, Калифорния, США) по методу Laemmli [10]. Процент гидролиза казеинов рассчитывали при помощи денсито-

метрического анализа гелей, проведенного с использованием программного приложения Fuji Film Image Gauge V3.0 software (Fuji Photo Film Co. Ltd. Japan).

Результаты

Штамм *Enterococcus faecalis* AN1 является продуцентом протеолитических ферментов, которые гидролизуют α_{s1} - и β -казеины молока. В данной работе мы исследовали влияние различных факторов, таких, как рН и температура среды, на протеолитическую активность этого штамма.

Изучение влияния рН на протеолитическую активность исследуемого штамма показало, что значение кислотности среды имеет большое влияние на эффективность гидро-

лиза субстрата продуцируемыми им протеазами. Рис. 1 отображает гель с профилем гидролиза субстрата при инкубации клеток в условиях различных значений рН среды. Степень гидролиза определяли через 24 часа инкубации с субстратом. Как видно на геле, при рН 5.4 гидролиз казеинов не наблюдался. Мы можем заключить, что протеазы, продуцируемые исследуемым штаммом, не активны при кислых значениях среды. При рН 5.7 наблюдался частичный гидролиз субстрата. При значениях рН от 6.0 до 7.2 протеазы полностью расщепляли субстрат. Согласно полученным результатам мы можем заключить, что рН оптимум для протеаз штамма *Enterococcus faecalis* AN1 находится в нейтральных значениях. Полученные результаты не про-

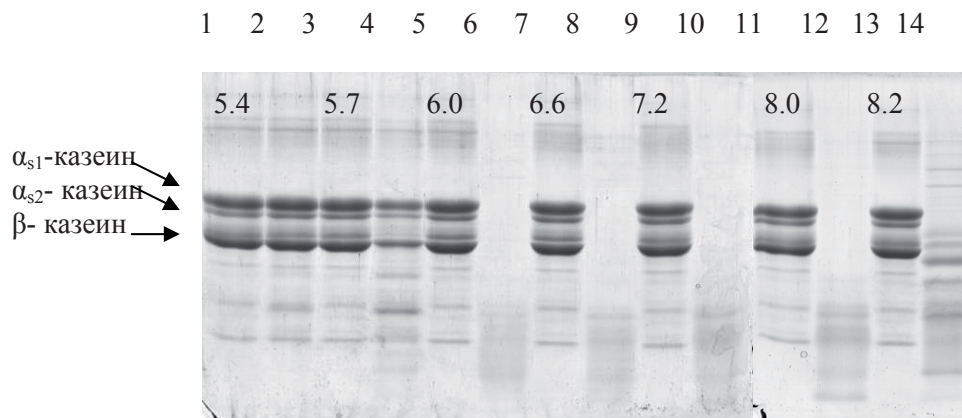


Рис. 1. Протеолитическая активность при различных значениях рН среды. Линии 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – контроли (субстрат без клеток); линии 2, 4, 6, 8, 10, 12 – гидролизаты.

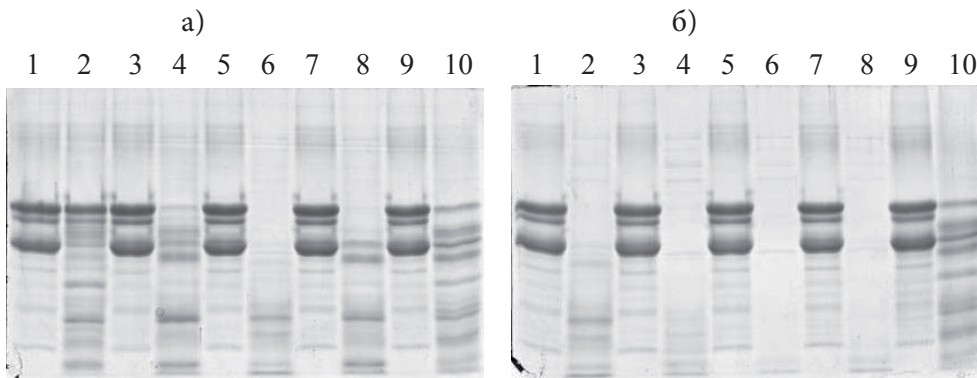


Рис. 2. Влияние температуры на протеолитическую активность штамма *Enterococcus faecalis* AN1. а – 6 ч. инкубации, б – 24 ч. инкубации. Линии 1, 3, 5, 7, 9 – контроли (субстрат без клеток); Линии 2, 4, 6, 8, 10, 12 – гидролизаты.

тиворечат ранее полученным результатам изучения протеаз МКБ. Оптимальный гидролиз казеинов при нейтральных значениях рН среды наблюдался и в других исследованиях протеолитической активности различных штаммов МКБ [3, 13, 14].

