

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 577.577.151.5
doi: 10.17223/19988591/20/4

М.А. Брацихина, С.А. Рябцева

Северо-Кавказский федеральный университет (г. Ставрополь)

ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *Lactococcus lactis*

Исследовано влияние пребиотика лактулозы, лактозы и глюкозы на протеолитическую активность двух генетически модифицированных штаммов *Lactococcus lactis* pNZ45subC и pNZ48CE. Установлено, что наивысшая протеолитическая активность обоих штаммов наблюдается в присутствии глюкозы. Внесение лактозы и лактулозы, вероятно, блокирует действие низина, индуцирующего синтез протеазы штаммами *L. lactis* pNZ45subC и pNZ48CE, в связи с чем отмечено значительное снижение протеолитической активности. Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование лактозы и лактулозы при производстве кисломолочных продуктов не будет активизировать протеолитическую активность исследуемых штаммов, а следовательно, способствовать возникновению пороков. Установлена возможность использования для индукции *L. lactis* разведенного в 10^4 раз супернатанта, полученного из низинпродуцирующего штамма *L. lactis* NZ9700.

Ключевые слова: протеолитическая активность; молочнокислые микроорганизмы; *Lactococcus lactis*; низин.

Введение

Lactococcus lactis относится к грамположительным молочнокислым бактериям и широко используется в молочной промышленности, в частности при производстве кисломолочных продуктов, кисломолочного масла и сыров. Кроме того, *L. lactis* активно используется в различных направлениях биотехнологии [1–4]. На сегодняшний день много работ посвящено исследованию физиологических и генетических свойств *L. lactis* и полностью расшифрована последовательность геномов некоторых штаммов [5–7]. Одной из важнейших характеристик молочнокислых микроорганизмов является их протеолитическая активность. Повышенная способность микрофлоры заквасок разлагать белки используется в сыроделии, однако при производстве кисломолочных продуктов это свойство может привести к возникновению пороков.

В исследованиях, проведенных ранее, было установлено, что некоторые углеводы, в частности пребиотик лактулоза, могут оказывать влияние на

такие свойства молочнокислых микроорганизмов, как: кислотообразующая способность и выживаемость [8, 9]. Однако зависимость протеолитической активности лактококков от присутствия в среде культивирования углеводов изучена недостаточно. В связи с этим целью данной работы стало исследование влияния лактулозы, лактозы и глюкозы на протеолитическую активность двух штаммов *L. lactis*.

Материалы и методики исследования

Работа выполнена в рамках программы Erasmus Mundus Action 2 (01.02.2011–30.06.2012) на кафедре биотехнологии Вроцлавского университета (Польша); консультантом выступал д-р техн. наук, проф. Марчин Лукашевич.

Объектами исследований являлись два генетически модифицированных штамма *L. lactis*: pNZ45subC и pNZ48CE, взятые из коллекции микроорганизмов Университета во Вроцлаве. Оба штамма содержат ген *subC*, полученный из *Bacillus licheniformis* и отвечающий за продукцию протеазы. Отличительной особенностью штамма *L. lactis* pNZ48CE является способность к синтезу двух протеаз. Поскольку синтез протеазы данными микроорганизмами возможен лишь в результате индукции низином, то в работе был использован также низинпродуцирующий штамм *L. lactis* NZ9700.

Исследования проводились с использованием системы NICE (nisin-controlled gene expression) [10]. Система основана на механизмах регуляции оперона *nisA* в штаммах *L. lactis*. Низин индуцирует последовательность процессов, которая начинается с присоединения к мембраносвязанному рецептору NisK. Затем фосфатная группа от активированного NisK переходит к внутриклеточному ответному регулятору NisR, активируя этот регулятор. Далее NisR индуцирует низин-оперон в промоторе *nisA*. Промотор *nisA* контролирует экспрессию генов, участвующих в биосинтезе низина (или интересующего гена).

