



Пловдивски университет
„Паисий Хилендарски”



Биологически факултет
Катедра „Биохимия и Микробиология“

ТЕОДОРА МИНЧЕВА ПАНАЙОТОВА

**ИЗСЛЕДВАНЕ СВОЙСТВАТА НА БИОЛОГИЧНО-
АКТИВНИ ПЕПТИДИ, ПОЛУЧЕНИ ПРИ ЕНЗИМЕН
ХИДРОЛИЗ С ПРОТЕОЛИТИЧНИ ЕНЗИМИ ОТ
МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен „доктор“
Област на ВО: **4. Природни науки, математика и информатика**
Професионално направление: **4.3. Биологически науки;**
Докторска програма: **Биохимия**

Научен ръководител:
проф. д-р Илия Николов Илиев

Пловдив, 2026

Дисертационният труд съдържа 182 страници, 9 таблици, 52 фигури, 2 приложения и 324 литературни източника.

Експерименталните изследвания са проведени в катедра „Биохимия и микробиология“ към Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, в лабораториите на Център по технологии към ПУ „Паисий Хилендарски“ и лабораториите на център НИРД „Ел Би Булгарикум“ ЕАД, София.

Докторантът има публикувани общо 3 статии по тематиката на дисертационния труд, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus).

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на катедра „Биохимия и микробиология“ при Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски“, проведен на 10.03.2026 г.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 09.06.2026г. от 11:00 часа в зала „Компас“ на ПУ „П. Хилендарски“.

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуващите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Автор: Теодора Минчева Панайотова

Заглавие: Изследване свойствата на биологично-активни пептиди, получени при ензимен хидролиз с протеолитични ензими от млечнокисели бактерии

Научно жури:

проф. дбн Искра Витанова Иванова
проф. дбн Мария Богомилова Дянкова
проф. д-р Пенка Ангелова Мончева
проф. д-р Велизар Костадинов Гочев
доц. д-р Тонка Атанасова Василева

Резервни членове:

доц. д-р Елена Димитрова Апостолова-Кузова
доц. д-р Николай Манчев Петров

ВЪВЕДЕНИЕ

В модерния свят на забързаното ежедневие храната се приема за източник на диетични вещества и биологично активни съединения, които подобряват човешкото здраве и общото състояние на организма. Нарастващата осведоменост на потребителите за влиянието на начина на хранене върху здравето се отразява в техния избор на естествени продукти, богати на витамини, минерали и други биоактивни съединения включително биоактивните пептиди (Zaky A.A. et al. 2019; Zaky A.A. et al. 2020). Биоактивните пептиди са протеинови фрагменти, които оказват влияние върху цялостното здраве на човека. Повечето биоактивни пептиди се състоят от два (дипептиди) до 20 аминокиселинни остатъка и имат молекулна маса от 0,4–2 kDa (Korhonen H. and Pihlanto A., 2006). В редки случаи се съобщава и за по-дълги пептиди. Биоактивните пептиди, генерирани от храни богати на протеини, притежават отличен потенциал за създаване на функционални храни и/или хранителни добавки за предотвратяване или лечение на някои хронични заболявания като сърдечно-съдови заболявания, диабет, рак (Chakrabarti S. et al., 2014). Те се считат за ново поколение биологично активни регулатори на хомеостазата, които имат значителни биологични ефекти и оказват положително въздействие върху функцията или състоянието на човешкия организъм.

През последните години се разработват нови храни и напитки на базата на растителни протеини и се предлагат на пазара, за да задоволят нарастващото търсене на алтернативи на продукти от животински произход. Млякото и млечните продукти се разглеждат отдавна като клас храни с балансиран състав от основно значение за храненето на човека.

Въпреки това, хората, страдащи от здравословни проблеми като напр. непоносимост към лактоза и алергия към млечните протеини, трябва да консумират алтернативни продукти. За повишаване на здравословните ползи на храни на растителна основа се разработват нови ферментирани продукти с участието на растителни протеини и млечнокисели бактерии.

Разграждането на протеините от млечнокиселите бактерии има важна роля за образуването на биоактивни пептиди и аминокиселини за бактериалния растеж и за образуването на метаболити, допринасящи за вкуса и аромата на ферментиралите продукти. Едни от най-изучаваните биоактивни пептиди са ACE-инхибиращите пептиди, които имат способността да инхибират активността на ангиотензин конвертиращия ензим (ACE) и се явяват алтернативен начин на синтетичните лекарства за понижаване на кръвното налягане.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се изследва получаването на биологично-активни пептиди с АСЕ-инхибираща активност при култивиране на млечнокисели бактерии в хранителни среди с растителни протеини.

За постигане на поставената цел е необходимо да се решат следните задачи:

1. Провеждане на скрининг на щамове лактобацили, хидролизиращи растителни протеини при провеждане на ферментационен процес.
2. Да се оптимизират условията за секреция на протеолитични ензими от селектираните щамове лактобацили в присъствие на различни растителни протеини.
3. Да се изследва секрецията на аминокептидазни ензими от селектираните щамове лактобацили в присъствие на различни растителни протеини.
4. Да се оптимизират условията на протеолиза на растителни протеини за получаване на биологично-активни пептиди с АСЕ-инхибираща активност от селектираните щамове лактобацили в присъствие на различни растителни протеини.
5. Да се охарактеризират образуваните биологично-активни пептиди с АСЕ-инхибираща активност.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1 Използвани щамове лактобацили

В реализирането на всички опити са използвани 50 щама лактобацили от четири вида - *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus casei* и *Lactiplantibacillus plantarum*, предоставени от колекцията на „Ел Би Булгарикум“ ЕАД, София, България.

1.2 Хранителни среди

1.2.1 Хранителни среди с млечни протеини

1.2.2 Хранителни среди с растителни протеини

1.2.3 Хранителни среди с млечни и растителни протеини

1.2.4 Други

2. Методи

2.1 Условия на култивиране за лактобацилите

При изследване на протеолитичната активност по метода на Чърч, първоначално щамовете *L. delbr. ssp. bulgaricus* и *L. helveticus* бяха култивирани в продължение на 16 часа при 37°C и 42°C в стерилно 10 %-но възстановено сухо обезмаслено мляко. Щамовете *L. casei* и *L. plantarum* бяха изследвани след 16- и 24 – часово култивиране при 32°C и 37°C в хранителни среди от стерилно 10 % - но възстановено сухо обезмаслено мляко и стерилно 10 % възстановено сухо обезмаслено мляко в присъствие на 0,5 % дрождев екстракт. След този скрининг селектираните щамове *Lactobacillus* бяха култивирани в продължение на 16 часа при 37°C в съответните хранителни среди.

При определяне на всички останали методи хранителните среди бяха инокулирани с 1% от избраните щамове лактобацили и култивирани в продължение на 16 часа при 37°C.

2.2 Определяне на степента на протеолиза по метода на Чърч

Анализът се базира на реакцията на *o*-фталдехид (OPA) и β-меркаптоетанол с първични амини, като се образуват 1-тиоалкил-2-алкилизоиндоли, които абсорбират силно при 340 nm. Беше построена стандартна крива с използване на L-метионин като стандарт и резултатите бяха представени като mmol/L еквиваленти на метионин. Стойностите за неинокулираните среди бяха извадени, за да се получат крайните резултати.

2.3 Определяне на протеолитична активност по метода на Folin–Ciocalteu

При определяне на протеолитичната активност по метода на Folin–Ciocalteu избраните щамове *L. delbr. ssp. bulgaricus*, *L. helveticus* и *L. casei* бяха култивирани в среда съдържаща 10% сухо обезмаслено мляко, хранителна среда mMRS, хранителна среда mMRS с 1% грахов протеинов хидролизат, хранителна среда mMRS с 1% соев протеинов хидролизат и хранителна среда mMRS с 1% суроватъчен протеин WP80. Като субстрат беше използван казеин. Способността на ензима протеаза да хидролизира казеин освобождава аминокиселината тирозин, която може да се определи количествено чрез колориметрична реакция с реагент на Фолин. Беше построена стандартна крива с използване на L-Tyrosine като стандарт.

2.4. Количествено определяне на белтък по метода на Брадфорд

Този анализ представлява колометричен метод, при който багрилото Coomassie Brilliant Blue G-250 се свързва с протеини, което води до изместване на максимума на абсорбция на багрилото от 465 nm на 595 nm. За определяне съдържанието на белтък в пробите бяха използвани дезинтегрирани клетки получени по аналогичен начин с този за определяне на протеолитичната активност по метода на Folin–Ciocalteu.

2.5 Определяне на аминокептидазна активност по методите на Sasaki M. *et al.* и Eleman T.C.

За целта на изследването бяха използвани четири синтетични субстрата: L-leucine-p-nitroanilide (L-leu-pNA), L-lysine-p-nitroanilide (L-lys-pNA), L-arginine- β -naphthylamide (L-arg- β NA) и L-proline- β -naphthylamide (L-pro- β NA).

