

УДК 579.2: 606: 573.6: 575

- ¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»
- ² ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова
- ³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского»

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Машенцева Наталья Геннадьевна
 Адрес: 125080, г. Москва,
 Волоколамское шоссе, д.11
 Email: natali-mng@yandex.ru

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:
 данные текущего исследования
 доступны по запросу
 у корреспондирующего автора.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Коврижных, А. В., Афанасьев, Д. А.,
 Ахангаран, М., Гаравари, М., Черну-
 ха, И. М., Машенцева, Н. Г., & Васи-
 лиевич, Н. В. (2022). Определение
 протеолитической активности молоч-
 нонокислых бактерий и выявление генов
 протеиназ. *Хранение и переработка
 сельхозсырья*, (4), 113–127. <https://doi.org/10.36107/spfp.2022.341>

ПОСТУПИЛА: 23.08.2022

ПРИНЯТА: 03.10.2022

ОПУБЛИКОВАНА: 14.10.2022

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии
 конфликта интересов.



Определение протеолитической активности молочнокислых бактерий и выявление генов протеиназ

А. В. Коврижных¹, Д. А. Афанасьев², М. Ахангаран¹, М. Гаравари¹,
 М. Чернуха², Н. Г. Машенцева¹, Н. В. Василиевич³

АННОТАЦИЯ

Введение. Биоактивные пептиды описываются как аминокислотные последовательно-сти белков, оказывающие положительное влияние на биологические процессы и/или здоровье человека в целом. Они могут образовываться в высокобелковом животном и растительном сырье под действием ферментов стартовых и заквасочных культур *in situ*. Данные ферменты представляют собой протеиназы с молекулярной массой около 200 кДа, относящиеся к семейству PrtP.

Цель. Целью исследования являлось определение генов протеиназ у молочнокислых и денитрифицирующих микроорганизмов, оценка их протеолитической активности и определение взаимосвязи между протеолитической активностью и генетическими детерминантами.

Материалы и методы. Был оценен протеолитический потенциал микроорганизмов родов *Latilactobacillus* и *Pediococcus*, а также рода *Staphylococcus* из коллекции университета. Метод ТНБС использовался для измерения высвобождаемых аминокислот. На агаровой среде с обезжиренным молоком были определены размеры зон просветления вокруг колоний микроорганизмов. Для определения наличия генов PRTP, PRTM, PRTB, PRTN и PRTR, отвечающих за протеолитическую активность, использовали 5 пар праймеров геномной ДНК (PrtP700/PrtM700; P15C/P06C; PRTB10/PRTB20; Jp23/Jp25; prtI2/IP6Xba).

Результаты. На молочном агаре все исследуемые микроорганизмы образовывали зоны просветления вокруг колоний, что указывает на их протеолитическую активность. Самые большие зоны задержки роста были вокруг колоний штамма *Latilactobacillus curvatus* 2, а также *Pediococcus acidilactici* 28 и *Pediococcus acidilactici* 38. По данным метода ТНБС, *Latilactobacillus curvatus* 1 и *Staphylococcus carnosus* 108 оказались наименее продуктивными по накоплению аминного азота. Результаты ПЦР показали, что максимальное количество генов протеиназ присутствует у штамма *L. sakei* 105. Но данный штамм не проявил высокой протеолитической активности на среде качественным и количественным методами. Поэтому для отбора штаммов с высокой протеолитической активностью нужен комплексный подход.

Выводы. С помощью комплексного подхода были отобраны штаммы с высокой протеолитической активностью, потенциально способные к образованию биоактивных пептидов в ферментированных пищевых продуктах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

биоактивные пептиды, нутное молоко, молочнокислые бактерии, протеолитическая активность, гены протеиназ

Determination of the Proteolytic activity of lactic acid bacteria and identification of proteinase genes

¹ Moscow State University of Food Production (MSUFP)

² Gorbатов Research Center for Food Systems

³ K.G. Razumovsky Moscow State University of Technologies and Management

Anna V. Kovrijnykh¹, Dmitry A. Afanasyev², Mahboobeh Ahangaran¹, Mahmood Gharaviri¹, Irina M. Chernukha², Natalya G. Mashentseva¹, Natalya V. Vasilievich³

CORRESPONDENCE:

Natalya G. Mashentseva

11 Volokolamskoe highway,
Moscow, 125080, Russian Federation
Email: natali-mng@yandex.ru

FOR CITATIONS:

Kovrijnykh, A. V., Afanasyev, D. A., Ahangaran, M., Gharaviri, M., Chernukha, I. M., Mashentseva, N. G., & Vasilievich N. V. Determination of the proteolytic activity of lactic acid bacteria and identification of proteinase genes. *Storage and processing of Farm Products*, (4), 113–127 <https://doi.org/10.36107/spfp.2022.341>

RECEIVED: 23.08.2022

ACCEPTED: 03.10.2022

PUBLISHED: 14.10.2022

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.



ABSTRACT

Introduction. Bioactive peptides are described as amino acid sequences of proteins that have a positive effect on biological processes and/or human health in general. They can be formed in high-protein animal and vegetable raw materials under the action of enzymes of starter and starter cultures in situ. These enzymes are proteinases with a molecular weight of about 200 kDa belonging to the PrtP family.

Purpose. The aim of the study was to determine the genes of proteinases in lactic acid and denitrifying microorganisms, to evaluate their proteolytic activity and to determine the relationship between proteolytic activity and genetic determinants.

Materials and methods. The proteolytic potential of microorganisms of the genera *Latilactobacillus* and *Pediococcus*, as well as the genus *Staphylococcus* from the university collection was evaluated. The TNBS method was used to measure the released amino groups. The sizes of the enlightenment zones around the colonies of microorganisms were determined by the cup method on milk agar. 5 pairs of genomic DNA primers (PrtP700/PrtM700; P15C/P06C; PRTB10/PRTB20; Jp23/Jp25; prtI2/IP6Xba) were used to determine the presence of PRTP, PRTM, PRTB, PRTD and PRTR genes responsible for proteolytic activity.

Results. On milk agar, all the studied microorganisms formed zones of enlightenment around the colonies, which indicates their proteolytic activity. The largest growth retardation zones were around colonies of the strain *Latilactobacillus curvatus* 2, as well as *Pediococcus acidilactici* 28 and *Pediococcus acidilactici* 38. According to the TNBS method, *Latilactobacillus curvatus* 1 and *Staphylococcus carnosus* 108 were the least productive in amine nitrogen accumulation. PCR results showed that the maximum number of proteinase genes is present in the strain *L. sakei* 105. But this strain did not show high proteolytic activity on the medium by qualitative and quantitative methods. Therefore, an integrated approach is needed to select strains with high proteolytic activity.

Conclusions. Using an integrated approach, strains with high proteolytic activity, potentially capable of forming bioactive peptides in fermented foods, were selected.

KEYWORDS

bioactive peptides, chickpea milk, lactic acid bacteria, proteolytic activity, proteolytic genes

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время пользуются спросом функциональные пищевые продукты, которые предназначены для потребления всеми возрастными группами. Продукты функционального назначения способны снизить риск возникновения различных заболеваний, связанных с питанием, и улучшить состояние здоровья людей за счет наличия в их составе физиологически активных компонентов (Li-Chan, 2015).

В последние годы возрос интерес к биоактивным пептидам, обладающим противомикробной, антигипертензивной, антиоксидантной, противораковой, иммуномодулирующей и противовоспалительной активностями (Ахангаран и соавт., 2022; Tonolo et al., 2019).

Среди прочих методов выделения биологически активных пептидов, особое внимание уделяют применению микроорганизмов, позволяющих использовать различные белоксодержащие субстраты в качестве источников таких пептидов. Большим потенциалом обладают молочнокислые бактерии (МКБ), т.к. ключевую роль в ферментации пищевых продуктов играет их протеолитическая система (Savijoki et al., 2006; Venegas-Ortega, 2019).