На первом этапе исследований проводилась активация штаммов *L. lactis* путем инкубирования при температуре 30°C в течение 20 ч в среде M17 [11], содержащей 0,5% глюкозы и 5 мг/мл антибиотика хлорамфеникола. Рост культур определяли по изменению оптической плотности при длине волны 600 нм (Thermo Electron Corporation Evolution 600 UV-Visible Spectrophotometer, США).

На следующем этапе для приготовления опытных образцов в среду, предназначенную для культивирования *L. lactis*, добавляли обезжиренное молоко в количестве 10% от объема образца и углеводы: глюкозу, лактозу или лактулозу в концентрации 1, 3 и 5%. Далее в среду вносили активированную культуру с концентрацией клеток, соответствующей оптической плотности 0,1. Индукция штаммов *L. lactis* проводилась при этом же значении оптической плотности путем добавления низина или супернатанта, полученного из

штамма *L. lactis* NZ9700, разведенного в 10^4 раз. Культивирование микроорганизмов проходило в течение 20 ч при 30°C .

После инкубирования проводили определение протеолитической активности опытных образцов. Для определения протеолитической активности использовался метод с применением в качестве субстрата 0,5% раствор казеина, приготовленного в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH раствора поддерживали на уровне 10. Метод основан на определении скорости ферментативной реакции гидролиза субстрата под действием исследуемых протеолитических ферментов, содержащихся в материале, взятом на анализ. Скорость реакции определяли по количеству образовавшихся аминокислот – тирозина и триптофана.

Для измерения протеолитической активности к 500 мкл субстрата добавляли 100 мкл супернатанта, полученного в результате центрифугирования опытных образцов в течение 10 мин при температуре 4°C и скорости 13 000 об./мин (5415R centrifuge, Eppendorf, Германия). Приготовленные образцы инкубировали при 50°C (термостат Bio TDB-100, BioSan, Латвия) в течение 30 мин. Остановку реакции осуществляли путем добавления 500 мкл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Далее проводили повторное центрифугирование образцов и измерение оптической плотности супернатанта при длине волны 275 нм. Все исследования проведены в 4–5-кратной повторности. Полученные результаты были обработаны с помощью программы MS Excel и представлены на рисунках в виде среднеарифметических значений с указанием стандартных отклонений измеряемых показателей. Для всех измерений величина стандартного отклонения не превышала 5%.

Результаты исследования и обсуждение

Синтез протеазы указанными штаммами *L. lactis* возможен лишь под действием низина, однако низин является довольно дорогостоящим веществом. В связи с этим на первом этапе исследований представляло интерес проведение сравнения протеолитической активности *L. lactis*, индуцированных низином либо супернатантом, полученным из штамма *L. lactis* NZ9700. В исследованиях, проведенных нами ранее, отмечено, что наивысшие показатели протеолитической активности наблюдаются при культивировании штаммов *L. lactis* в среде, содержащей 10% обезжиренного молока. В связи с этим культивирование и индукцию штаммов *L. lactis* pNZ45subC и *L. lactis* pNZ48CE проводили в среде M-17, содержащей 0,5% глюкозы и 10% обезжиренного молока. Результаты измерения протеолитической активности штамма *L. lactis* pNZ45subC, индуцированного низином и супернатантом, представлены на рис. 1 и 2 соответственно.

Полученные результаты (рис. 1) показывают, что наибольшая протеолитическая активность была отмечена в образцах, содержащих 0,5–10 нг/мл низина, в образцах, не содержащих низин, уровень протеолитической активности был близок к 0.

На рис. 2 видно, что наивысший уровень протеолитической активности отмечен в образцах, индуцированных супернатантом, разведенным в 10^4 раз. Аналогичные результаты были получены при использовании штамма *L. lactis* pNZ48CE.