2.6 Определяне на АСЕ-инхибиторна активност по методите на Cushman, Cheung и Nakamura

Анализът се основава на способността на дадено вещество да блокира активността на ангиотензин-конвертиращия ензим (АСЕ), участващ в регулирането на кръвното налягане. Този метод включва инкубиране на АСЕ със субстрат хипурил-L-хистидил-левцин (ННЛ), след което се измерва спектрофотометрично количеството на образувания продукт - хипурова киселина.

2.7 Електрофоретичен анализ с трис-трицинова SDS-полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE) по метода на Schägger H. и Von Jagow G.

Методът се основава на принципа за разделяне на протеини и пептиди в диапазона от 1 до 100 kDa. Трицинът позволява разделяне на малки протеини и пептиди под 30 kDa при по-ниски концентрации на акриламид.

2.8 Анализ на нискомолекулни пептиди по метода на ултрависокоэффективна течна хроматография с масспектрометрия (UHPLC-MS)

Ултрависокоэффективната течна хроматография с масспектрометрия (UHPLC-MS) е метод за идентифициране, секвениране и характеризиране на нискомолекулни пептиди, при който се използват по-малки размери на частиците в колоната (обикновено по-малко от 2 μ m) и по-високо работно налягане, за да се постигнат по-бързи времена за анализ, по-добра разделителна способност и повишена чувствителност.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Скрининг на щамове млечнокисели бактерии секретирани протеолитични ензими

1.1. Сравняване на степента на протеолиза при култивиране на лактобацили от различни видове

Степента на протеолиза на четирите вида лактобацили – *Lactobacillus delbr. ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactocaseibacillus casei* и *Lactiplantibacillus plantarum* беше изследвана в среда съдържаща 10% сухо обезмаслено мляко (СОМ). Методът с използване на ОРА - реагент позволява количественото определяне на освободените в хода на протеолизата аминокиселини като от стойностите в края на ферментацията се извади фона в използваната среда (празна проба). Като количествен стандарт се използва L-метионин като получените резултати се представят като mmol метионинов еквивалент на литър (mmol/L). От резултатите на таблица 1 се вижда установената щамова специфичност на способността да се протеолизират млечните протеини в използваната хранителна среда. Щамове *L. delbr. ssp. bulgaricus* показаха голям диапазон на количествените стойности на натрупаните продукти на протеолиза при култивиране 37°C и 42°C (Табл. 1). При температура 37°C най-голямо количество на образуваните продукти на протеолиза беше отчетено при щамове *L. bulgaricus* b283 и *L. bulgaricus* b81/1 (7,9 mmol/L), следвани от *L. bulgaricus* b57/4 (7,7 mmol/L), *L. bulgaricus* b68/13 (7,6 mmol/L) и *L. bulgaricus* b77 (7,6 mmol/L). При култивиране на температура 42°C се наблюдаваха по-високи стойности по отношение на количеството натрупани продукти на протеолиза в сравнение с процеса при 37°C. Щам *L. bulgaricus* J24 показва 9,4 mmol/L получено количество метионин.

За почти една трета от тестваните щамове *L. delbr. ssp. bulgaricus* протеолизата беше под 5,0 mmol/L и при двете температури, като стойностите бяха сравнително близки. Ниска степен на протеолиза беше наблюдавана при 42°C отново при щамове *L. bulgaricus* b123 и *L. bulgaricus* b263 - 1,9 mmol/L и 2,3 mmol/L, съответно. Получените резултати показват, че различните щамове *L. bulgaricus* притежават протеолиза варираща в широк диапазон, което позволява подбора на щамове с различни способности в зависимост от желаните свойства на крайния продукт, в който те участват в качеството си на закваска или други ферментационни продукти.

При изследване на степента на протеолиза на щамове *Lactobacillus helveticus* се установи натрупано количество продукти на протеолиза в границите от 5,9 mmol/L до 10,5 mmol/L при 37°C и от 6,1 mmol/L до 9 mmol/L при 42°C (Табл. 2). Получените резултати при изследваните щамове показаха сравнително близки стойности и при двете температури, т.е. както и при щамове *Lactobacillus delbr. ssp. bulgaricus*, така и при щамове *L. helveticus* протеолизата беше сравнително еднаква при различните температури.

Таблица 1. Резултати от степента на протеолиза на щамове *Lactobacillus delbr. ssp. bulgaricus* култивирани на хранителна среда 10% сухо обезмаслено мляко (COM) на 16-ия час от култивирането

Щам	37°C	42°C
<i>L. bulgaricus</i> b3/1	5,2 ± 0,1	6,8 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b8/2	6,4 ± 0,2	7,1 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> 4/13	5,3 ± 0,1	7,8 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b5	4,2 ± 0,1	6,0 ± 0,1
<i>L. bulgaricus</i> b26	3,6 ± 0,1	4,7 ± 0,1
<i>L. bulgaricus</i> b27	7,1 ± 0,2	7,8 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b28	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,1
<i>L. bulgaricus</i> b37	4,6 ± 0,1	5,3 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b41	4,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1
<i>L. bulgaricus</i> b54/7	5,8 ± 0,2	4,2 ± 0,1
<i>L. bulgaricus</i> b55/6	5,8 ± 0,2	7,8 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b56/7	6,7 ± 0,2	7,6 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b57/4	7,7 ± 0,2	8,8 ± 0,3
<i>L. bulgaricus</i> b58/1	6,0 ± 0,2	7,3 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b65/4	5,9 ± 0,1	7,0 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b67/2	6,0 ± 0,2	7,4 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b67/5	6,0 ± 0,2	8,5 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b68/13	7,6 ± 0,2	8,5 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b69/2	6,4 ± 0,2	8,5 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b69/4	6,2 ± 0,2	7,7 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b77	7,6 ± 0,2	7,8 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b120	4,0 ± 0,1	4,2 ± 0,1
<i>L. bulgaricus</i> b123	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1
<i>L. bulgaricus</i> b144	3,7 ± 0,1	5,0 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b263	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1
<i>L. bulgaricus</i> b283	7,9 ± 0,2	6,0 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> bЦ3/2	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1
<i>L. bulgaricus</i> b2380/8	4,0 ± 0,1	5,6 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> b81/1	7,9 ± 0,2	7,6 ± 0,2
<i>L. bulgaricus</i> J24	5,0 ± 0,2	9,4 ± 0,3

*mmol метионинов еквивалент на 1 литър (mmol/L) със стандартно отклонение от три паралелни измервания;

*От измерените стойности е извадена стойността в неинокулираната среда (празна проба) – 5 mmol/L.

Таблица 2. Резултати от степента на протеолиза на щамове *Lactobacillus helveticus* култивирани на хранителна среда 10% сухо обезмаслено мляко (COM) на 16-ия час от ферментацията

Щам	37°C	42°C
<i>L. helveticus</i> AB	6,9 ± 0,1	7,0 ± 0,1
<i>L. helveticus</i> 1/1	7,0 ± 0,2	8,6 ± 0,2
<i>L. helveticus</i> 7/6	7,6 ± 0,2	7,2 ± 0,1
<i>L. helveticus</i> 7/8	7,9 ± 0,2	7,3 ± 0,1
<i>L. helveticus</i> h9	7,3 ± 0,1	7,0 ± 0,1
<i>L. helveticus</i> h25	8,5 ± 0,2	7,2 ± 0,1
<i>L. helveticus</i> h48	9,0 ± 0,2	9,0 ± 0,2
<i>L. helveticus</i> h70	8,4 ± 0,2	7,6 ± 0,2
<i>L. helveticus</i> Q40	5,9 ± 0,1	6,1 ± 0,1
<i>L. helveticus</i> b230	10,5 ± 0,3	7,5 ± 0,1
<i>L. helveticus</i> b244	8,0 ± 0,2	6,4 ± 0,1

*mmol метионинов еквивалент на 1 литър (mmol/L) със стандартно отклонение от три паралелни измервания;

* От измерените стойности е извадена стойността в неинокулираната среда (празна проба) – 5 mmol/L.

При изследване степента на протеолиза на щамовете *Lactocaseibacillus casei* инкубирани в 10% сухо обезмаслено мляко (COM), температурата на култивиране беше 32°C и 37°C в продължение на 16 и 24 часа. Протеолиза не беше установена след 16 часа ферментационен процес и при двата температурни режима. След 24 часа култивиране в средата бяха измерени минимални количества на продукти на протеолиза в диапазона 0,4 - 1,7 mmol/L без разлика при 32°C и 37°C (Табл. 3).

При щамовете от вид *Lactiplantibacillus plantarum*, протеолиза не се установи за нито един от тестваните щамове дори след 24 часа инкубация в млечна среда. Това показва, че представителите на вида не могат да разграждат млечните протеини, поради което, развитието им в млечна среда е ограничено.