Однако, механизм образования биологически активных пептидов в пищевом сырье под действием МКБ на молекулярном уровне изучен недостаточно.

Целью данного исследования являлось определение уровня протеолитической активности молочнокислых бактерий видов *Latilactobacillus curvatus*, *Latilactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici* и денитрифицирующего стафилококка вида *Staphylococcus carnosus*, установление взаимосвязи протеолитической активности с их генетическими детерминантами.

К задачам исследования следует отнести:

- оценку протеолитической активности исследуемых микроорганизмов биохимическим методом (чашечный метод с применением молочного агар);
- определение генов протеиназ молекулярно-генетическим методом — полимеразной цепной реакцией и ДНК-электрофорезом);
- определение протеолитической активности исследуемых микроорганизмов методом ТНБС.

Теоретическое обоснование

Высвобождение биологически активных пептидов из продуктов может быть осуществлено несколькими путями (Korhonen & Pihlanto, 2003):

- ферментативным гидролизом пищеварительными ферментами, такими как пепсин, трипсин, химотрипсин;
- ферментативным гидролизом ферментами растительного происхождения, такими как папаин, бромелайн и фицин;
- путем ферментации ферментами микробного происхождения.

В настоящее время широко применяются ферментация МКБ, которые используются в различных отраслях пищевой промышленности и сельском хозяйстве. В мясомолочной промышленности они применяются в качестве заквасок при производстве кисломолочных продуктов или в качестве стартовых культур при производстве ферментированных мясных продуктов. Помимо этого, МКБ способствуют увеличению сроков годности готовой продукции и улучшению ее вкусовых характеристик.

Жизнеспособность МКБ зависит от эффективности их протеолитической системы. В состав клеточной стенки входят протеиназы, которые играют важную роль в гидролизе олигопептидов в той питательной среде, в которой растут МКБ. Данные соединения транспортируются в бактериальную клетку с помощью специфической транспортной системы и распадаются до свободных аминокислот с помощью ряда пептидаз (Savijoki et al., 2006, Venegas-Ortega et al, 2019).

Так, например, первой ступенью гидролиза казеина является использование протеиназ клеточной стенки, которые катализируют расщепление пептидных связей. Эти протеиназы синтезируются в виде предшественников белков и содержат примерно 2000 а.о. (Chen et al., 2017). Из МКБ были клонированы и охарактеризованы различные протеиназы, включая PrtP из *Lactococcus lactis* и *Latilactobacillus paracasei*, PrtH из *L. helveticus*, PrtR из *Latilactobacillus rhamnosus* и PrtB из *L. bulgaricus* (Paštar, 2006; Guo, 2016).

Второй этап гидролиза казеина включает в себя транспортировку пептидов, генерируемых протеиназами клеточной стенки, с помощью Opp системы.

Белки данной системы относятся к суперсемейству АТФ-связывающих транспортеров, которые катализируют расщепление производных казеина. У лактококков, например, данная система находится в опероне, в котором присутствуют гены *OppA* (кодирует олигопептид-связывающий белок), *OppB* и *OppC* (субъединицы цитоплазматической мембраны), *OppD* и *OppF* (белки, связывающие нуклеотиды). После поглощения клеткой МКБ пептидов происходит их разрушение под действием пептидаз с различной и частично перекрывающейся специфичностью (Savijoki et al., 2006).

Другими пептидазами, способными действовать на олигопептиды, являются металлопептидаза с широкой специфичностью *PerN* и цистеинпептидазные белки *PerC*, которые были выделены из различных штаммов молочнокислых бактерий. Данные ферменты способны отщеплять аминокислоты с N-конца, их специфичность зависит от длины пептида и природы N-концевого аминокислотного остатка. Существуют и более субстрат-специфичные пептидазы. Так, например, пептидаза *PerA* высвобождает N-концевые аминокислотные остатки из пептидов, состоящих из 3–9 остатков. Пептидаза *PerP* воздействует на трипептиды, содержащие пролин в среднем положении, а пептидаза *PerQ* способствует расщеплению дипептидов, содержащих пролин во втором положении. Пептидаза *PerS* в основном влияет на пептиды, состоящие из 2–5 аминокислотных остатков и содержащие остатки аргинина или ароматических аминокислот в N-концевом положении (Tuler et al., 2002).

МКБ способны реагировать на доступность азота в среде, регулируя активность протеолитической системы для сохранения азотного баланса в клетке. Было высказано предположение, что ди- и трипептиды с гидрофобными остатками действуют как эффекторные молекулы в регуляции транскрипции *Opp* системы, и тем самым происходит воздействие на всю протеолитическую систему *Lactococcus lactis*. В более раннем исследовании было показано, что экспрессия генов *prtP*, *prtM*, *opp-pepO1*, *perD*, *perN*, *perC* и *perX* возрастает от 5 до 150 раз при добавлении гидролизата казеина, содержащего 80% пептидов и 20% аминокислот в ростовой среде, однако при недостатке азота наблюдалось значительное снижение экспрессии (Savijoki et al., 2006) (Рисунок 1).

Протеолитическая активность может варьироваться у одного и того же штамма и по-разному проявляться на различных питательных средах, что обусловлено специфичностью действия ферментов. При выращивании на молочном агаре гидролиз белков обнаруживается по наличию зон просветления вокруг колоний за счет разрушения преципитата — чем больше диаметр зоны просветления, тем выше протеолитическая активность микроорганизмов (Ковалев и соавт., 2019). При выращивании колоний на средах с желатином под действием фермента желатиназы происходит разжижение желатина с различной интенсивностью (Balan et al., 2012). Некоторые микроорганизмы обладают высокой протеолитической активностью, что способствует расщеплению белков и пептона до продуктов глубокого распада — индола, сероводорода и аммиака (Ashaolu et al., 2021). Определение протеолитической активности также осуществляется с помощью белкового электрофореза с использованием полиакриламидного геля (Biji et al., 2012). Эти методы относятся к биохимическим методам определения протеолитической активности микроорганизмов.

Для измерения концентрации белка также используются *спектрофотометрические* методы. Концентрация белка может быть измерена по методу Мэрион Брэдфорд. Данный метод основан на реакции красителя Coomassie G-250 с гидрофобными аминокислотными остатками белка. При связывании происходит сдвиг максимума поглощения с длины волны, равной 465 нм (свободный краситель), до 595 нм (связанный), при которой и проводятся все измерения (Mehmeti et al., 2011). Метод Е.Д. Каверзневой (1971) основан на взаимодействии молекулы казеина и трихлоруксусной кислоты (ТХУ) с реактивом Фолина. Оптическая плотность измеряется при длине волны 670 нм на фотоколориметре. Белок определяется спектрофотометрически, считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует 1 оптической единице (опт. ед.) в кювете толщиной 1 см (Yugina et al., 2013). Метод, основанный на использовании 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты для определения аминного азота (ТНБС), позволяет определить хромофоры, образующиеся при взаимодействии первичных аминов и тринитробензолсульфоновой кислоты. Количество аминного азота определяется по калибровочной кривой (Babich, 2011). Протеолитическая активность вне клетки может определять-

