

УДК 573.6.086.835:579.8; 573.6.086.835

**ОЦЕНКА ПЕПТИДНОГО ПОТЕНЦИАЛА СТАРТОВЫХ КУЛЬТУР, А ТАКЖЕ
ИХ КОМПОЗИЦИИ, В МЯСНОМ СЫРЬЕ****Д.А. Афанасьев¹, И.М. Чернуха¹, Н.Г. Машенцева²**¹ ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия² Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

В последние годы активно проводятся исследования по изучению веществ белковой и пептидной природы, содержащихся в мясном сырье и готовых мясных продуктах. Эти соединения образуются, в том числе, в процессе ферментативной обработки мясного сырья стартовыми культурами, которые обуславливают качественные и функциональные характеристики, а также безопасность готовых мясных продуктов [1, 2]. Способность штаммов продуцировать биоактивные пептиды основана на гидролитических реакциях, происходящих под действием протеолитических ферментов микроорганизмов. Ферменты, непосредственно участвующие в образовании биоактивных пептидов, представляют собой протеиназы, связанные с клеточной стенкой (семейство PrtP) молекулярной массой приблизительно 200 кДа, и которые также могут быть внеклеточными. Гены PrtP могут быть обнаружены как в составе хромосомы, так и на плазмиде. На экспрессию протеиназ PrtP влияют различные факторы в зависимости от штамма. Различия, обнаруженные в протеиназах молочнокислых бактерий, объясняют разнообразие образующихся биоактивных пептидов, даже когда используется один и тот же белковый матрикс, и их состав зависит от аминокислотной специфичности, в которой проводится гидролитическая ферментативная реакция [3].

Различными научными коллективами были проведены исследования протеолитической активности стартовых культур в отношении саркоплазматических и миофибриллярных белков мяса. Так, протеолиз миофибриллярных белков штаммом *L. plantarum* CRL 681 приводил к увеличению содержания лизина, аргинина и лейцина, в то время как из саркоплазматических белков в основном высвобождался аланин [4]. Для штаммов *Lactobacillus curvatus* CECT 904 и *Lactobacillus sakei* CECT 4808 отмечена активность протеиназы в отношении саркоплазматических белков [5]. Штаммы *Lactobacillus sakei* DSM 6333, *Lactobacillus plantarum* B21 и *Lactobacillus farciminis* DSM 201 84 продемонстрировали протеолитическую активность в отношении изоформы мышечной гликогенфосфорилазы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [6]. Половина из исследованных штаммов *Staphylococcus xylosus* показала изменения белкового профиля свинины при исследовании методом электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом [7]. При использовании в качестве композиции *Staphylococcus xylosus* и *Pediococcus pentosaceus* в турецких сосисках сукука основные изменения в протеолитических характеристиках происходили на стадии ферментации с увеличением содержания небелкового азота и снижением растворимости белка [8]. Ряд стартовых культур, например, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, образуют биоактивные пептиды в процессе ферментации белкового, в т. ч. мясного сырья, за счет различных внутриклеточных пептидаз, включая эндопептидазы, аминопептидазы, дипептидазы и трипептидазы [9].

Цель работы – сравнение пептидного потенциала стартовых культур лактобактерий *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. и денитрифицирующих стафилококков для образования биологически активных пептидов, а также оценка влияния бактериальной композиции на протеолитические изменения в мясном сырье.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ фракционного состава белков исследуемых образцов проводили методом одномерного электрофореза в 12,5 % SDS-PAGE в ПААГ в камере «VE-10» (Helicon, США) при постоянном напряжении 160 В. По достижению фронтом разделяющего геля увеличивали напряжение до 180 В и продолжали разделение в течение 4–5 ч. Количество внесенного белка в гель составляло 20 мкг для всех образцов. В качестве стандарта для электрофореза использовали маркер (Thermo, США), представляющий собой смесь 11 рекомбинантных белков. Окрашивание проводили с использованием красителя Кумасси G-250. Белковый состав анализировали с помощью базы данных UniProtProteinDataBase (<http://www.uniprot.org/>) и «Протеомика мышечных органов» (<http://mp.inbi.ras.ru>).