Таблица 3. Резултати от степента на протеолиза на щамове *Lactocaseibacillus casei* на хранителна среда 10% сухо обезмаслено мляко (COM) на 24-ия час от култивирането

Щам	32°C	37°C
<i>L. casei</i> c 1	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1
<i>L. casei</i> c 3	0,5 ± 0,05	0,5 ± 0,05
<i>L. casei</i> c 6	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,05
<i>L. casei</i> c 31	0,7 ± 0,05	0,5 ± 0,05

*mmol метионинов еквивалент на 1 литър (mmol/L) със стандартно отклонение от три паралелни измервания;

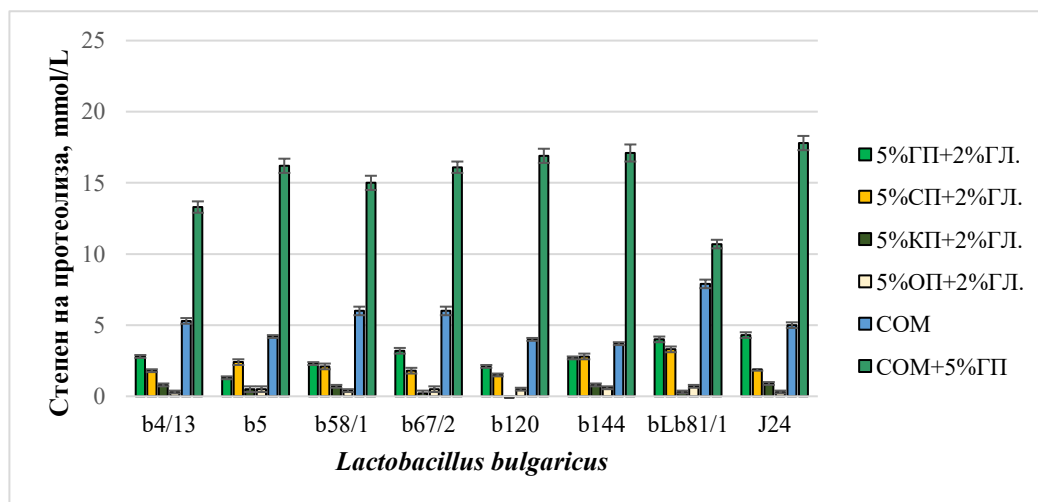
*От измерените стойности е извадена стойността в неинокулираната среда (празна проба) – 5 mmol/L.

1.2 Изследване степента на протеолиза на щамове лактобацили култивирани в присъствие на растителни протеини

1.2.1. Култивиране на щамове *Lactobacillus delbr. ssp. bulgaricus* на среди с растителни протеини

Въз основа на получените резултати за степента на протеолиза върху среда 10% сухо обезмаслено мляко (COM) бяха избрани 8 щамове *Lactobacillus delbr. ssp. bulgaricus*, 5 щамове *Lactobacillus helveticus* и 3 щамове *Lacticaseibacillus casei*, които се използват при култивиране на хранителна среда с растителни протеини. Първоначалния скрининг проведохме при използване на четири вида растителни протеини – грахов, соев, конопен и оризов протеин.

Степента на протеолиза на щамове култивирани в растителните среди беше сравнена с тази в среда с 10 % сухо обезмаслено мляко (COM), както и в комбинирана хранителна среда съдържаща 10% COM и 5% грахов протеин. Количеството образувани продукти на протеолиза в растителните среди съдържащи грахов и соев протеин бяха относително близки и варираха от 1,3 mmol/L до 4,3 mmol/L и 1,5 mmol/L до 3,3 mmol/L, съответно. Най-висока степен на протеолиза се установи на растителната хранителна среда съдържаща грахов протеин при култивиране на щам *L. bulgaricus* J24 – 4,3 mmol/L получено количество метионин (фиг.1). При използване на соев протеин най-голямо количество на образувани продукти на протеолиза беше отчетено при щам *L. bulgaricus* bLb81/1 – 3,3 mmol/L. При култивиране на щамове *L. bulgaricus* в растителните среди съдържащи конопен и оризов протеин не се установиха достатъчно количество образувани продукти на протеолиза.



Фигура 1. Степен на протеолиза на щамове *Lactobacillus delbr. ssp. bulgaricus* в различни видове растителни среди

*COM – 10 % сухо обезмаслено мляко; COM + 5% ГП - 10 % сухо обезмаслено мляко+ грахов протеин; 5% ГП+2% ГЛ - грахов протеин + глюкоза; 5% СП+2% ГЛ – соев протеин + глюкоза; 5% КП+2% ГЛ – конопен протеин + глюкоза; 5% ОП+2% ГЛ – оризов протеин + глюкоза;

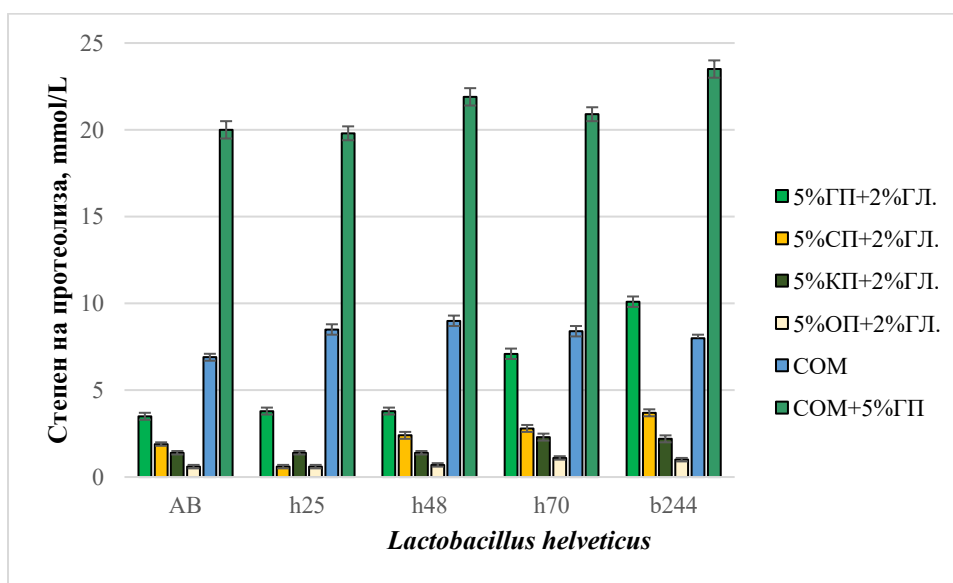
*mmol метионинов еквивалент на 1 литър (mmol/L) със стандартно отклонение от три паралелни измервания;

* От измерените стойности е извадена стойността в неинокулираната среда (празна проба) – 5 mmol/L.

1.2.2 Култивиране на щамове *Lactobacillus helveticus* на хранителни среди с растителни протеини

Щамовете *L. helveticus* показаха подобна тенденция, както щамовете *L. delbr. ssp. bulgaricus* с добре изразена щамова специфичност на протеолиза (фиг. 2). Количеството образувани продукти на протеолиза в растителната хранителна среда с грахов протеин бяха в диапазона от 3,5 mmol/L до 10,1 mmol/L. Най-висока степен на протеолиза се установи на растителната хранителна среда съдържаща грахов протеин при култивиране на щам *L. helveticus* b244 – 10,1 mmol/L отчетено количество метионин. При използване на соев протеин най-голямо количество на образувани продукти на протеолиза отново беше отчетено при щам *L. helveticus* b244 – 3,7 mmol/L. При култивиране на щамовете *L. helveticus* в растителните среди съдържащи конопен и оризов протеин се установи по-малко количество образувани продукти на протеолиза в сравнение с останалите хранителни среди, като стойностите бяха в диапазона от 1,4 mmol/L до 2,3 mmol/L и от 0,6 mmol/L до 1,1 mmol/L, съответно.

Най-висока степен на протеолиза сред всички тествани среди беше установена за щамовете *L. helveticus* култивирани на комбинирана хранителна среда от 10 % сухо обезмаслено мляко (СОМ) и 5 % грахов протеин (фиг. 2). Най-висока степен на протеолиза се установи при щам *L. helveticus* b244 – 23,5 mmol/L получено количество метионин. Останалите щамове имаха сравнително близка протеолиза, чиито стойности получено количество метионин бяха от 19,8 mmol/L до 21,9 mmol/L.