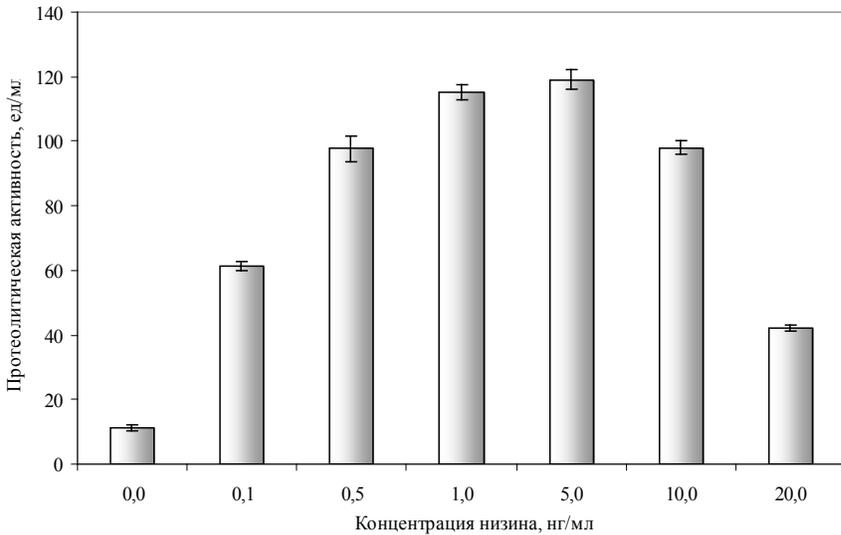


Рис. 1. Зависимость протеолитической активности *L. lactis* pNZ45subC от концентрации низина

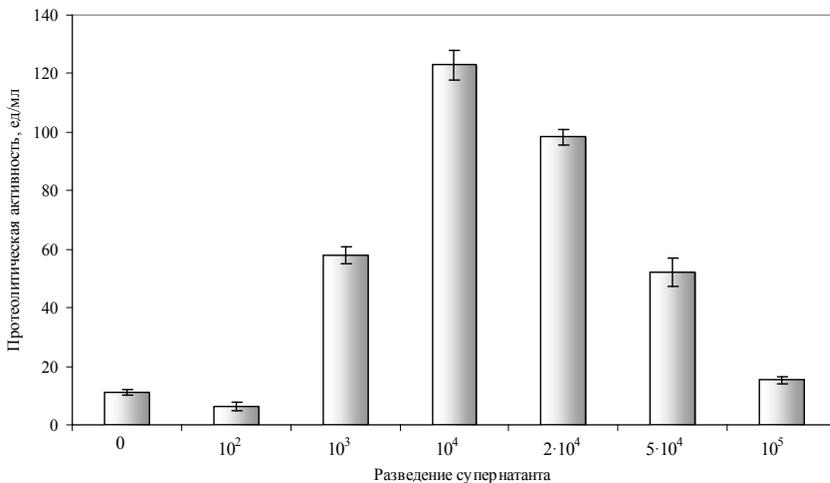


Рис. 2. Зависимость протеолитической активности *L. lactis* pNZ45subC от концентрации супернатанта

Поскольку уровень протеолитической активности в образцах, индуцированных низином и супернатантом, разведенным в 10^4 раз, находится прак-

тически на одинаковом уровне, то в дальнейших исследованиях индукция проводилась супернатантом, полученным из штамма NZ9700, что является экономически более выгодным.

На следующем этапе были проведены исследования по влиянию различных углеводов на уровень протеолитической активности двух штаммов *L. lactis* pNZ45subC и pNZ48CE. Культивирование и индукция штаммов проводилась в среде M-17, содержащей 10% обезжиренного молока. Результаты измерения протеолитической активности представлены на рис. 3, 4.