В качестве объектов исследования были использованы стартовые культуры: *Pediococcus acidilactici* 25, *P. acidilactici* 8, *P. pentosaceus* 39, *P. pentosaceus* 31, *P. acidilactici* 38, *Lactobacillus plantarum* 100, *L. sakei* 105, *L. sakei* 103, *L. curvatus* 2, *L. sakei* 45, *Staphylococcus xylosus* 45, *Staphylococcus xylosus* P-1, *Staphylococcus carnosus* 111–2, *Staphylococcus carnosus* 108 из коллекции ФГБОУ ВО МГУПП. Бактериальная композиция была составлена из штаммов *Lactobacillus sakei* 103, *Pediococcus pentosaceus* 39 и *Staphylococcus carnosus* 108.

Образец мышечной ткани *longissimus dorsi* крупного рогатого скота (КРС) инъецировали бактериальной суспензией с содержанием клеток 1×10^9 КОЕ/мл (по стандарту мутности McFarland) и ферментировали при температуре $+4 \pm 2$ °C в течение 12 суток в условиях вакуума с целью предотвращения внешней контаминации. Опытные пробы отбирались на 3, 6, 9 и 12 экспериментальные сутки. При приготовлении бактериальной композиции бактериальная суспензия каждой отдельной культуры с концентрацией клеток 10^9 КОЕ/мл смешивалась в соотношении 1:1:1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлен белковый профиль мышцы *longissimus dorsi* КРС, ферментированной стартовыми культурами рода *Pediococcus*. Под действием ферментных систем исследуемых культур происходит накопление белковых фрагментов в области расположения тяжелых цепей миозина (245–249 кДа). Данные фрагменты, вероятно, образуются в ходе гидролиза нативного миозина (>500 кДа). Исключение составляет штамм *Pediococcus pentosaceus* 39, по-видимому, обладающий недостаточной для деструкции миозина ферментативной активностью. Изменения коснулись и диапазона молекулярной массы, соответствующего саркоплазматическому белку миогену (~150 кДа) – к 12 суткам эксперимента существенно увеличивается интенсивность окраски белковой полосы в образцах со штаммами *P. acidilactici* 25, *P. pentosaceus* 39 и *P. acidilactici* 38. Отличны изменения в области расположения α -актина (103–104 кДа). Так, в образцах с *P. acidilactici* 25 и *P. pentosaceus* 39 происходит значительное увеличение интенсивности окраски белковой полосы к 12 суткам эксперимента, что свидетельствует о накоплении продуктов деструкции на этом уровне молекулярных масс. В остальных образцах, напротив, происходит уменьшение интенсивности окраски белковой полосы. Содержание белковых фрагментов на уровне расположения аконитазы (~80 кДа) во всех образцах на протяжении всего исследования практически не изменяется, а в области расположения пируваткиназы (~58 кДа) и десмина (53–55 кДа) наиболее интенсивно уменьшается в образцах с *P. acidilactici* 8 и *P. pentosaceus* 39. К 9 суткам эксперимента начинается снижение интенсивности окраски белковой полосы в месте локализации актина (~45 кДа) во всех образцах. Это наиболее заметно в образцах с культурами *P. acidilactici* 8 и *P. pentosaceus* 39. На промежутке молекулярных масс 41,5–41,7, что предположительно соответствует β -енолазе, начиная с 3 суток, увеличивается интенсивность окраски белковой полосы в образце с *P. acidilactici* 8, а в образцах с *P. pentosaceus* 39 и *P. acidilactici* 38 напротив уменьшается.

Интенсивность окраски белковых полос на уровне 32–37 кДа, где могут находиться тропомиозин Т1 и тропонин Т быстрого типа, снижается на 3 сутки эксперимента и, в дальнейшем, практически не изменяется. Фрагменты белков в области нахождения карбоангидразы 3 (29,5 кДа), фосфоглицератмутазы 2 (29 кДа) и смеси глутатион-S-трансферазы Р и триозофосфатизомеразы (24 кДа) подвергаются наибольшей деструкции под действием ферментных систем штаммов *P. acidilactici* 25 (начиная с 9 суток) и *P. acidilactici* 38 (начиная с 12 суток), о чем свидетельствует явное размытие границ белковых полос. Незначительным изменениям подвергаются белковые фрагменты в месте расположения β -хемокинов (~12 кДа) во всех образцах, кроме образцов с культурами *P. acidilactici* 8 и *P. pentosaceus* 31, где происходит постепенное увеличение интенсивности окраски белковой полосы, что свидетельствует о накоплении белковых фрагментов в данном диапазоне молекулярных масс. Следует отметить, что такое увеличение наиболее заметно в образце с *P. acidilactici* 8 уже на 3 сутки эксперимента, в то время как в образце с *P. pentosaceus* 31 оно фиксируется лишь на 12 сутки.