Фигура 2. Степен на протеолиза на щамове *L. helveticus* в различни видове среди

*СОМ – 10 % сухо обезмаслено мляко; СОМ + 5% ГП - 10 % сухо обезмаслено мляко+ грахов протеин;
5% ГП+2% ГЛ - грахов протеин + глюкоза; 5% СП+2% ГЛ – соев протеин + глюкоза; 5% КП+2% ГЛ –
конопен протеин + глюкоза; 5% ОП+2% ГЛ – оризов протеин + глюкоза

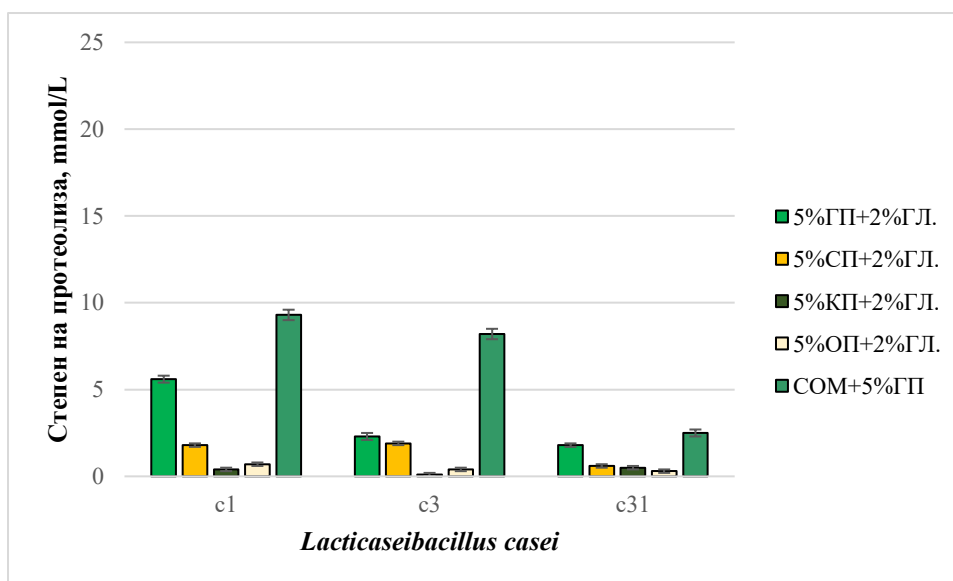
*mmol метионинов еквивалент на 1 литър (mmol/L) със стандартно отклонение от три паралелни измервания;

* От измерените стойности е извадена стойността в неинкулираната среда (празна проба) – 5 mmol/L.

1.2.3 Култивиране на щамове *Lacticaseibacillus casei* на хранителни среди с растителни протеини

Степента на протеолиза на три щама *L. casei* беше изследвана в растителни хранителни среди. Количеството образувани продукти на протеолиза в растителната хранителна среда с грахов протеин бяха в диапазона от 1,8 mmol/L до 5,6 mmol/L. Най-висока степен на протеолиза се установи на растителната хранителна среда съдържаща грахов протеин при култивиране на щам *L. casei* c1 – 5,6 mmol/L получено количество метионин. Освен това щам *L. casei* c1 показва по-висока степен на протеолиза в сравнение с три от изследваните щамове *L. helveticus* и всички щамове *L. bulgaricus* култивирани в растителната хранителна среда с грахов протеин. При култивиране на щамовете *L. casei* в растителните среди съдържащи соев, конопен и оризов протеин се установи по-малко количество образувани продукти на протеолиза в сравнение с останалите хранителни среди, като стойностите бяха в диапазона от 0,6 mmol/L до 1,9 mmol/L, от 0,1 mmol/L до 0,5 mmol/L и от 0,3 mmol/L до 0,7 mmol/L, съответно.

Най-висока степен на протеолиза сред всички изследвани среди беше установена за щамовете *L. casei* култивирани на комбинирана хранителна среда от 10 % сухо обезмаслено мляко (СОМ) и 5 % грахов протеин (фиг. 3). Най-висока степен на протеолиза се установи при щам *L. casei* c1 – 9,3 mmol/L получено количество метионин.



Фигура 3. Степен на протеолиза на щамове *L. casei* в различни видове среди

*СОМ – 10 % сухо обезмаслено мляко; СОМ + 5% ГП - 10 % сухо обезмаслено мляко+ грахов протеин; 5% ГП+2% ГЛ - грахов протеин + глюкоза; 5% СП+2% ГЛ – соев протеин + глюкоза; 5% КП+2% ГЛ – конопен протеин + глюкоза; 5% ОП+2% ГЛ – оризов протеин + глюкоза.

(Не се установяват продукти на протеолиза в СОМ, резултатите не са представени на фигурата).

*mmol метионинов еквивалент на 1 литър (mmol/L) със стандартно отклонение от три паралелни измервания;

* От измерените стойности е извадена стойността в неинокулираната среда (празна проба) – 5 mmol/L.

1.3 Заключение

Най-висока степен на протеолиза от изследваните растителни хранителни среди се установи в хранителните среди съдържащи грахов и соев протеин. Резултатите от проведените експерименти показаха, че конопеният и оризовият протеин са най-малко подходящи субстрати. Комбинирането на млечен и грахов протеин активира протеолизата в сравнение с останалите хранителни среди, което представлява интерес по отношение на прилагането на комбинирана растително-млечна хранителна среда. Щамовете *L. helveticus* метаболизират най-интензивно растителните хранителни среди. След проведеното изследване се установи, че с най-висока степен на протеолиз в растителни хранителни среди са щамовете *L. helveticus* AB, *L. helveticus* h25, *L. helveticus* h48, *L. helveticus* h70, *L. helveticus* b 244 и *L. casei* c1.

2. Изследване на специфична протеолитична активност при щамове лактобацили култивирани на хранителни среди в присъствие на растителни протеини

2.1 Сравнителен анализ на специфичната протеолитична активност при култивиране на среди с растителни протеини

Специфичната протеолитична активност беше определена в предварително дезинтегрирани клетки на селектираните щамове *L. helveticus* AB, *L. helveticus* h25, *L. helveticus* h48, *L. helveticus* h70, *L. helveticus* b 244 и *L. casei* c1 култивирани в 10% сухо обезмаслено мляко (COM), хранителна среда MRS, в чийто състав не присъстваха компонентите пептон и месен екстракт (mMRS), хранителна среда mMRS в присъствие на 1% грахов протеинов хидролизат, mMRS в присъствие на 1% соев протеинов хидролизат и mMRS в присъствие на 1% суроватъчен протеин (WP 80).

Щам *L. helveticus* h70 показва най-висока специфична протеолитична активност в среда с 10% сухо обезмаслено мляко (COM) - 64,96 U/mg протеин, следвана от щам *L. helveticus* b244 – 35,81 U/mg протеин и щам *L. helveticus* h25 – 13,63 U/mg протеин. Установи се, че изследваните щамове *L. helveticus* имаха сравними или по-високи стойности на специфична протеолитична активност при използване на различни протеинови субстрати.

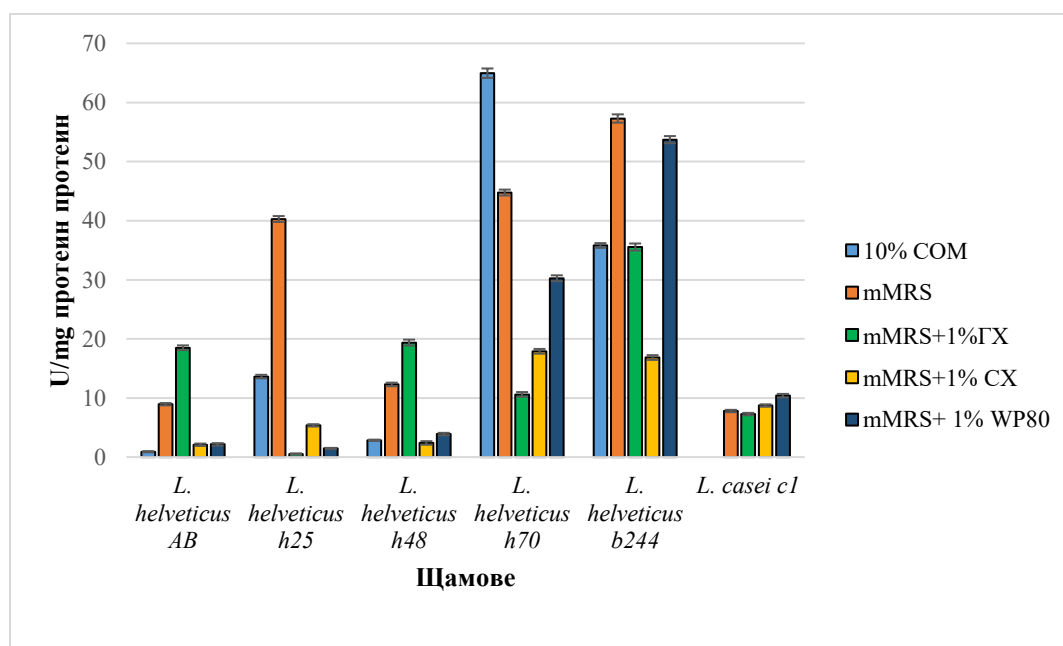
Най-висока специфична протеолитична активност в хранителна среда mMRS се установи за щам *L. helveticus* b244 – 57,29 U/mg протеин. Близки стойности на специфична протеолитична активност бяха измерени и при щамовете *L. helveticus* h70 (44,76 U/mg протеин) и *L. helveticus* h25 (40,29 U/mg протеин) (фиг. 4).

За определянето на специфичната протеолитична активност на селектираните щамове лактобацили беше изследвано и влиянието на 1% суроватъчен протеин (WP 80) добавен към хранителна среда mMRS. Добавянето на суроватъчния протеин към хранителната среда mMRS активира протеолитичната система при щам *L. helveticus* b244 като протеазната активност е сравнима с тази при използване на 10 % сухо обезмаслено мляко и хранителна среда mMRS. За щамовете *L. helveticus* b244 и *L. helveticus* h70 се

установи най-висока специфична протеолитична активност, чиито стойности бяха 53,71 U/mg протеин и 30,26 U/mg протеин (фиг. 4).