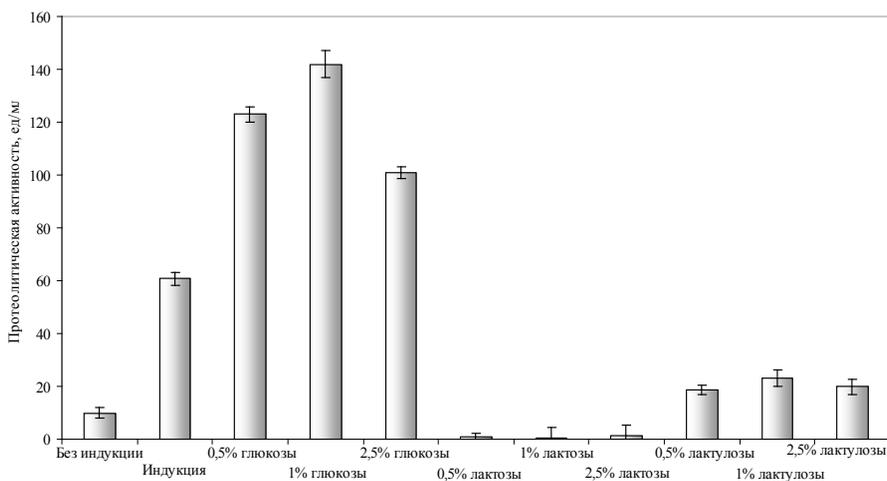


Рис. 3. Зависимость протеолитической активности *L. lactis* pNZ45subC от вида и концентрации углеводов

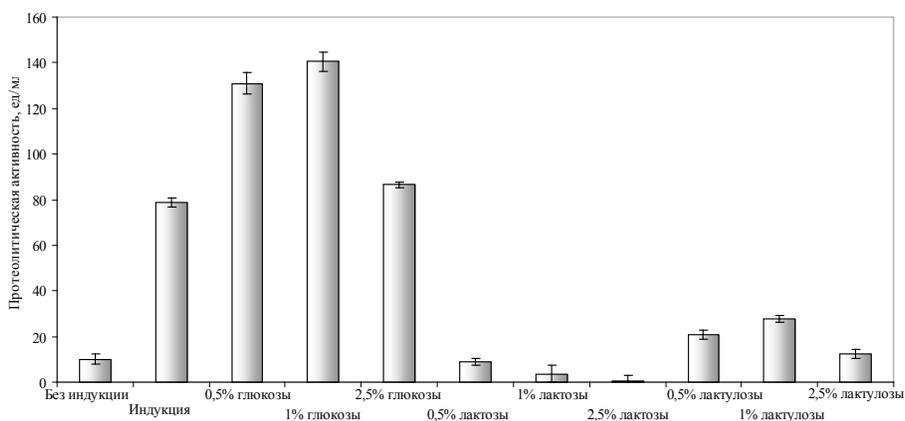


Рис. 4. Зависимость протеолитической активности *L. lactis* pNZ48CE от вида и концентрации углеводов

Как видно из рис. 3, 4, наивысший уровень протеолитической активности штаммов *L. lactis* pNZ45subC и pNZ48CE отмечен в образцах, содержащих глюкозу. Присутствие же в среде лактозы и лактулозы, вероятно, блокирует действие низина, вследствие чего протеолитическая активность обоих штаммов близка к 0.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования позволили установить возможность замены низина, необходимого для индукции штаммов *L. lactis* pNZ45subC и pNZ48CE, на супернатант, полученный из низинпродуцирующего штамма *L. lactis* NZ9700. При этом использование разведенного в 10^4 раз супернатанта обеспечивает тот же уровень протеолитической активности, что и 0,5–10 мг/мл низина.

Наивысшая протеолитическая активность наблюдается при культивировании штаммов *L. lactis* pNZ45subC и pNZ48CE в среде М-17 с добавлением 10% обезжиренного молока и 0,5–1% глюкозы. Поскольку протеолитическая активность образцов с добавлением глюкозы 0,5 и 1% находится практически на одинаковом уровне, то экономически более выгодным является внесение меньшей концентрации углевода – 0,5%. Добавление в среду для культивирования лактозы и лактулозы способствует значительному снижению протеолитической активности обоих штаммов *L. lactis* и, по всей видимости, ингибирует действие низина. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что внесение лактозы и лактулозы не будет активизировать протеолитическую активность молочнокислых лактококков и, как следствие, возникновение пороков кисломолочных продуктов.