Abbasilias et. al., 2017, показали наличие сильной пептидазы (лейцин-ариламидазы) в штамме *P. acidilactici* Kp10 [10]. У *Pediococcus pentosaceus* OA1 обнаружена интенсивная протеолитическая активность на тестах из пшеничной муки [11]. Исследован протеолиз в сосисках из белого карпа, инокулированных *Lactobacillus plantarum* ZY40 и *Pediococcus pentosaceus* GY23. Протеолитический процесс был более интенсивным в колбасах, инокулированных *P. pentosaceus* GY23 [12].

Действие бактерий рода *Lactobacillus* схоже с действием бактерий рода *Pediococcus*, однако имеет ряд отличий. Также, как и в случае с педиококками, под действием ферментных систем лактобацилл происходит накопление белковых фрагментов на уровне расположения тяжелых цепей миозина (245–249 кДа). Начиная с 6 суток эксперимента в образцах с культурами *L. sakei* 105 и *L. curvatus* 2 начинается изменение миогена (~150 кДа) – значительно уменьшается его содержание. В остальных образцах его содержание начинает уменьшаться лишь с 9 суток. Значительным изменениям подверглись белковые фракции на уровне α -актина (103–104 кДа) – во всех образцах их содержание резко падает уже на 3 сутки эксперимента. К 9 суткам белковые полосы на уровне α -актина и аконитазы (80 кДа) едва уловимы, что говорит о значительной деструкции белковых фрагментов в этой области. Исключение составляет образец с культурой *L. sakei* 45 – фрагменты белков в области α -актина частично подвергаются деструкции, а в области аконитазы интенсивность окраски белковой полосы практически не изменяется по сравнению с этой же полосой в контрольном образце. Содержание фрагментов в области расположения актина (~45 кДа) изменяется незначительно по сравнению с контролем, кроме образцов с культурами *L. sakei* 103 и *L. curvatus* 2, где деструкция ярко выражена. На промежутке молекулярных масса 41,5–41,7 кДа, что предположительно соответствует β -енолазе, белковая полоса практически полностью разрушается, начиная с 6 суток эксперимента. К 9 суткам данная белковая полоса отсутствует во всех образцах. Наиболее интенсивно деструкция белковых фрагментов в этой области идет в образце с *L. curvatus* 2. Области расположения карбоангидразы 3 (29,5 кДа) и фосфоглицератмутаза 2 (29 кДа) остаются практически неизменными. Смесь глутатион-S-трансферазы Р и триозофосфатизомеразы (24 кДа) подвергается практически полной деструкции во всех образцах. Белковые фрагменты в области легких цепей миозина 1/3 (21–21,5 кДа) подвергаются значительной деструкции уже с 3 суток эксперимента. Исключение составляет образец с *L. sakei* 45, где деструкция прошла незначительно. В области расположения миоглобина (18 кДа) наблюдается повышение интенсивности окраски белковой полосы, что свидетельствует о накоплении белковых фрагментов в данной области. Наиболее ярко выражено накопление белковых фрагментов к 12 суткам эксперимента в образцах с *L. sakei* 103 и *L. sakei* 45. Фиксируется накопление белковых фрагментов во всех образцах на уровне 17 кДа (предположительно, в этой области располагается одна из изоформ легкой цепи миозина 1/3). Наиболее интенсивно накопление идет в образце с *L. sakei* 103. В области α - и β -гемоглобина (15,7–15,9 кДа) наблюдается увеличение интенсивности окраски белковых полос во всех образцах по сравнению с контрольным, что также свидетельствует о накоплении белковых фрагментов в этой области. Следует отметить, что это накопление идет лишь до 9 суток, далее наблюдается деструкция. В диапазоне молекулярных масс 10–15 кДа, где предположительно определяются α - и β -хемокины, идет накопление белковых фрагментов во всех опытных образцах. В контрольном образце белковые полосы в данной области отсутствуют.

В работе Almeida et. al., 2018, инокуляция *L. curvatus* CRL705 приводила к образованию 56 низкомолекулярных пептидов, при внесении *Lactobacillus plantarum* и *L. sakei* высвобождалось большое количество аминокислот [13]. В работе Benito et. al., 2007, из 192 штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из естественно ферментированных сухих колбас, только 3 штамма *P. acidilactici* проявляли слабую протеолитическую активность в отношении миофибриллярных или саркоплазматических белков [14].