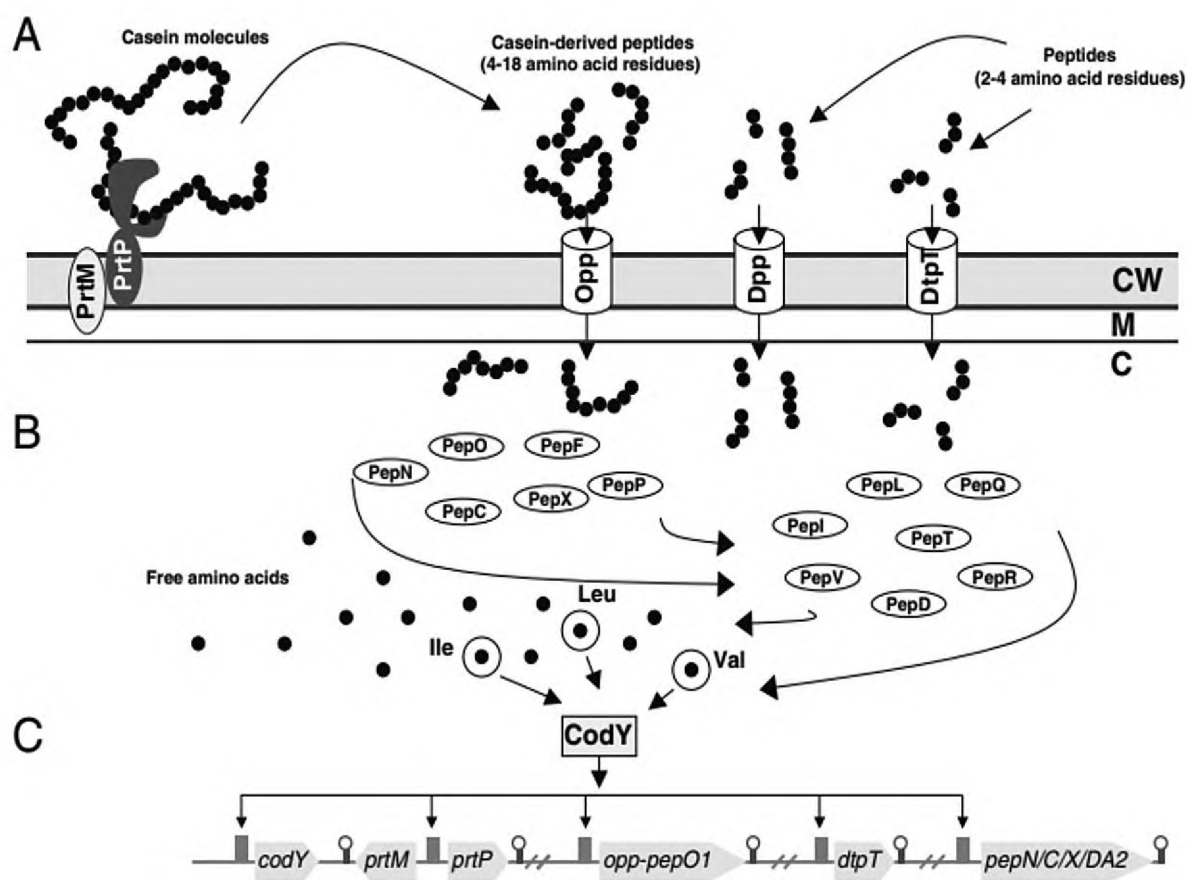


Рисунок 1

Функционирование и регулирование протеолитической системы молочнокислых бактерий при гидролизе казеина

Условные обозначения: CW – клеточная стенка, М – мембрана, С – цитоплазма. А – PrtP (протеиназа клеточной стенки – СЕР); Opp (пермеаза олигопептидов); Dpp (транспортер пептидов, содержит от 2 до 9 а.о.). В – внутриклеточные пептидазы (PepO, PepF, PepN, PepP – эндопептидазы широкой специфичности; PepC – цистеинпептидаза; PepX – X-пролилди пептидаминопептидаза; PepT – трипептидаза; PepQ – пролидаза; PepR – пролиназа; Pep – пролиниминопептидаза; PepD и PepV – дипептидазы D и V. С – репрессор транскрипции CodY (при повышении внутреннего пула аминокислот лейцина, валина и изолейцина использует их в качестве кофакторов для репрессии экспрессии генов протеолитической системы) (Savijoki et al., 2006)

From «Proteolytic systems of lactic acid bacteria», by K. Savijoki, H. Ingmer, and P. Varmanen, 2006, Applied Microbiology and Biotechnology, 71, p. 399. (<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>). Copyright 2006 by the Springer-Verlag

ся методом Эрлангера с использованием синтетических п-нитроанилидных субстратов. Субстраты включают в себя аналог пептидной связи, которая под действием пептидаз разрушается. Результатом является выделение п-нитроанилина, который окрашивает реакционную смесь в желтый цвет. Интенсивность окраски определяется при длине волны 410 нм с использованием спектрофотометра (Radnaguriev, 2015). Модифицированный метод Ансона основан на количественном определении тирозина, образующегося в результате гидролиза

казеината натрия. Результаты измерения оптической плотности исследуются по калибровочной кривой (ГОСТ 20264.2¹).

Флуоресцентный метод основан на взаимодействии флуорескамина с первичными аминами, при этом образуются флуорофоры, характеризующиеся максимумами поглощения при 390 и 475 нм. Метод обладает достаточно высокой чувствительностью, что позволяет определить до 0,5 мкг белка. Для

¹ ГОСТ 20264.2–88. (2015). *Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности*. М.: Стандартинформ.

проведения анализа необходим прибор флуориметр (Bisswanger, 2015).

В связи с активным использованием в последнее время молекулярно-генетических методов исследования микроорганизмов, в т.ч. определения их протеолитического потенциала на основе наличия в их геноме детерминантов протеиназ, что подтверждается значительным количеством публикаций, представленных выше, является актуальным и интересным изучить взаимосвязь наличия и количества определенных генов протеиназ в геноме исследуемых микроорганизмов и их протеолитической активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования

Молочнокислые бактерии *Latilactobacillus curvatus* 1 (B-8889), *Latilactobacillus curvatus* 2 (B-8893), *Latilactobacillus sakei* 105 (B-8932), *Pediococcus acidilactici* 28 (B-8955), *Pediococcus acidilactici* 38 (B-8888), и один денитрифицирующий стафилококк *Staphylococcus carnosus* 108 (B-8951), были получены из коллекции ФГБОУ ВО МГУПП. Ранее данные штаммы показали способность к образованию биологически активных пептидов в мясном сырье. В результате протеомного исследования образцов ферментирован-

ной мышечной ткани и сырокопченых колбас было выявлено 3 пептида, представляющих интерес в отношении проявления биологической активности: SDEEVENHVEEYEEEE (белок-предшественник — тропонин Т), TKQEYDEAGPSIVHRK (белок-предшественник — α -актин) и NAWGKVEADVAGHGQ (белок-предшественник — миоглобин). Биоинформатический анализ пептидов позволил спрогнозировать у них противоопухолевую и антимикробную активность, а также исключить их токсичность (Афанасьев и соавт., 2021).

Нут (*Cicer arietinum*), использованный в эксперименте, был приобретен на местном рынке, г. Москва.

Оборудование

Микропланшет фотометр-флуориметр Synergy2 (Bio Tek, США), амплификатор Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, США), центрифуга 5702R (Eppendorf, Германия), водяная баня GFL (Германия).

Инструменты

При постановке ПЦР использовали 5 пар праймеров геномной ДНК для определения генов протеиназ, наиболее часто встречающихся у молочнокислых микроорганизмов (Strahinic et al., 2009). Список праймеров, использованных в работе, представлен в Таблице 1.