В другом эксперименте мы исследовали влияние температуры среды на активность протеолитических ферментов, продуцируемых исследуемым штаммом. Для этого мы инкубировали клетки с казеинами при различных температурах. Степень гидролиза субстрата проверяли с помощью элетрофореза в полиакриламидном геле через 6 ч и 24 часа инкубации с субстратом. На рис.2 отображены результаты данного эксперимента. Как видно на геле (рис 2а), гидролиз субстрата наблюдался при всех исследуемых значениях температуры, от 15 °С до 55 °С. Однако протеолитические ферменты расщепляли субстрат с различной степенью эффективности в зависимости от температуры инкубации. Через 6 ч. инкубации с субстратом наиболее эффективный гидролиз наблюдался при 37 и 45 °С. Через 24 ч инкубации (рис 2б) полный гидролиз субстрата наблюдался при всех исследуемых температурах, кроме 55 °С.

Согласно полученным результатам мы можем заключить, что влияние температуры на протеолитическую активность исследуемого штамма незначительно, и степень гидролиза субстрата зависела больше от времени инкубации. Тем не менее, результаты, полученные после 6 ч. инкубации клеток с субстратом, позволяют заключить, что температурный оптимум для протеаз данного штамма находится в пределах 30-37 °С. Следует отметить, что согласно данным предыдущих исследований, оптимальная температура для протеолитической активности МКБ не всегда совпадает с оптимальной температурой роста [4, 5].

Полученные данные имеют ценность и актуальность, поскольку данные о протеолитической активности энтерококков очень ограничены, и большинство исследований в этой области проводились с лактобацил-

лами. Результаты данной работы указывают на наличие эффективной протеолитической системы у энтерококков, что делает их потенциальными кандидатами для пищевой промышленности.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bjurlin M.A., Bloomer S., Nelson C.J. 2002. Characterization of proteolytic activity of proteases. *Biotechnology Letters* 24: 191-195.
2. Centeno J.A., Menendez S., Hermida M., Rodriguez-Otero J.L. 1999. Effect of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology* 48: 97-111.
3. El-Ghaish S., Dalgarrondo M., Choiset Y., Sitohy M., Ivanova I., Haertly T., Chobert J.-M. 2010. Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *European Food Research and Technology* 230: 635-643.
4. Exterkate F., Alting A., Bruinenberg P. 1993. 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* 59, 3640-3647.
5. Fira D., Kojic M., Banina A., Spasojevic I., Strahinic I., Topisirovic L. 2001. Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 90: 123-130.
6. Foulquier-Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., de Vuyst, L. 2006. The role and application of *Enterococci* in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106: 1-24.
7. Giraffa G. 2003. Functionality of *Enterococci* in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 215-222.
8. Jensen J.P., Reinbold G.W., Washam C.J., Vedamuthu E.R. 1975. Role of *Enterococci* in Cheddar cheese: proteolytic activity and lactic acid development. *Journal of Milk and Food Technology* 38: 3-7.
9. Kunji E.R.S., Mierau I., Hagfing A., Poolman B.I., Konings W.N. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 187-221.
10. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
11. Psoni L., Kotzamanides C., Andrighetto C., Lombardi A., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk

- cheese. International Journal of Food Microbiology 109: 109-120.
12. Sarantinopoulos P., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. 2001. Citrate metabolism by Enterococcus faecalis FAIR-E 229. Applied and Environmental Microbiology 67: 5482-5487.
13. Suzzi G., Caruso M., Gardini F., Lombardi A., Vannini L., Guerzoni M.E., Andrighetto C., Lanorte, M.T. 2000. A survey of the Enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto caprino). Journal of Applied Microbiology 89: 267-274.
14. Veljovic K., Fira D., Terzic-Vidojevic A., Abriouel H., Galvez A., Topisirovic L. 2009. Evaluation of antimicrobial and proteolytic activity of Enterococci isolated from fermented products. European Food Research and Technology 230: 63-70.

УДК 581.47-681.26

Гаврилова С.Е.

Московский государственный областной университет

Девятков А.Г.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ПЛОДОВ ВИДОВ РОДА VIOLA L.

S. Gavrilova

Moscow State Regional University

A. Deviatov

Lomonosov Moscow State University

ANATOMIC-MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF FRUIT SPECIES VIOLA L.

Аннотация. В статье приводятся результаты анатомо-морфологического исследования плодов видов рода *Viola* L. Изучена ультраскульптура поверхности коробочек, анатомическое строение стенки и основания плода, типы устьичного аппарата, особенности вскрывшихся коробочек. Показана зависимость анатомического строения и механизма вскрывания плодов. Выделены основные карпоэкологические типы плодов.

Ключевые слова: *Viola* L., коробочка, гигрохазическое вскрывание, ксерохазическое вскрывание, экзокарпий, мезокарпий, эндокарпий.

Abstract: The article presents the results of anatomical and morphological study of the fruits of the genus *Viola* L. Ultraskulptura surface capsules, anatomical wall and the base of the fruit as well as the types of stomatal apparatus, especially uncovered capsules have been studied. The dependence of the anatomical structure and mechanism dehiscence fruits has been revealed. The basic carpoecologicus types of fruits have been distinguished.

Key words: *Viola* L., capsula, dehiscencia gicrochastica, dehiscencia xerochastica, exocarpium, mesocarpium, endocarpium.