В нашето изследване проверихме влиянието на различни растителни протеинови хидролизати върху специфичната протеолитична активност на лактобацили. Добавянето на 1% грахов протеинов хидролизат към хранителна среда mMRS доведе до повишаване на специфичната протеолитична активност при щамове *L. helveticus* AB и *L. helveticus* h48, чиито стойности бяха 18,51 U/mg протеин и 19,38 U/mg протеин, съответно (фиг. 4). Най-висока специфична протеолитична активност в тази хранителна среда се установи за щам *L. helveticus* b244 – 35,55 U/mg протеин. Щам *L. helveticus* b244 показва сравнима специфична протеолитична активност със стойността получена в хранителната среда съдържаща млечни протеини. Добавянето на 1% грахов протеинов хидролизат към хранителна среда mMRS се явява щамово-специфичен активатор на специфична протеолитична активност при различни щамове лактобацили.

При добавяне на 1% соев протеинов хидролизат към хранителна среда mMRS се наблюдава подобна тенденция, както при изследване на специфичната протеолитична активност в хранителна среда с грахов протеинов хидролизат. Специфичната протеолитична активност на щамове *L. helveticus* не се активира в присъствие на соев протеинов хидролизат. С най-високи и близки стойности бяха щамове *L. helveticus* h70 (17,90 U/mg протеин) и *L. helveticus* b244 (16,85 U/mg протеин) (фиг. 4).



Фигура 4. Специфична протеолитична активност на щамове лактобацили върху различни хранителни среди

* 10% COM – сухо обезмаслено мляко; mMRS— MRS без пептон и месен екстракт; GX – Грахов протеинов хидролизат; CX– Соев протеинов хидролизат; WP 80 – суроватъчен протеин 80;

*Специфична протеолитична активност със стандартно отклонение от три паралелни измервания

В сравнение с щамове от вида *L. helveticus*, щам *L. casei* c1 показва ниска специфична протеолитична активност спрямо всички тествани среди получени на база на mMRS. В

среда mMRS без присъствие на растителни протеинови хидролизати, шамът показва специфична протеолитична активност близка до *L. helveticus* AB и *L. helveticus* h48 (7,80 U/mg протеин). При добавяне на 1% грахов протеинов хидролизат към хранителна среда mMRS, активността (7,28 U/mg протеин) се доближи до тази на шам *L. helveticus* h70 – 10,61 U/mg протеин. Резултатът получен в хранителната среда в присъствие на соев протеинов хидролизат беше съизмерим спрямо този на граховия хидролизат – 8,73 U/mg протеин. Добавянето на суроватъчен протеин WP 80 също не оказва съществено влияние върху специфичната протеолитична активност, като получената стойност беше 8,73 U/mg протеин.

2.2 Заключение

Най-висока специфична протеолитична активност от изследваните среди се установи в среди 10% COM и хранителна среда mMRS. Добавянето на грахов протеинов хидролизат към хранителна среда mMRS доведе до повишаване на специфичната протеолитична активност за шамове *L. helveticus* AB и *L. helveticus* h48. Най-висока специфична протеолитична активност в хранителна среда mMRS в присъствие на грахов протеинов хидролизат се установи за шам *L. helveticus* b244, чиято стойност беше сравнима със стойността получена в хранителната среда съдържаща млечни протеини. Специфичната протеолитична активност на изследваните шамове не се активира в присъствие на соев протеинов хидролизат. Добавянето на суроватъчен протеин WP 80 към хранителната среда mMRS активира протеолитичната система при шам *L. helveticus* b244 като специфичната протеолитична активност е сравнима с тази при използване на 10 % сухо обезмаслено мляко и хранителна среда mMRS. Граховият протеинов хидролизат, соевият протеинов хидролизат и суроватъчният протеин WP 80 се явяват шамово-специфични активатори на специфична протеолитична активност при селектираните шамове лактобацили. С най-висока специфична протеолитична активност в изследваните хранителни среди се утвърдиха шамовете *L. helveticus* b 244 и *L. helveticus* h70.

3. Изследване на аминоклептидазната активност на селектираните шамове лактобацили култивирани в хранителни среди с растителни протеини

3.1 Изследване активността на левцин аминоклептидаза и лизин аминоклептидаза

Активността на левцин аминоклептидаза и лизин аминоклептидаза беше определена с предварително дезинтегрирани клетки на селектираните шамове *L. helveticus* AB, *L. helveticus* h25, *L. helveticus* h48, *L. helveticus* h70, *L. helveticus* b 244 и *L. casei* c1 култивирани в 10% сухо обезмаслено мляко (COM), хранителна среда mMRS, в чийто състав не присъстваха компонентите пептон и месен екстракт (mMRS), хранителна среда mMRS с добавка на 1% грахов протеинов хидролизат, mMRS с добавка на 1% соев протеинов хидролизат и mMRS с добавка на 1% суроватъчен протеин (WP 80).

Изследваните шамове лактобацили показаха вариабилна активност срещу субстратите според различните видове хранителни среди. За шамовете култивирани в

среда с 10% сухо обезмаслено мляко, най-висока специфична левцин аминокпептидазна активност се установи за *L. helveticus* h70 - 350 U/mg протеин. Близка стойност на специфична левцин аминокпептидазна активност се отчете и при щам *L. helveticus* h25 - 299 U/mg протеин. Сходни бяха и резултатите получени за лизин аминокпептидазната активност в среда с 10% сухо обезмаслено мляко. Щам *L. helveticus* h25 показва най-висока (356 U/mg протеин) специфична лизин аминокпептидазна активност, а щам *L. helveticus* h70 имаше близки стойности - 344 U/mg протеин специфична лизин аминокпептидазна активност (фиг. 5). Хранителната среда с млечни протеини се оказа неподходяща за секреция на аминокпептидази за щам *L. casei* c1.

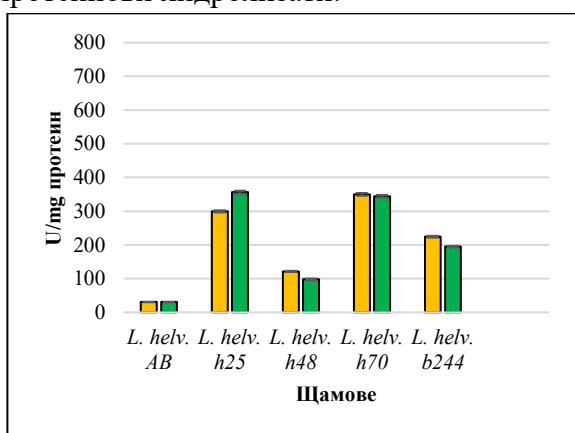
Резултатите за изследваните две аминокпептидази при щамовете култивирани на хранителна среда mMRS бяха по-високи спрямо тези получени на среда 10 % сухо обезмаслено мляко, а и сред всички тествани среди (фиг. 5-Б). Щам *L. helveticus* h25 показва най-висока специфична левцин аминокпептидазна активност със стойност 696 U/mg протеин. Останалите щамове *L. helveticus* имаха сравнително близка специфична левцин аминокпептидазна активност варираща в диапазона от 155,42 U/mg протеин до 307,90 U/mg протеин. Подобна тенденция се наблюдаваше и при определяне на активността на лизин аминокпептидазата на избраните щамове лактобацили. Отново щам *L. helveticus* h25 показва най-висока специфична лизин аминокпептидазна активност, чиято стойност беше 816 U/mg протеин. При останалите щамове *L. helveticus* се установи специфична аминокпептидазна активност в границите от 207,23 U/mg протеин до 488,40 U/mg протеин. Специфичната лизин аминокпептидазна активност на щам *L. casei* c1 беше сходна със стойността на специфичната левцин аминокпептидазна активност (84,77 U/mg протеин).

При добавяне на растителни протеинови хидролизати в хранителна среда mMRS се установи значителна редукция на левцин и лизин аминокпептидазна активност (фиг. 5-В, Г). Щамовете *L. helveticus* АВ, *L. helveticus* h48, *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 показаха сходна левцин аминокпептидазна активност в растителната среда с грахов протеинов хидролизат като стойностите варираха от 98,51 U/mg протеин до 119,44 U/mg протеин. (фиг. 5-В). Специфичната левцин аминокпептидазна активност на щам *L. helveticus* h25 в хранителна среда mMRS с грахов протеинов хидролизат беше най-ниска, но съизмерима с тази на *L. helveticus* АВ в среда с 10% сухо обезмаслено мляко (фиг. 5-А,В). Щамовете *L. helveticus* АВ, *L. helveticus* h48, *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 показаха сравнима лизин аминокпептидазна активност като стойностите варираха от 132,99 U/mg протеин до 189,71 U/mg протеин. (фиг. 5-В). Щамовете *L. helveticus* h25 и *L. casei* c1 показаха съизмерима специфична лизин аминокпептидазна активност спрямо специфичната левцин аминокпептидазна активност.