Таблица 1

Использованные в работе праймеры

Номер	Название	Температура отжига	Последовательность
1	PrtP700	56	GCTTGAATTCGTTGCTCGCTCGGTTGT
2	PrtM700	56	GCATGAATTCAATGCACGATAAATGAG
3	P15C	55	AACCAAATCTGATGTTG
4	P06C	55	TTTCAGCGGAAGCAACT
5	PRTB10	56	GGTGTGCTCCTGATGCCAGC
6	PRTB20	56	CCCCGTTTAACAAGTCAAGTT
7	Jp23	56	GCTTGGATAGTAGCGTTAGC
8	Jp25	56	GGTGAACAACTGAAGACG
9	prti2	53	CAACACCGGGACACGGTG
10	IP6Xba	53	CTGATCGTGGACGGTGTTC

Методы

Определение протеолитической активности микроорганизмов на молочном агаре. Скрининговую среду готовили следующим образом: 25 г обезжиренного сухого молока (пастеризованное обезжиренное молоко, полученное методом распыления) восстанавливали 250 мл дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивали и автоклавировали при 121 °C в течение 15 мин. Аналогичным образом стерилизовали 500 мл 2,5 % раствора агара. Непосредственно перед посевом микроорганизмов обезжиренное молоко и агаровую среду выдерживали на водяной бане при 50 °C, затем обезжиренное молоко вносили в колбу с агаровой средой и тщательно перемешивали. Агар с обезжиренным молоком быстро разливали по чашкам Петри. На застывшую среду штаммы засеивали отдельными бланками с помощью бактериальной петли и культивировали при температуре 37 °C в течение 48 ч с последующим охлаждением в холодильнике при 4 °C в течение 36 ч. В качестве контроля использовали незасеянную микроорганизмами чашку Петри. В конце культивирования микроорганизмы формировали на данной среде колонии, окруженные белой или беловатой зоной преципитации, размер которой определялся визуально (Pailin et al. 2001).

Определение протеолитической активности методом ТНБС. Протеолитическую активность определяли количественно с использованием 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS, «Sigma-Aldrich», США), которая применяется для измерения количества высвобождаемых аминокислот в супернатантах (Adler-Nissen J., 1979). Реакцию с ТНБС проводили в фальконах объемом 15 мл. В фалькон вносили последовательно по 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера, pH 8,20, 200 мкл 1 % р-ра SDS, 50 мкл приготовленной пробы и 2 мл свежеприготовленного 0,1 % водного раствора ТНБС. В фалькон с холостой пробой вносили 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера, (pH = 8,20), 250 мкл 1 % раствора додецилсульфата натрия и 2 мл свежеприготовленного 0,1 % раствора 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты. В фальконы с различными концентрациями стандарта вносили 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера (pH = 8,20), 250 мкл раствора стандарта, и 2 мл свежеприготовленного 0,1 % раствора ТНБС. В качестве стандарта использовался L-лейцин («Sigma-Aldrich», США). Из базового раствора лей-

цина с концентрацией 3,0 ммоль/л в 1 % р-ре SDS приготавливали серию разведений в 1 % водном р-ре SDS с концентрациями L-лейцина в диапазоне значений 0,15–3,0 ммоль/л.

Фальконы с опытными, холостой и стандартными пробами плотно закрывали винтовыми пробками и встряхивали на вортке PV1 (Grant Bio, Великобритания) в течение 10 с, затем инкубировали на водяной бане GFL (Германия) с непрозрачной крышкой при температуре (50±1) °C в течение 1 ч. По завершении инкубации для остановки реакции в каждый фалькон вносили по 4,0 мл 0,1 М раствора соляной кислоты. Фальконы плотно закрывали винтовыми пробками, встряхивали на вортке PV1 в течение 10 с и выдерживали 30 мин при комнатной температуре для охлаждения. Для определения оптической плотности по 200 мкл раствора из каждого фалькона (в 3-х повторностях) переносили в лунки 96-луночных несорбирующих УФ-прозрачных планшетов с плоским профилем дна UV-Star (Greiner BioOne, Германия). Оптическую плотность растворов при длине волны 340 нм определяли на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy2 (Bio Tek, США). Калибровочная кривая представлена на Рисунке 2. Результаты измерений выражали в ммоль/дм³ эквивалентов L-лейцина.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) осуществлялась на амплификаторе Eppendorf Mastercycler Gradient

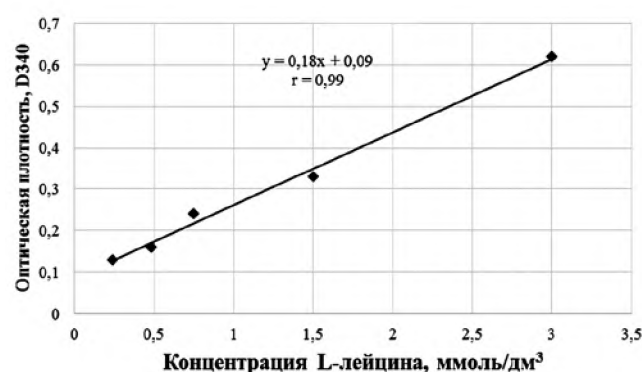


Рисунок 2

Калибровочная кривая зависимости оптической плотности от концентрации L-лейцина в реакционной смеси

Из «Разработка технологии пробиотического кисломолочного продукта с *Lactobacillus Reuteri* LR1 [Кандидатская диссертация, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности]», А. В. Бегунова, 2021, Москва, Россия.

(Eppendorf, США). Суммарное время длительности программы составляло 1 ч 30 мин. — 2 ч 20 мин. Условия амплификации ПЦР были следующими: начальная денатурация при 94 °С в течение 4 мин; 30 циклов денатурации при 94 °С, 1 мин; отжиг при 53–56 °С в зависимости от mT праймеров (1 мин); удлинение при 72 °С (1,5 мин) и окончательное удлинение при 72 °С в течение 7 мин.

Процедура исследования

Перед проведением эксперимента все штаммы были дважды пересеяны на среде MRS (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). Была проверена их чистота и видовое соответствие путем визуальной оценки формы и размеров колоний, а также по результатам микроскопирования.

Нутовое молоко готовили путем смешивания 50 г бобов нута и 250 мл дистиллированной воды. Данную смесь выдерживали в течение 10 ч при 25 °С, после чего подвергали фильтрации и гомогенизации. Культуры вносились в количестве $1,2 \times 10^9$ КОЕ/мл. Для стимуляции роста микроорганизмов в образцы была внесена глюкоза. Инкубация продолжалась 3 сут. при 37 °С.

Для получения белково-пептидных фракций ферментированных образцов нутового молока каждый образец в количестве 5 мл центрифугировали при температуре +4 °С в течение 20 мин. при 4400 об/мин на центрифуге 5702R (Eppendorf, Германия). pH доводили до 4,6 добавлением 0,1 М соляной кислоты либо гидроксида натрия, после чего смесь фильтровали через шприцевые фильтры с гидрофильной мембраной с диаметром пор 0,20 мкм (Sartorius, Германия). Полученные фракции замораживали и хранили при температуре –73 °С до проведения анализа.

Перед проведением анализа образцы были разможены и дополнительно отфильтрованы с использованием шприцевых фильтров с гидрофильной PVDF-мембраной с диаметром пор 0,45 мкм (Carl Roth, Германия).

Экстракция ДНК из микроорганизмов с использованием стеклянных шариков. Стеклянные шарики предварительно промывали серной кислотой (100 %) 1 раз, затем отмывали дистиллятом и высушивали

при 60 °С. Полученная культура из чашки Петри отбиралась в эппендорф микробиологической петлей и растворялась в 500 мкл буфера для лизиса следующего состава: 100 mM Tris HCl (pH = 8); 50 mM EDTA; 1 % SDS. К полученной смеси добавляли около 400 мкл (0,3 г) стеклянных шариков и интенсивно перемешивали в течение 3 мин. Отстаивали в течение 10 мин. Надосадочная жидкость переносилась в новый эппендорф с добавлением 275 мкл 7M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 7,0) и выдерживалась 5 мин при температуре 65 °С, а затем еще 5 мин при температуре 4 °С. Добавляли 500 мкл хлороформа и интенсивно перемешивали в течение 1–3 мин. Центрифугировали 2 мин при 13 000 оборотах. После центрифугирования верхний слой отбирался в новый эппендорф с добавлением 1 мл 99,8 % этилового спирта и выдерживался 30 мин при температуре –20 °С. Откручивали 10 мин при 13000 оборотах при 4 °С. После осадок промывался 70 % ледяным этиловым спиртом. Осадок высушивался в течение 5 мин при температуре 65 °С. Затем осадок растворялся в 30–50 мкл TE буфера или дистиллированной воды.