Стафилококки *Staphylococcus xylosus* 45, *Staphylococcus xylosus* P-1, *Staphylococcus carnosus* 111–2, *Staphylococcus carnosus* 108 показали протеолитическую активность как в отношении саркоплазматических, так и миофибриллярных белков. Отмечалось снижение интенсивности окраски белковых полос в диапазоне молекулярных масс примерно 10–50 кДа. Также деструкции подверглись тяжелые цепи миозина (245–249 кДа). В работе Mauriello et. al., 2002, из 27 исследованных штаммов *Staphylococcus xylosus* 18 показали протеолитическую активность методом SDS-PAGE: 12 штаммов были способны гидролизовать саркоплазматические белки, 12 – миофибриллярные белки и 6 штаммов были способны гидролизовать и те, и другие. Электрофоретические профили, полученные в результате действия штаммов BS5 и ES1, показали снижение интенсивности белковых полос примерно на 48, 41, 22 и 20 кДа. Эти же белковые полосы были полностью гидролизованы под действием штамма AS27. Штаммы ES2 и BS5 показали свою активность полностью гидролизовав миозин (220 кДа), актин (45 кДа) и тропомиозин Т1 (35 кДа), и появлением полос примерно на 100 и 25 кДа. Такая же белковая картина была получена и после действия штамм ES1, за исключением исчезновения тропомиозина Т1 [7]. Показана протеолитическая активность педиококков *Pediococcus pentosaceus* и стафилококков *Staphylococcus xylosus* при производстве ферментированной колбасы. Небелковый азот увеличивался в процессе созревания в результате протеолитической активности штаммов [15].

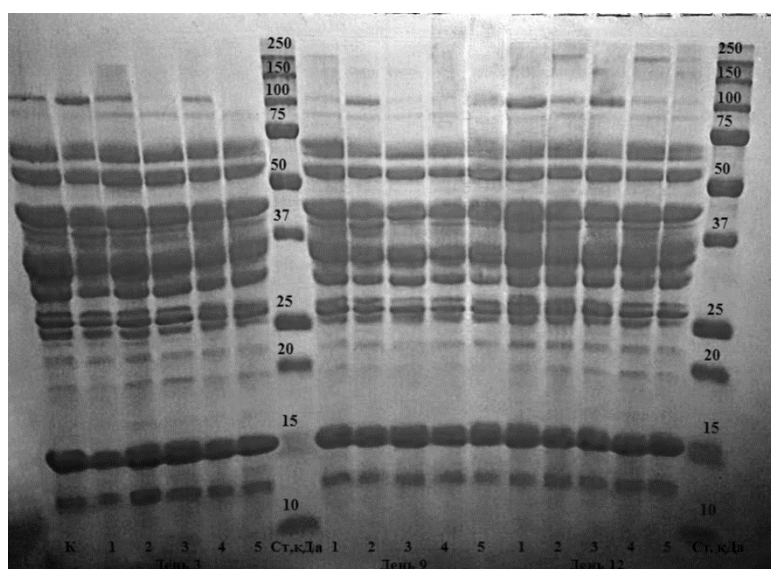


Рис. 1. 1ДЭ-электрофореграмма образцов мышечной ткани КРС, ферментированной бактериями рода *Pediococcus*. Ст, кДа – стандартный белковый маркер, К – контроль, 1 – *P. acidilactici* 25, 2 – *P. acidilactici* 8, 3 – *P. pentosaceus* 39, 4 – *P. pentosaceus* 31, 5 – *P. acidilactici* 38

молекулярной массой менее 20 кДа. Наибольшей протеолитической активностью отличился штамм *L. sakei* 103. Действие *Pediococcus* spp. оказалось более мягким по сравнению с действием *Lactobacillus* spp. – в разной мере подвергаются деструкции белки в узком диапазоне молекулярных масс – 75–250 кДа. Белки с меньшей молекулярной массой практически не изменяются, а белковые фрагменты локализуются практически по всей электрофоретической картине, о чем свидетельствует увеличение интенсивности окраски белковых полос. Наиболее эффективными в отношении протеолиза оказались штаммы *Pediococcus pentosaceus* 39 и *Pediococcus acidilactici* 25. Бактерии рода *Staphylococcus* spp. преимущественно оказывают воздействие на белки, находящиеся в диапазоне молекулярных масс 10–50 кДа. В литературных данных отмечается их существенное воздействие на такие мажорные белки как миозин, актин и тропомиозин. Представленные данные показывают, что молочнокислые бактерии и денитрифицирующие стафилококки влияют на протеомную картину ферментированных мясных субстратов, обладая как видоспецифической, так и штаммоспецифической протеолитической активностью. Образование биоактивных пептидов зависит от ферментативной активности микроорганизмов, а факторы, влияющие на их продукцию, специфичны для каждого штамма.