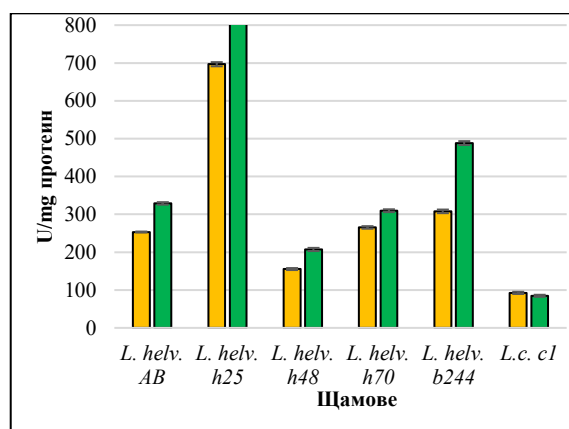
Добавянето на 1% соев протеинов хидролизат към хранителна среда mMRS не доведе до активиране на левцин и лизин аминокпептидазите. Единствено щам *L. helveticus* АВ показва съизмерима левцин и лизин аминокпептидазна активност спрямо стойностите получени в хранителната среда mMRS без добавки. Специфичната левцин аминокпептидазна активност за щам *L. helveticus* АВ беше 186,15 U/mg протеин, а специфичната лизин аминокпептидазна активност – 246,91 U/mg протеин (фиг. 5-Г). Тези резултати бяха сходни до стойностите получени в среда mMRS без добавки, спрямо средата с 10 % сухо обезмаслено мляко бяха 6-7 пъти по-високи, а в хранителна среда

mMRS съдържаща грахов протеинов хидролизат – около 2 пъти по-високи. Двете аминоксидазни активности за щам *L. helveticus* h70 бяха еднакви (159,26 U/mg протеин) в хранителната среда mMRS със соев протеинов хидролизат, близки до тези аминоксидазните активности в хранителна среда mMRS с грахов протеинов хидролизат и около два пъти по-ниски спрямо средата с 10% сухо обезмаслено мляко и в хранителна среда mMRS без добавки.

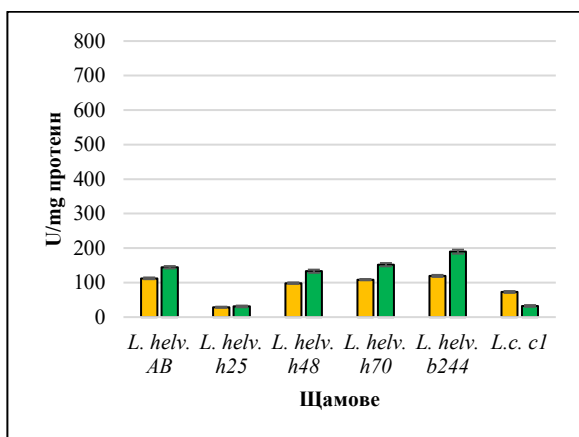
Добавянето на суроватъчен протеин WP 80 към хранителна среда mMRS не активира протеолитичната система при изследваните щамове лактобацили (фиг. 5-Д). Най-висока специфична левцин аминоксидазна активност беше установена за щам *L. helveticus* b244 222,96 U/mg протеин. Тази стойност беше съизмерима с резултатите получени в среда с 10 % сухо обезмаслено мляко, както и по-висока от левцин аминоксидазните активности измерени в хранителните среди съдържащи растителни протеинови хидролизати.



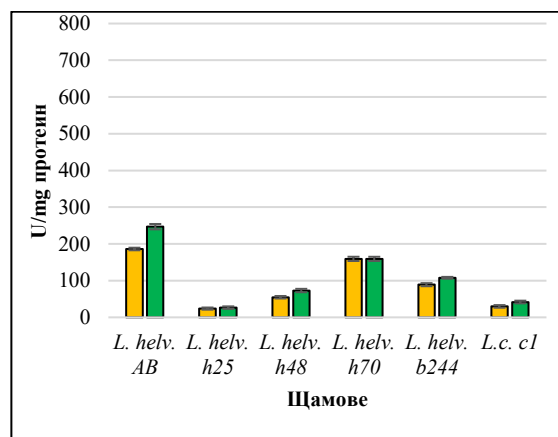
A. (10 % COM)



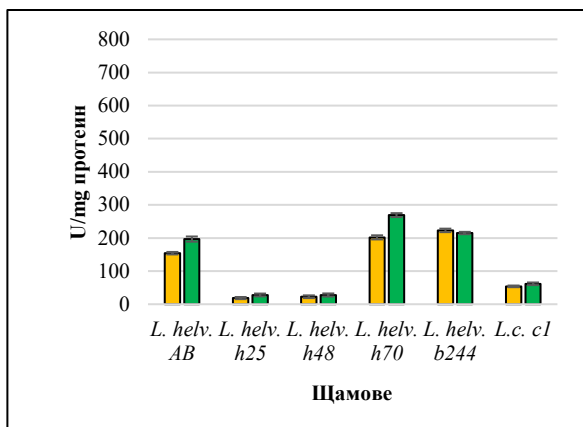
Б. (mMRS)



В. (mMRS + 1% ГПХ)



Г. (mMRS + 1% СПИХ)



Д. (mMRS + 1 % WP80)

Фигура 5 (А-Д). Специфична левцин (■) и лизин (■) аминокептидазна активност на щамове *L. helveticus* щам *L. casei* c1 в различни видове среди

*10% COM – сухо обезмаслено мляко; mMRS— MRS без пептон и месен екстракт; ГПХ – Грахов протеинов хидролизат; СПХ – Соев протеинов хидролизат; WP 80 – суроватъчен протеин 80; *L. helv.* - *L. helveticus*; *L.c. c1* - *L. casei* c1.

*Специфична левцин и лизин аминокептидазна активност със стандартно отклонение от три паралелни измервания

*Не се установява специфична левцин и лизин аминокептидазна активност в 10% COM за щам *L. casei* c1

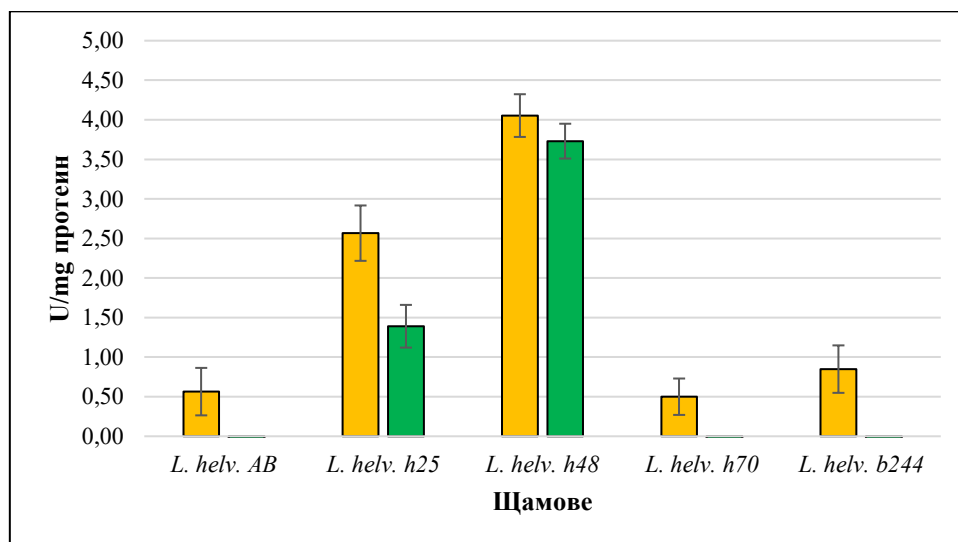
Щамовете *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* AB имаха близка специфична левцин аминокептидазна активност до тази на *L. helveticus* b244 като стойностите бяха 201,88 U/mg протеин и 154,12 U/mg протеин, съответно. Най-висока специфична лизин аминокептидазна активност се установи за щам *L. helveticus* h70 - 269,17 U/mg протеин. Тази стойност беше по-висока в сравнение със специфичните лизин аминокептидазни активности в хранителните среди с растителни протеинови хидролизати (фиг. 5-В, Г, Д). Щам *L. helveticus* b244 и щам *L. helveticus* AB показаха сравними стойности на специфична лизин аминокептидазна активност - 215 U/mg протеин и 196,76 U/mg протеин, съответно.