Электрофорез образцов ДНК проводился в камере для горизонтального электрофореза SE-2 фирмы Helicon в 1 % агарозном геле. Затем вносились исследуемые образцы, предварительно смешанные с красителем Loading Dye Solution (6×LD). В качестве маркера использовали GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Литва). Аналитические гели документировали и визуализировали с использованием гель-документирующей системы BioRad Gel-Doc. Перед проведением препаративного электрофореза заливали чистый буфер в форезную камеру и после завершения процесса гель помещали в новый раствор бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Получившиеся результаты анализировали на наличие необходимых амплификационных фрагментов.

Анализ данных

Статистическую обработку количественных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 14.0 («StatSoft, Inc.», США). Все измерения выполняли в 3 повторностях. Результаты представлены в виде взвешенного среднего (WAM, weighted arithmetic mean) со стандартным отклонением ($\pm$ SD). Статистическую достоверность рассчитыва-

ли с применением непараметрических U-критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) и H-критерия Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis H-test). Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После выращивания колоний на чашках Петри на среде MRS с добавлением 5 % раствора обезжиренного молока был проведен визуальный осмотр культур на образование зон просветления вокруг них. Микроорганизмы должны формировать на использованных средах колонии, окруженные белой или беловатой зоной преципитации. Микроорганизмы с выраженной протеолитической активностью могут давать внутреннюю зону просветления (за счет разрушения преципитата). После проведения визуального осмотра чашек был сделан вывод, что все использованные культуры образовали зоны просветления на чашках Петри (Рисунок 3). Данный чашечный тест позволил расположить штаммы по их протеолитической активности в следующем порядке по убыванию: *Pediococcus acidilactici* 28 и *Latilactobacillus curvatus* 2, *Pediococcus acidilactici* 38, *Latilactobacillus curvatus* 1, *Latilactobacillus sakei* 105, *Staphylococcus carnosus* 108.

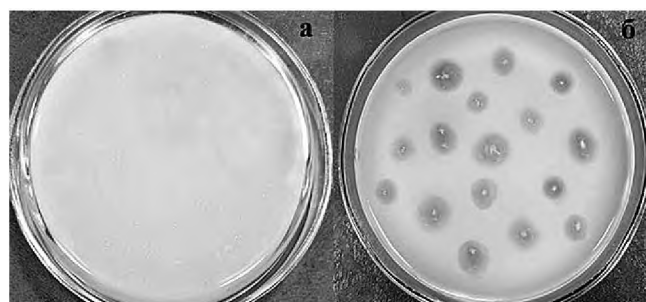


Рисунок 3

Колонии, окруженные беловатой зоной преципитации, образуемые протеолитическими микроорганизмами на среде MRS с добавлением 5 % раствора обезжиренного молока на примере штамма *Latilactobacillus curvatus* 2; а – контроль, б – опыт.

По результатам ПЦР (Рисунок 4) все исследованные штаммы обладали протеолитической активностью в связи с выявлением в их геномах генов *prtP*, *prtM*, *prtB*, *prtH* и *prtR*. Штаммы рода *Latilactobacillus* содержали гены *prtP*, *prtM*, *prtB*, *prtH* и *prtR*, однако *Latilactobacillus curvatus* 1 и *Latilactobacillus curvatus* 2 обладали только генами *prtM* и *prtR*. Штаммы рода *Pediococcus* также имели все вышеперечисленные гены. Штамм рода *Staphylococcus*, а именно *Staphylococcus carnosus* 108, обладал только генами *prtM* и *prtR*. Наибольшее количество генов протеаз обнаружено у штамма *L. sakei* 105 – пары генов PRTB10/PRTB20, Jp23/Jp25 и *prti2*/IP6Xba.

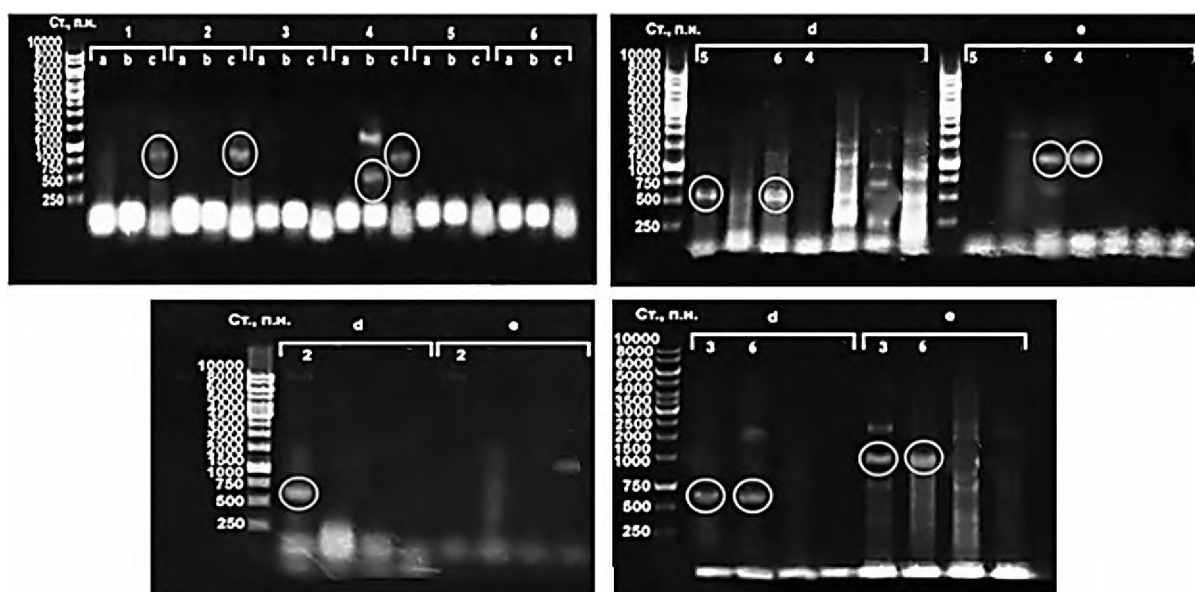


Рисунок 4

ДНК-электрофореграммы амплифицированных культур.