На основании приведенных результатов электрофоретических исследований были выбраны штаммы, оказывающие наиболее существенное воздействие на мышечные белки, и на их основе была составлена бактериальная композиция. Результаты исследования белкового профиля мышцы *longissimus dorsi* КРС, ферментированной композицией стартовых культур (рис. 2), показали, что совместное действие бактерий родов *Lactobacillus*, *Pediococcus* и *Staphylococcus* способствует более полному гидролизу мышечных белков. Так, значительному гидролизу подверглись белки в диапазоне молекулярных масс 150–300 кДа. Белковые полосы в этом диапазоне практически отсутствуют во всех опытных образцах. Фрагменты в области α -актинина подвергаются постепенной деструкции на протяжении всего эксперимента. Аналогичная ситуация наблюдается и в областях молекулярных масс, соответствующих расположению пироваткиназы (58 кДа), десмину (53–55 кДа), α -актину, тропонинам Т быстрого и медленного типов (32–37 кДа), миоглобину (18 кДа) и гемоглобину (15 кДа).

В работе Sánchez-Rivera et al., 2014, было установлено, что комбинация стартовых культур *Lactobacillus curvatus* CRL705 и *Staphylococcus vitulinus* GV318 значительно усиливает протеолиз по сравнению с отдельным использованием каждого штамма: с помощью двумерного гель-электрофореза был установлен гидролиз актина, легкой цепи миозина 1/3, легкой цепи миозина 2 и тяжелой цепи миозина, а с помощью LC-MS/MS идентифицировали в общей сложности 33 пептида, возникающих из тропонина Т, легкой цепи миозина 2 и актина [16]. Инокуляция мясной системы *S. xylosus* и *L. plantarum* приводила к уменьшению концентрации пептидов с молекулярными массами выше 3 кДа и увеличением количества пептидов с молекулярными массами ниже 3 кДа [17].

Сравнивая действие штаммов трех видов на белковый профиль мышечной ткани, можно отметить следующие сходства: и *Lactobacillus* spp., и *Pediococcus* spp., и *Staphylococcus* spp., в первую очередь, оказывают значительное воздействие на такие белки, как тяжелые цепи миозина, миозин, актин и тропомиозин Т1. Существенное сходство для всех трех культур – видовая специфичность, т. е. каждый вид гидролизует белки в разной мере, либо вообще не гидролизует. Говоря о различиях, следует отметить наиболее явное воздействие на белки мышечной ткани *Lactobacillus* spp. Их действие распространяется практически на все мажорные белки и носит деструктивный характер. В образцах с культурами *Lactobacillus* spp. отмечается существенное накопление белковых фрагментов с

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

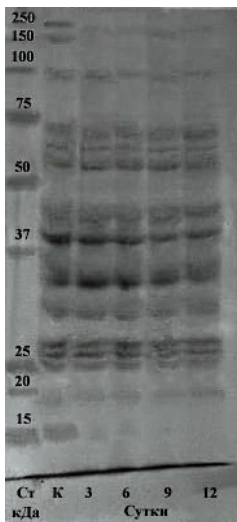


Рис. 2. 1ДЭ-электрофореграмма образцов мышечной ткани КРС, ферментированной бактериальной композицией. Ст, кДа – стандартный белковый маркер; К – контрольный образец (0 день, фон); 3, 6, 9, 12 – экспериментальные сутки