Литература

1. Blatny J.M., Ertesvag H., Nes I.F., Valla S. Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis*; expression of the *Azotobacter vinelandii* algE6 gene product displaying mannuronan C-5 epimerase activity // FEMS Microbiology Letters. 2003. Vol. 227, is. 2. P. 229–235.
2. Kunji E.R., Slotboom D.J., Poolman B. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. 2003. Vol. 1610, is. 1. P. 97–108.
3. Morello E.L., Bermudez-Humaran G., Llull D. et al. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 2008. № 14. P. 48–58.
4. Nouaille S., Ribeiro L.A., Miyoshi A., Pontes D. et al. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis* // Genetics and Molecular Research. 2003. № 2. P. 102–111.
5. Bolotin A., Wincker P., Mauger S. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 // Genome Research. 2001. № 11. P. 731–753.

6. Siezen R.J., Bayjanov J., Renckens B., Wels M. et al. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant-associated lactic acid bacterium // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 2003. Vol. 192. P. 2649–2650.
7. Wegmann U., O'Connell-Motherway M., Zomer A. et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 // Journal of Bacteriology. 2007. Vol. 189, № 8. P. 3256–3270.
8. Храпцов А.Г., Рябцева С.А., Полищук Д.О. (Мячина Д.О.). Разработка технологии цельно-молочных продуктов с внесением концентрата лактулозы // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. 2003. № 1 (6). С. 30–32.
9. Рябцева С.А., Брацихина М.А., Ганина В.И. Проблема сохранения жизнеспособности заквасочной микрофлоры и пути ее решения // Молочная промышленность. 2010. № 1. С. 22–23.
10. Platteeuw C., van Aalen-Boerrigter I. et al. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis* // Applied and Environmental Microbiology. 1996. Vol. 62, № 3. P. 1008–1013.
11. Terzaghi B.E., Sandine W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages // Applied Microbiology. 1975. Vol. 29, № 6. P. 807–813.

Поступила в редакцию 03.09.2012 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2012. № 4 (20). P. 47–54

doi: 10.17223/19988591/20/4

Maria A. Bratcikhina, Svetlana A. Ryabtseva

North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

INFLUENCE OF CARBOHYDRATES ON PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *Lactococcus lactis* STRAINS

Lactococcus lactis is a Gram-positive lactic acid bacterium that is commonly used in traditional food industry such as cheese, fermented milk products and butter production. In addition, it is extensively used in modern biotechnological applications. Recently, many studies have been done on physiology and genetics of this bacterium, therefore a wide variety of genetic tools have been developed. Nowadays several genomes of *L. lactis* strains are completely sequenced. One of important properties of lactic acid bacterium is their proteolytic activity. The strains with a high level of proteolytic activity are used in cheese production, but their usage in fermented milk products production can lead to flaw initiation. Several carbohydrates, for example, prebiotic lactulose can influence starter microflora properties. In this research work the influence of lactulose, lactose and glucose on proteolytic activity of 2 strains *L. lactis* pNZ45subC and NZ48CE was studied.

First, the gene expression was induced by the addition of nisin to the final concentration of 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml and 20 ng/ml. The induced and noninduced cells were harvested after 20 h, and the proteolytic activity assay was performed. The highest proteolytic activity was observed after induction of 1 ng/ml and 5 ng/ml, in noninduced strains proteolytic activity was close to zero. To verify the optimal condition for the protein overexpression, a range of the nisin and the NZ9700 supernatant concentration was tested. All induced cultures showed higher enzymatic activity than the non-induced culture. The highest activity around 120 U/mL was obtained when 10 000–20 000 diluted supernatant from *L. lactis* NZ9700 was used.

These results are comparable with the results received for 1–5 ng/mL nisin induction. In further experiments the supernatant of the NZ9700 strain was used.

*The highest proteolytic activity for both strains was observed during the growth on M17 medium supplemented with 10% milk and 0.5–1.0% of glucose. Growth of bacteria only in M17 did not lead to high enzymatic activity of the culture under induction, what might suggest that the secreted protease is not stable under these conditions. Lactose and lactulose presence probably block nisin action and the level of proteolytic activity was close to zero. It means that adding lactose and lactulose to fermented milk products will not lead to activation of *L. lactis* pNZ45subC and NZ48CE proteolytic activity and will not cause flaw initiation.*

Key words: *proteolytic activity; lactic acid microorganisms; Lactococcus lactis; nisin.*

Received September 03, 2012