Условные обозначения: а – пара генов *PrtP100/PrtM700* (685 п.н.), б – PRTB10/PRTB20 (597 п.н.), в – Jp23/Jp25 (1034 п.н.), д – P15C/P06C (560 п.н.), е – *prti2*/IP6Xba (1052 п.н.); 1 – *P. acidilactici* 28, 2 – *P. acidilactici* 38, 3 – *S. carnosus* 108, 4 – *L. sakei* 105, 5 – *L. curvatus* 1, 6 – *L. curvatus* 2

Согласно данным Таблицы 2, накопление аминного азота, определенное методом ТНБС, было самым низким у штаммов *Staphylococcus carnosus* 108 (7,61 мМ), *Latilactobacillus sakei* 105 (8,55 мМ), *Latilactobacillus curvatus* 1 (10,15 мМ). По конечному

числу КОЕ/мл данные штаммы уступают остальным. Также по количеству накопленного аминного азота культуры уступают штаммам *Pediococcus* и *Latilactobacillus*. Согласно результатам ПЦР, штаммы *Latilactobacillus curvatus* 1 и *Staphylococcus*

Таблица 2

Характеристика параметров ферментации и уровня протеолитической активности штаммов МКБ при культивировании на нуттовом молоке

Образец	Время ферментации, ч	pH	Эквиваленты L-лейцина, мМ*	Δ эквиваленты L-лейцина, мМ*	КОЕ/мл
<i>Latilactobacillus curvatus</i> 1					
1/0	0	6,66 ± 0,10 ^a	6,20 ± 0,93 ^{ab}	0	1,5×10 ⁹
1/24	24	3,96 ± 0,59	15,22 ± 2,28 ^c	9,02 ± 1,35 ^a	1,89×10 ⁹
1/36	36	3,81 ± 0,57 ^b	16,35 ± 2,45	10,15 ± 1,52	1,1×10 ⁶
<i>Latilactobacillus curvatus</i> 2					
5/0	0	6,67 ± 0,10	8,67 ± 1,30 ^d	0	1,4×10 ⁹
5/24	24	3,98 ± 0,59 ^a	13,95 ± 2,09	5,28 ± 0,79 ^{bc}	1,1×10 ⁹
5/36	36	3,83 ± 0,57	26,05 ± 3,91	17,38 ± 2,61	1,9×10 ⁷
<i>Latilactobacillus sakei</i> 105					
2/0	0	6,67 ± 0,10 ^a	10,05 ± 1,51 ^d	0	1,08×10 ⁹
2/24	24	4,01 ± 0,60	15,52 ± 2,29	5,47 ± 0,82 ^a	1,11×10 ⁹
2/36	36	3,86 ± 0,58 ^c	18,60 ± 2,80 ^b	8,55 ± 1,28	0,65×10 ⁷
<i>Staphylococcus carnosus</i> 108					
6/0	0	6,66 ± 0,10 ^{ad}	9,48 ± 1,42 ^a	0	1,23×10 ⁹
6/24	24	3,94 ± 0,59 ^b	14,95 ± 2,24 ^c	5,47 ± 0,82	1,34×10 ⁹
6/36	36	3,80 ± 0,57	17,09 ± 2,56	7,61 ± 1,14 ^a	0,76×10 ⁶
<i>Pediococcus acidilactici</i> 38					
3/0	0	6,66 ± 0,10	12,67 ± 1,90	0	1,05×10 ⁹
3/24	24	3,94 ± 0,59 ^a	14,32 ± 2,15 ^c	1,65 ± 0,25 ^b	1,15×10 ⁹
3/36	36	3,80 ± 0,57	28,7 ± 4,31	16,03 ± 2,40 ^d	0,89×10 ⁷
<i>Pediococcus acidilactici</i> 28					
4/0	0	6,63 ± 0,10 ^b	10,01 ± 1,50 ^d	0	1,11×10 ⁹
4/24	24	3,85 ± 0,58	12,73 ± 1,91 ^a	2,72 ± 0,41	1,9×10 ⁹
4/36	36	3,79 ± 0,57 ^c	28,07 ± 4,31	18,06 ± 2,71	0,98×10 ⁷
Нут неферментированный (Контроль)					
К/0	0	6,64 ± 0,10	11,37 ± 1,71 ^b	0	1,2×10 ⁹
К/24	24	5,17 ± 0,78 ^a	29,20 ± 4,38	17,83 ± 2,67 ^c	1,99×10 ⁹
К/36	36	5,12 ± 0,77	36,06 ± 5,41 ^d	24,69 ± 3,70	0,68×10 ⁸

Примечание: a–d — различия между в столбце статистически значимы при $p < 0,05$; * — различия между столбцами статистически значимы при $p < 0,05$.

carnosus 108 содержат в себе только 2 гена протеолитической активности из 5 — *prtM* и *prtR*, что обуславливает небольшое накопление L-лейцина. В начальной точке ферментации высокое количество аминного азота накапливают культуры из рода *Pediococcus*, причем штамм *Pediococcus acidilactici* 38 по данному показателю превышает начальный показатель накопленного аминного азота у неферментированного нута (12,67 мМ против 11,37 мМ). С точки зрения общего накопления аминного азота и итоговому количеству КОЕ/мл штаммы рода *Pediococcus* являются наиболее перспективными. Также высокие показатели хатактерны для штамма *Latilactobacillus curvatus* 2 — конечное накопление аминного азота по L-лейцину составляет 17,38 мМ, конечная плотность культуры составила $1,9 \cdot 10^7$ КОЕ/мл.

ОБСУЖДЕНИЯ

Существует множество методов для оценки уровня протеолитической активности. Его можно измерить качественно, например, с использованием чашечного метода на агаровой среде с обезжиренным молоком и определением диаметра зон просветления вокруг колоний исследуемых микроорганизмов. Данный чашечный тест позволил нам распределить штаммы по их протеолитической активности в следующем порядке по убыванию активности: *Pediococcus acidilactici* 28 и *Latilactobacillus curvatus* 2, *Pediococcus acidilactici* 38, *Latilactobacillus curvatus* 1, *Latilactobacillus sakei* 105, *Staphylococcus carnosus* 108. Данный метод также используется другими учеными для определения протеолитической активности микроорганизмов, в т.ч. способных образовывать биоактивные пептиды. Так, хорошая протеолитическая активность наблюдалась у шести из восьми изолятов из различных фруктов при тестировании на обезжиренном молочном агаре. Четкие ореолы вокруг колоний были больше 6 мм, что свидетельствует о хорошей протеолитической активности (Maryam et al., 2017). При скрининге 205 изолятов, двадцать из них, показавшие протеолитическую активность на агаре из обезжиренного молока, продуцировали 34 пептида в гидролизате обезжиренного молока (Maryam A. et. al., 2012). Наиболее протеолитически активные изоляты из молока и сыра от коров, буйволов и коз также тестировали путем культивирования в обезжиренном молоке с последующим анализом ферментированного

молока электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) (Tulini et. al., 2016).

Нами для подтверждения качественной оценки протеолитической активности был выбран ТНБС метод, который наиболее часто используется при определении степени протеолиза и среди спектрофотометрических методов считается эталонным методом. Этот метод можно использовать независимо от типа активности фермента (Silvestre, 1997; Turgeon et al., 1991). В нашем случае ТНБС метод позволил определить протеолитическую активность исследуемых микроорганизмов и выбрать наиболее активные по этому показателю — *Pediococcus acidilactici* 28 и *Latilactobacillus curvatus* 2 *Pediococcus acidilactici* 38. Важно, что данный метод имел прямую корреляцию с результатами чашечного скрининга. В своих исследованиях Бегунова А.В. и соавт., 2020, также использовали метод ТНБС. Было установлено, что при ферментации молока штаммом *L. reuteri* LR1 в течение 24 ч происходило достоверное повышение антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей на фоне снижения количества L-лейциновых эквивалентов по сравнению с исходным молоком. В процессе дальнейшего культивирования увеличивались протеолитическая, антиоксидантная и ингибирующая активность ангиотензинпревращающего фермента, достигая наибольшего значения через 96 ч. ВЭЖХ-МС/МС анализ пептидного профиля ферментированного лактобактерией молока показал наличие пептидов, обладающих АПФ-ингибирующей, антимикробной, антиоксидантной и иммуномодуляторной активностями.

Для образования биологически активных пептидов при ферментации пищевых продуктов также применяются молочнокислые бактерии, в геноме которых обнаружены гены протеиназ, причем интенсивность этой активности различна у разных штаммов. Так, Pangallo и соавт., 2019 г., определяли наличие генов *prtP*, *pepX*, *pepN* и *bcaT* у молочнокислых бактерий, используемых при производстве сыра. Результаты показали, что гены, связанные с протеолизом во время созревания сыра у таких лактобацилл как *Lb. rhamnosus*, *Lb. helveticus*, *Lb. pentosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum* и *Lb. heilongjiangensis*, были активны (Pangallo et al., 2019).