Стартовые культуры рода *Pediorococcus* вызывают наиболее явные протеомные изменения в диапазоне молекулярных масс 75–250 кДа – наблюдается увеличение количества белковых фрагментов в области расположения таких белков как тяжелые цепи миозина, миоген, α -актинин. Белки с меньшей молекулярной массой подвергаются незначительной деструкции. Наиболее интенсивно белковый субстрат меняют штаммы *Pediorococcus pentosaceus* 39 и *Pediorococcus acidilactici* 25. Бактерии рода *Lactobacillus*, напротив, вызывают стабильную деструкцию белков мышечной ткани КРС с накоплением белковых фрагментов с молекулярной массой ниже 20 кДа, что может обуславливаться наличием у *Lactobacillus* более активной протеолитической системы, чем у рода *Pediorococcus*. Наиболее эффективным деструктором по результатам проведенного исследования выступает штамм *Lactobacillus sakei* 103. Бактерии рода *Staphylococcus* также оказывают заметное воздействие на белковый профиль мышцы *longissimus dorsi* КРС, в разной мере подвергая гидролизу и саркоплазматические, и миофибриллярные белки. Значительное влияние данный род бактерий оказывает на миозин, актин и тропонины.

На основании наиболее эффективных в отношении протеолиза штаммов была сформирована бактериальная композиция, которую также использовали для ферментации мышечной ткани *longissimus dorsi* КРС. Анализ протеома показал усиливающий эффект от совместного применения бактерий рода *Pediorococcus*, *Lactobacillus* и *Staphylococcus* – наиболее полно происходила деструкция всех мышечных белков, что, в свою очередь, будет способствовать улучшению органолептических и функциональных свойств мясных продуктов, в т.ч. образованию биопептидов.

Показано, что молочнокислые бактерии и денитрифицирующие стафилококки стартовых культур влияют на протеомную картину ферментированных субстратов, обладая как видоспецифической, так и штаммоспецифической протеолитической активностью. Для выбора стартовых культур, потенциально способных образовывать биологически активные пептиды в мясной системе, необходимо осуществить следующие этапы: подтвердить идентификацию штамма биохимическими и молекулярно-генетическими методами; определить протеолитическую активность стартовых культур; определить наличие генов семейства Prt, ответственных за протеолитическую активность штаммов; провести ферментацию мясного сырья; провести протеомные исследования ферментированного мясного сырья; провести анализ результатов и отбор перспективных стартовых культур.

The study was financed by the grant of the Russian Scientific Foundation (Project No.16–16–10073П)

ЛИТЕРАТУРА

1. D.A. Afanas'ev, N.G. Mashentseva, I.M. Chernukha, *Food Industry*. 4, 20–22 (2019).
2. M. Chernukha, N.G. Mashentseva, D.A. Afanas'ev, *Meat Technologies*. 2, 42–46 (2020).
3. M.G. Venegas-Ortega et al. Nev'arez-Moorill'on, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 18, 1039–1051 (2019).
4. S. Fadda, et al., *Applied and Environmental Microbiology*. 65(8), 3540–3546 (1999).
5. S. Fadda, et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(2), 578–584 (1999).
6. A.L. Basso, et al. *Journal of Food Biochemistry*. 28, 195–212 (2004).
7. G. Mauriello, A. Casaburi, F. Villani, *J Appl Microbiol*. 92(3), 482–490 (2002).
8. U. Dalmiş, A. Soyer, *Meat Sci*. 80(2), 345–354 (2008).
9. M. Chernukha, et al. IOP Conf. Ser.: *Earth Environ. Sci*. 333, 012049 (2019).
10. S. Abbasi, et al. *BMC Microbiol*. 17(1), 121 (2017).
11. M. Montemurro, G. Celano, M. De Angelis, M. Gobbetti, C.G. Rizzello, E. Pontonio, *Food Microbiol*. 90, 103491 (2020).
12. X. Nie, S. Lin, Q. Zhang, *Food Chem*. 145, 840–844 (2014).
13. M.A. de Almeida, et al. *Food Res Int*. 109, 368–379 (2018).
14. M.J. Benito, A. Martín, E. Aranda, F. Pérez-Nevado, S. Ruiz-Moyano, M.G. Córdoba, *J Food Sci*. 72(6), M193–201 (2007).
15. G. Johansson, J.L. Berdagüé, M. Larsson, N. Tran, E. Borch, *Meat Sci*. 38(2), 203–18 (1994).
16. Sánchez-Rivera, Martínez-Maqueda D., Cruz-Huerta E., Miralles B., Recio I. *Food Res. Int*. 63, 170–181 (2014).
17. L. Mejri, R. Vásquez-Villanueva, M. Hassouna, M.L. Marina, M.C. García, *Food Res Int*. 100(1), 708–716 (2017).