3.2. Изследване активността на аргинин аминокептидаза и пролин аминокептидаза

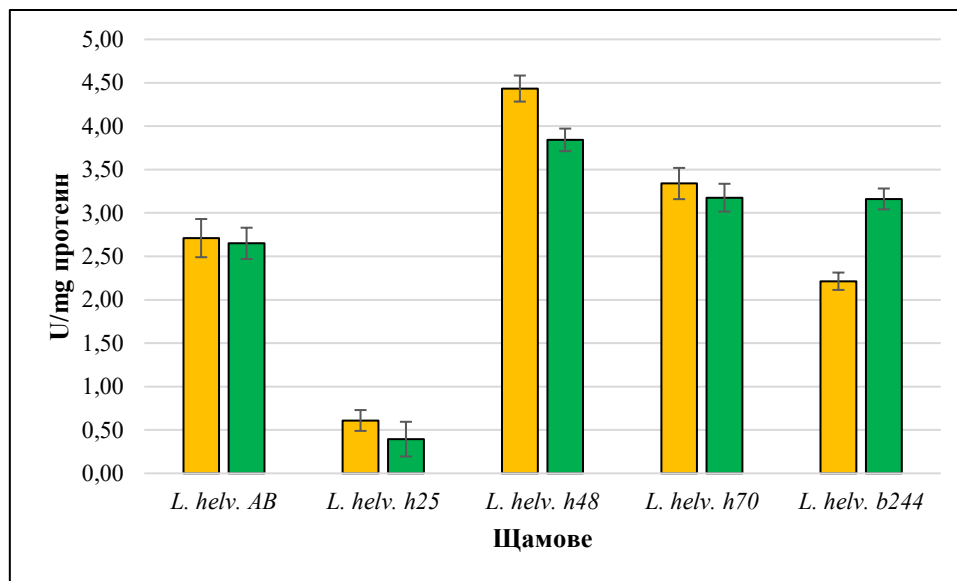
Стойностите на специфичните аргинин и пролин аминокептидазни активности на изследваните щамове лактобацили бяха значително по-ниски в сравнение с резултатите получени за специфичните левцин и лизин аминокептидазни активности във всички тествани среди (фиг. 6 А-Б). Освен това, двете аминокептидазни активности бяха детектирани в среда 10% сухо обезмаслено мляко и хранителна среда mMRS с 1% грахов протеинов хидролизат. В средата с млечни протеини с по-висока активност се установи аргинин аминокептидазата, чиито стойности бяха установени във всички щамове *L. helveticus*. Щамовете *L. helveticus* h48 и *L. helveticus* h25 показаха най-висока специфична аргинин аминокептидазна активност като получените стойности бяха 4,05 U/mg протеин и 2,57 U/mg протеин. При останалите щамове *L. helveticus* специфичната аргинин аминокептидазна активност беше под 1 U/mg протеин (фиг. 6-А). Специфична пролин аминокептидазна активност беше измерена само при щамовете *L. helveticus* h48 и *L.*

helveticus h25, чиито стойности бяха 3,73 U/mg протеин и 1,39 U/mg протеин, съответно (фиг. 6-A).

Добавянето на 1% грахов протеинов хидролизат към хранителна среда mMRS доведе до активиране на аргинин и пролин аминокептидазите за щамове *L. helveticus*. Най-висока специфична аргинин аминокептидазна активност беше установена за щам *L. helveticus* h48 4,43 U/mg протеин. Щамове *L. helveticus* AB, *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 имаха сходни стойности за специфична аргинин аминокептидазна активност – 2,71 U/mg протеин, 3,34 U/mg протеин и 2,21 U/mg протеин, съответно. Стойностите получени за специфичната пролин аминокептидазна активност бяха съизмерими с тези на специфичната аргинин аминокептидазна активност. Отново щам *L. helveticus* h48 показва най-висока специфична пролин аминокептидазна активност - 3,84 U/mg протеин. Щамове *L. helveticus* AB, *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 имаха сравними стойности на специфична пролин аминокептидазна активност – 2,65 U/mg протеин, 3,18 U/mg протеин и 3,16 U/mg протеин, съответно. При щам *L. casei* c1 не се установи аргинин и пролин аминокептидазни активности при всички тествани среди.



A. (10% COM)



Б. (mMRS + 1% ГХП)

Фигура 6 (А-Б). Специфична аргинин (■) и пролин (■) аминокептидазна активност на щамове *L. helveticus* в различни видове среди

*10% COM – сухо обезмаслено мляко; mMRS— MRS без пептон и месен екстракт; ГПХ – Грахов протеинов хидролизат; *L. helv.* - *L. helveticus*.

*Специфична аргинин и пролин аминокептидазна активност със стандартно отклонение от три паралелни измервания

*Не се установява специфична аргинин и пролин аминокептидазна активност в изследваните хранителни среди за щам *L. casei* c1.

3.3. Заключение

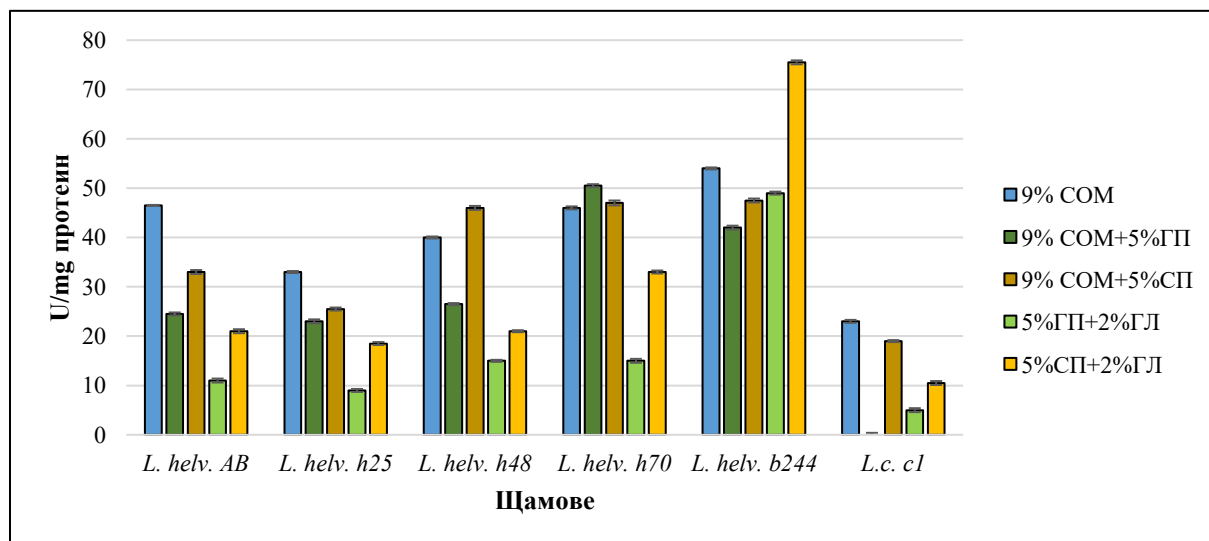
След проведеното изследване се установи, че щам *L. helveticus* h25 има най-високи специфични левцин и лизин аминокептидазни активности получени в хранителна среда mMRS. Добавянето на грахов протеинов хидролизат, соев протеинов хидролизат и суроватъчен протеин WP 80 не активира левцин и лизин аминокептидазите на изследваните щамове лактобацили. Стойностите на специфичните аргинин и пролин аминокептидазни активности на изследваните щамове лактобацили бяха значително по-ниски в сравнение с резултатите получени за специфичните левцин и лизин аминокептидазни активности във всички тествани среди. Аргинин и пролин аминокептидазни активности бяха установени при култивиране на щамове *L. helveticus* в среда 10% сухо обезмаслено мляко и хранителна среда mMRS с 1% грахов протеинов хидролизат. Щам *L. helveticus* h48 показва най-високи специфични аргинин и пролин аминокептидазни активности в изследваните хранителни среди.

4. Доказване на биологично-активни пептиди в хранителни среди с растителни протеини

4.1 Изследване на АСЕ-инхибиторна активност

АСЕ-инхибиторната активност на пептиди, получени след култивиране на предварително селектираните щамове *L. helveticus* АВ, *L. helveticus* h25, *L. helveticus* h48, *L. helveticus* h70, *L. helveticus* b 244 и *L. casei* c1 беше изследвана в среда 9% сухо обезмаслено мляко (СОМ), среда 9% сухо обезмаслено мляко (СОМ) с добавка на 5% грахов протеин, среда 9% сухо обезмаслено мляко (СОМ) с добавка на 5% соев протеин, хранителна среда 5% грахов протеин в присъствие на 2 % глюкоза и хранителна среда 5% соев протеин в присъствие на 2 % глюкоза.

При изследване на АСЕ-инхибиторната активност се установи щамово-зависима специфичност в зависимост от използваните различни видове среди (фиг. 7). Щамовете *L. helveticus* показаха АСЕ-инхибиторна активност в диапазона от 9 U/mg протеин до 75,5 U/mg протеин при култивиране на различните видове хранителни среди. Единствено щам *L. casei* c1 показа най-ниски стойности. АСЕ-инхибиторната активност на изследваните щамове лактобацили култивирани в 9 % сухо обезмаслено мляко (СОМ) варираше от 23 U/mg протеин до 54 U/mg протеин. Щам *L. helveticus* b 244 показа най-висока АСЕ-инхибиторна активност - 54 U/mg протеин



Фигура 7. Изследване на АСЕ-инхибиторна активност на щамове *L. helveticus* АВ, *L. helveticus* h25, *L. helveticus* h48, *L. helveticus* h70, *L. helveticus* b 244 и *L. casei* c1 култивирани в хранителни среди с различни източници на протеини

*9% СОМ – сухо обезмаслено мляко; 9% СОМ + 5% ГП - сухо обезмаслено мляко с добавка на грахов протеин; 9% СОМ + 5% СП - сухо обезмаслено мляко с добавка на соев протеин; 5% ГП + 2 % ГЛ – грахов протеин с добавка на глюкоза; 5% СП + 2 % ГЛ – соев протеин с добавка на глюкоза.