Caplova и соавт., 2018 г., исследовали 17 штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из сыров на основе молока овец с целью обнаружения генов *prtP*, *pepN*, *pepX* и *bcaT* методом ПЦР. Используя системы ПЦР генов, полученных из *Lactobacillus*, показано, что пять штаммов содержали все исследуемые гены (три штамма *Lactobacillus paracasei*, один *Lactobacillus casei* и один *Lactococcus lactis*). В 14 штаммах *Lactobacillus prtP* был обнаружен в 5 штаммах, *pepN* в 14 штаммах, *pepX* в 12 штаммах и *bcaT* в 10 штаммах (Caplova et al., 2018).

Strahinic и соавт., 2019 г., изучали ген протеиназы *prtP* в природном изоляте *Lactobacillus plantarum* BGSJ3–18. Предварительно с помощью мультиплексной ПЦР было выделено из различных природных источников 37 лактобацилл, принадлежащих группе *Lactobacillus plantarum/paraplantarum*. Изучение протеолитической активности показало, что 28 *Lb. plantarum* и два *Lb. paraplantarum* гидролизует бета-казеин. Дальнейшие анализы всех протеолитически активных *Lb. plantarum* с праймерами, специфичными для различных типов СЕР, показали, что штамм BGSJ3–18 имеет каталитический домен *prtP*, а также межгенную область *prtP-prtM*, демонстрирующую более чем 95% идентичность последовательности с теми же областями, присутствующими в *Lb. paracasei*, *Lb. casei* и *L. lactis* (Strahinic et al., 2009).

В настоящей работе установлена взаимосвязь протеолитической активности микроорганизмов, определенной качественным и количественным методами, с набором выявленных генов протеиназ. Так штамм *L. sakei* 105, хоть и обладал тремя парами генов, в отличие от других исследованных штаммов, имеющих по одной или двум парам генов протеиназ, он не показал высокой протеолитической активности на среде MRS с обезжиренным молоком и методом ТНБС (18 мМ). Поэтому для отбора штаммов с высокой протеолитической активностью нужен комплексный подход.

По оценке результатов протеолитической активности на агаре с обезжиренным молоком и ТНБС методом, а также набору генов протеиназ, отобраны наиболее активные штаммы — *Pediococcus acidilactici* 28, *Latilactobacillus curvatus* 2 и *Pediococcus acidilactici* 38.

ВЫВОДЫ

В соответствии с поставленной целью — определить гены протеиназ у микроорганизмов, оценить их протеолитическую активность и определить взаимосвязи между протеолитической активностью и генетическими детерминантами, по совокупной оценке результатов протеолитической активности, определенной на молочном агаре и методом ТНБС, а также набору генов протеиназ, отобраны наиболее активные штаммы *Latilactobacillus curvatus* 2, *Pediococcus acidilactici* 28 и *Pediococcus acidilactici* 38. В связи с тем, что штамм *L. sakei* 105 хотя и обладает наибольшим количеством генов протеолитической активности, не показал высокой протеолитической активности на молочном агаре и методом ТНБС. Поэтому для отбора штаммов с высокой протеолитической активностью нужен комплексный подход, включающий качественные и количественные тесты, а также молекулярно-генетические методы. Это необходимо для оценки эффективности при производстве различной ферментированной пищевой продукции. Также при помощи скрининга протеолитически активных микроорганизмов возможно оценить их потенциал к образованию биологически активных пептидов, обладающих различными физиологическими функциями. Производство таких пептидов в составе ферментированных пищевых продуктов является перспективным направлением.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Коврижных А. В.: проведение исследовательского процесса, в частности, проведение экспериментов или сбор данных / доказательств.

Афанасьев Д. А.: проведение исследовательского процесса, в частности, проведение экспериментов или сбор данных / доказательств. Курирование данных, Написание - Подготовка черновика рукописи.

Ахангаран М.: визуализация, проведение исследования.

Гаравари М.: написание –подготовка черновика рукописи.

Чернуха И. М.: формулирование идеи; формулирование исследовательских целей и задач. Надзор и руководство за планированием и выполнением исследовательской деятельности, включая наставничество.

Машенцева Н. Г.: разработка методологии исследования; создание модели исследования. Подготовка и создание рукописи, её комментирование

или пересмотр, включая этапы до или после публикации рукописи.

Василиевич Н. В.: отслеживание воспроизводимости результатов/экспериментов и других результатов исследований. Применение статистических, математических или других формальных методов для анализа или синтеза данных исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьев, Д. А., Машенцева, Н. Г., Чернуха, И. М., Ахангаран, М., & Гхаравири, М. (2021). Оценка функциональности пептидов с применением методов биоинформатики. *Всё о мясе*, (6), 48–53. <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2021-6-48-53>
- Ахангаран, М., Афанасьев, Д. А., Чернуха, И. М., Машенцева, Н. Г., & Гхаравири, М. (2022). Биоактивные пептиды и антипитательные вещества нута: Характеристика и свойства (обзор). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*, 183(1), 214–223. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-1-214-223>
- Бабиц, О. О., Разумникова, И. С., Полетаев, А. Ю., & Морозова, А. И. (2011). Переработка вторичного кератинсодержащего сырья и получение белковых гидролизатов на пищевые и кормовые цели. *Техника и технология пищевых производств*, (2), 7–11.
- Бегунова, А. В. (2021). *Разработка технологии пробиотического кисломолочного продукта с Lactobacillus Reuteri LR1* [Кандидатская диссертация, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности]. М., Россия.
- Ковалев, Н. Н., Позднякова, Ю. М., Панчишина, Е. М., & Кращенко, В. В. (2019). Ферментативная активность культивируемых микроорганизмов кишечника трепанга. *Вестник Астраханского государственного технического университета*, (1), 91–100. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2019-1-91-100>
- Раднагурева, А. А., Лаврентьева, Е. В., & Дунаевский, Я. Е. (2009). Протеолитическая активность алкалофильных микроорганизмов водных систем Забайкалья. *Вестник Бурятского госуниверситета*, (4), 98–101.
- Югина, Н. А., Хисамова, А. И., Михайлова, Е. О., Хабибуллина, Л. И., & Шулаев, М. В. (2013). Анализ влияния биологически активных веществ на рост микроорганизмов активного ила городских очистных сооружений МУП «Водоканал». *Вестник Казанского технологического университета*, 16(10), 208–210.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Caplova-Godalova, Z., Pangallo, D., Krakova, L., Puskarova, A., Dranovska, H., Buckova, M., & Kuchta, T. (2018). Detection of genes prtP, pepN, pepX and bcaT involved in formation of aroma-active compounds in lactic acid bacteria from ewes' cheese. *Journal of Food and Nutrition Research*, 57(1336–8672), 195–200.
- Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H., & Zhao, G. (2017). Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(1), 316–330. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295988>
- Guo, T., Ouyang, X., Xin, Y., Wang, Y., Zhang, S., & Kong, J. (2016). Characterization of a New Cell Envelope Proteinase PrtP from *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC11055. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(37), 6985–6992. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03379>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47, 175–276. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(03\)47004-6](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(03)47004-6)
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2012). Extraction of proteins from gels: A brief review. *Methods in Molecular Biology*, 869, 403–408. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_33
- Leroy, F., & Vuyst, L. D. (2004). Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Li-Chan, E. C. Y. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.005>
- Mehmeti, I., Kiran, F., & Osmanagaoglu, O. (2011). Comparison of three methods for determination of protein concentration in lactic acid bacteria for proteomics studies. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2178–2185. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1881>
- Pangallo, D., Kraková, L., Puškárová, A., Šoltysb, K., Bučková, M., Koreňová, J., Budiše, J., & Kuchta, T. (2019). Transcription activity of lactic acid bacterial proteolysis-related genes during cheese maturation. *Food Microbiology*, 82, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.015>
- Pastar, I., Fira, D., Strahini, I., Krsti, K., Begovi, J., Topisirovi, L., & Jovanovi, G. (2006). Analysis of the presence of prtP proteinase gene in natural isolates of *Lactobacillus*

- rhamnosus. *Folia Microbiologica*, 51, 535–541. <https://doi.org/10.1007/BF02931617>
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
- Silvestre, M. P. C. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 60(2), 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00347-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00347-0)
- Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447–453. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0)
- Strahinic, I., Kojic, M., Tolinacki, M., Fira, D., & Topisirovic, L. (2009). The presence of prtP proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3–18. *Applied Microbiology*, 50(1), 43–49. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02748.x>
- Tonolo, F., Folda, A., Cesaro, L., Scalcon, V., Marin, O., Ferro, S., Bindoli, A., & Pia, M. (2019). Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 64, Article 103696. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103696>
- Tuler, T. R., Callanan, M. J., & Klaenhammer, T. R. (2002). Overexpression of peptidases in *Lactococcus* and evaluation of their release from leaky cells. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2438–2450. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74326-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74326-9)
- Turgeon, S. L., Bard, C., & Gauthier, S. F. (1991). Comparaison de trois méthodes pour la mesure du degré d’hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24(1–2), 14–18. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(91\)70013-8](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(91)70013-8)
- Venegas-Ortega, M. G., Flores Gallegos, A. C., Martínez Hernández, J. L., Aguilar, C. N., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2019). Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: A sustainable approach for healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12455>

REFERENCES

- Afanas’ev, D. A., Mashentseva, N. G., Chernukha, I. M., Akhangaran, M., & Gkharaviri, M. (2021). Otsenka funktsional’nosti peptidov s primeneniem metodov bioinformatiki [Evaluation of the functionality of peptides using bioinformatics methods]. *Vse o myase [All About Meat]*, (6), 48–53. <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2021-6-48-53>
- Akhangaran, M., Afanas’ev, D. A., Chernukha, I. M., Mashentseva, N. G., & Garaviri, M. (2022). Bioaktivnye peptidy i antipitatel’nye veshchestva nuta: Kharakteristika i svoistva (obzor) [Bioactive peptides and anti-nutritional substances of chickpeas: Characteristics and properties (review)]. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii [Works on Applied Botany, Genetics and Breeding]*, 183(1), 214–225. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-1-214-225>
- Babich, O. O., Razumnikova, I. S., Poletaev, A. Yu., & Morozova, A. I. (2011). Pererabotka vtorichnogo keratinsoderzhashchego syr’ya i poluchenie belkovykh gidrolizatov na pishchevye i kormovye tseli [Processing of secondary keratin-containing raw materials and obtaining protein hydrolysates for food and feed purposes]. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv [Equipment and Technology of Food Production]*, (2), 7–11.
- Begunova, A. V. (2021). *Razrabotka tekhnologii probioticheskogo kislomolochnogo produkta S Lactobacillus Reuteri LR1 [Development of technology for probiotic fermented milk product With Lactobacillus Reuteri LR1]* [Candidate Dissertation, Vserossiiskii nauchno-issledovatel’skii institut molochnoi promyshlennosti]. Moscow, Russia.
- Kovalev, N. N., Pozdnyakova, Yu. M., Panchishina, E. M., & Krashchenko, V. V. (2019). Fermentativnaya aktivnost’ kul’tiviruemykh mikroorganizmov kishechnika trepanga [Enzymatic activity of cultured microorganisms of the trepang intestine]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta [Bulletin of the Astrakhan State Technical University]*, (1), 91–100. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2019-1-91-100>
- Radnagurueva, A. A., Lavrent’eva, E. V., & Dunaevskii, Ya. E. (2009). Proteoliticheskaya aktivnost’ alkalofil’nykh mikroorganizmov vodnykh sistem Zabaikal’ya [Proteolytic activity of alkalophilic microorganisms of Transbaikalian water systems]. *Vestnik Buryatskogo gosuniversiteta [Bulletin of the Buryat State University]*, (4), 98–101.
- Yugina, N. A., Khisamova, A. I., Mikhailova, E. O., Khabibullina, L. I., & Shulaev, M. V. (2013). Analiz vliyaniya biologicheskii aktivnykh veshchestv na rost mikroorganizmov aktivnogo ila gorodskikh ochistnykh sooruzhenii MUP “Vodokanal” [Analysis of the effect of biologically active substances on the growth of microorganisms of activated sludge of municipal sewage treatment plants of Municipal Unitary Enterprise “Vodokanal”]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta [Bulletin of Kazan Technological University]*, 16(10), 208–210.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Caplova-Godalova, Z., Pangallo, D., Krakova, L., Puskarova, A., Dranovska, H., Buckova, M., & Kuchta, T. (2018). Detection of genes prtP, pepN, pepX and bcaT involved in formation of aroma-active compounds in lactic acid bacteria from ewes’ cheese. *Journal of Food and Nutrition Research*, 57(1336–8672), 195–200.

- Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H., & Zhao, G. (2017). Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(1), 316–330. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295988>
- Guo, T., Ouyang, X., Xin, Y., Wang, Y., Zhang, S., & Kong, J. (2016). Characterization of a New Cell Envelope Proteinase PrtP from *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC11055. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(37), 6985–6992. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03379>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47, 175–276. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(03\)47004-6](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(03)47004-6)
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2012). Extraction of proteins from gels: A brief review. *Methods in Molecular Biology*, 869, 403–408. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_33
- Leroy, F., & Vuyst, L. D. (2004). Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Li-Chan, E. C. Y. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.005>
- Mehmeti, I., Kiran, F., & Osmanagaoglu, O. (2011). Comparison of three methods for determination of protein concentration in lactic acid bacteria for proteomics studies. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2178–2185. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1881>
- Pangalloa, D., Kraková, L., Puškárová, A., Šoltysb, K., Bučková, M., Koreňová, J., Budiše, J., & Kuchtad, T. (2019). Transcription activity of lactic acid bacterial proteolysis-related genes during cheese maturation. *Food Microbiology*, 82, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.015>
- Pastar, I., Fira, D., Strahini, I., Krsti, K., Begovi, J., Topisirovi, L., & Jovanovi, G. (2006). Analysis of the presence of prtR proteinase gene in natural isolates of *Lactobacillus rhamnosus*. *Folia Microbiologica*, 51, 535–541. <https://doi.org/10.1007/BF02931617>
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
- Silvestre, M. P. C. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 60(2), 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00347-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00347-0)
- Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447–453. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0)
- Strahinic, I., Kojic, M., Tolinacki, M., Fira, D., & Topisirovic, L. (2009). The presence of prtP proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3–18. *Applied Microbiology*, 50(1), 43–49. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02748.x>
- Tonolo, F., Folda, A., Cesaro, L., Scalcon, V., Marin, O., Ferro, S., Bindoli, A., & Pia, M. (2019). Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 64, Article 103696. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103696>
- Tuler, T. R., Callanan, M. J., & Klaenhammer, T. R. (2002). Overexpression of peptidases in *Lactococcus* and evaluation of their release from leaky cells. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2438–2450. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74326-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74326-9)
- Turgeon, S. L., Bard, C., & Gauthier, S. F. (1991). Comparaison de trois méthodes pour la mesure du degré d’hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement [Comparison of three methods for measuring the degree of hydrolysis of enzymatically modified milk proteins]. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24(1–2), 14–18. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(91\)70013-8](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(91)70013-8)
- Venegas-Ortega, M. G., Flores Gallegos, A. C., Martínez Hernández, J. L., Aguilar, C. N., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2019). Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: A sustainable approach for healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12455>