*АСЕ-инхибиторна активност със стандартно отклонение от три паралелни измервания

* За единица инхибиторна активност (1 Unit) се приема количеството вещество в 1 mg супернатанта от тестваната култура, което дава 50% инхибиране (IC₅₀) на АСЕ.

В нашето изследване проверихме влиянието на грахов и соев протеин в изцяло растителни среди върху АСЕ-инхибиторната активност на селектираните лактобацили (фиг. 7). Щам *L. helveticus* b 244 показва най-висока АСЕ-инхибиторната активност в изцяло растителна среда съдържаща 5% грахов протеин и 2% глюкоза - 49 U/mg протеин. Тази стойност беше съизмерима с получените стойности за щам *L. helveticus* b244 в среда съдържаща 9% сухо обезмаслено мляко (49 U/mg протеин) и комбинираните растителни среди с грахов и соев протеин (42 U/mg протеин и 47,5 U/mg протеин, съответно). При останалите щамове на вида *L. helveticus* АСЕ-инхибиторната активност беше в диапазона от 9 U/mg протеин до 15 U/mg протеин. Щам *L. casei* c1 показва най-ниска АСЕ-инхибиторна активност – 5 U/mg протеин. За определянето на АСЕ-инхибиторна активност в изцяло растителна среда с грахов протеин, ферментирала с помощта на лактобацили, все още няма ясно дефиниран щам, произвеждащ индустриално значими количества от търсените пептиди.

При изследване на АСЕ-инхибиторната активност на щамове лактобацили в растителната среда съдържаща 5 % соев протеин и 2 % глюкоза се установи значително повишаване на АСЕ-инхибиторната активност при щам *L. helveticus* b 244 спрямо всички хранителни среди, чиято стойност беше 75,5 U/mg протеин. Тази стойност беше с около 40% по-висока спрямо АСЕ-инхибиторната активност в среда, съдържаща само млечни протеини и около 60% спрямо останалите хранителни среди. АСЕ-инхибиторната активност в растителната среда със соев протеин беше по-висока спрямо растителната среда с грахов протеин при всички изследвани лактобацили.

Добавянето на грахов и соев протеин към млечната среда не оказва значително въздействие върху АСЕ-инхибиторната активност спрямо средата с 9% сухо обезмаслено мляко. При комбинация на 5% грахов протеин с 9 % сухо обезмаслено мляко се установи около 10% повишаване на АСЕ-инхибиторната активност за щам *L. helveticus* h70. При останалите щамове на вида *L. helveticus* граховият протеин не оказва въздействие. Най-висока АСЕ-инхибиторна активност в комбинираната среда от 9% млечен и 5% грахов протеин се установи за щам *L. helveticus* h70, чиято стойност беше 50,5 U/mg протеин. Щам *L. helveticus* b 244 показва сравнително близка АСЕ-инхибиторна активност до тази на щам *L. helveticus* h70 - 42 U/mg протеин. Останалите щамове на вида *L. helveticus* имаха сходни стойности на АСЕ-инхибиторна активност в границите от 23 U/mg протеин до 26,5 U/mg протеин. АСЕ-инхибиторна активност за щам *L. casei* c1 не се установи в комбинираната среда от 9% млечен и 5% грахов протеин. Добавянето на 5% соев протеин към средата с 9% сухо обезмаслено мляко повиши с около 15% АСЕ-инхибиторната активност на щам *L. helveticus* h48, чиято стойност достигна 46 U/mg протеин. Стойността на АСЕ-инхибиторната активност на щам *L. helveticus* h70 в комбинираната среда с 5% соев протеин беше съизмерима с тази получена в средата с млечни протеини - 47 U/mg протеин.

4.2. Заключение

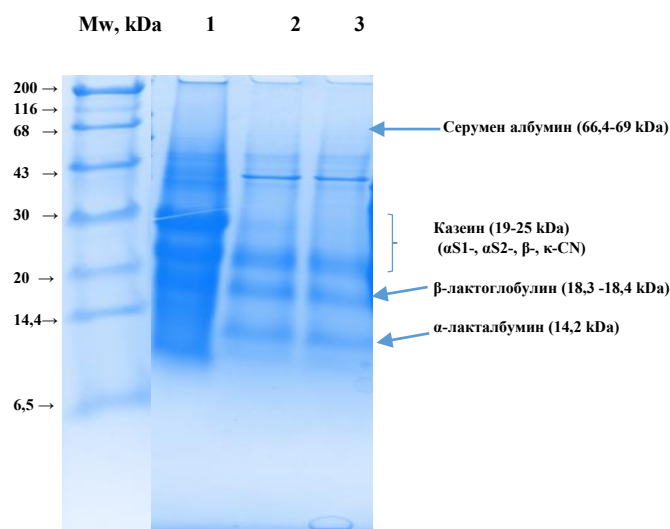
Доказано е, че щам *L. helveticus* b244 показва най-висока АСЕ-инхибиторна активност при култивиране на растителни среди съдържащи 5% соев протеин в присъствие на 2 % глюкоза и 5 % грахов протеин в присъствие на 2% глюкоза.

Допълнително установихме АСЕ-инхибиторна активност при култивиране на комбинирани хранителни среди съдържащи 9% млечен протеин в присъствие на 5% грахов протеин и 9% млечен протеин в присъствие на 5% соев протеин при щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244. Най-висока АСЕ-инхибиторна активност беше получена в изцяло растителна среда, състояща се от 5 % соев протеин и 2% глюкоза. Щам *L. helveticus* b244 показва най-високи стойности на АСЕ-инхибиторна активност във всички тествани среди.

5. Характеризиране на образуваните пептиди

5.1. SDS-PAGE (Трис-трицинова) електрофореза на избрани щамове лактобацили

В настоящето изследване се проведе SDS-PAGE (Трис-трицинова) електрофореза на пептидни фракции получени при култивиране на щамовете *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 на различни хранителни среди в присъствие на растителни протеини.



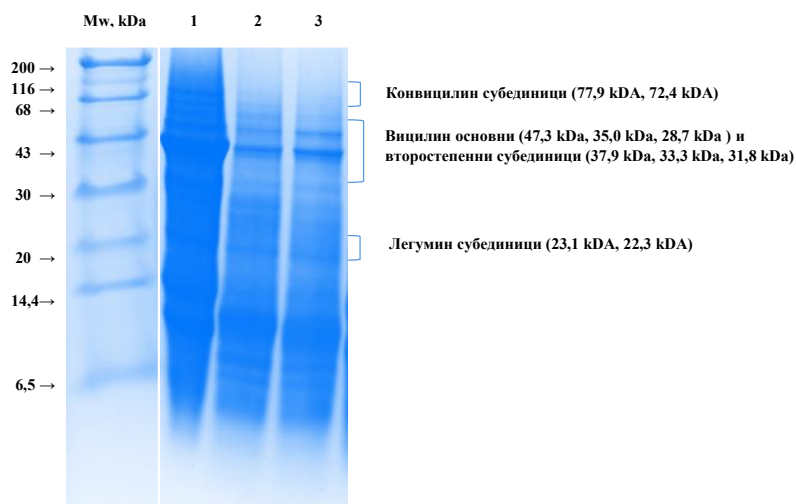
Фигура 8. SDS-PAGE на щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 култивирани в среда 9% сухо обезмаслено мляко (COM)

*1. 9% COM, неинокулирана среда; 2. *L. helveticus* h70 култивиран в 9% COM; 3. *L. helveticus* b244 култивиран в 9% COM.

В среда с 9% сухо обезмаслено мляко, с изключение на трудно разградимия комплекс от казеинови протеини при 38 kDa, всички други протеинови ивици бяха хидролизирани във ферментиралите проби с двата щама *L. helveticus*. Част от казеиновите фракции бяха хидролизирани след ферментационния процес, като протеиновата ивица съответстваща на 30 kDa напълно отсъстваше във ферментиралите проби с щамовете *L. helveticus*. При протеиновите фракции на β -лактоглобулин и α -лакталбумин също беше установена протеолиза. В резултат на протеолизата на

високомолекулните пептиди, във ферментиралите проби с щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 се установиха нови пептиди с молекулна маса около 12 kDa, които не бяха отчетени в неинокулираната проба.

Анализът на данните от SDS-PAGE на протеиновите фракции на щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 култивирани в растителна хранителна среда съдържаща 5% грахов протеин и 2% глюкоза показва наличие на нови нискомолекулни пептиди (фиг. 8). Установени са силно интензивно оцветени ивици в неинокулираната среда, което потвърждава високомолекулната маса на граховия протеин, чиито протеинов състав варира от 30 до 400 kDa (Yang J. *et al.*, 2023). Млечните протеинови фракции са в диапазона 19-25 kDa (Elzoghby A.O. *et al.*, 2015). Наблюдава се хидролиза на субединиците вицилин в диапазона от около 40 kDa, като интензитета на оцветяване на ивицата в неинокулираната проба намалява спрямо този във ферментиралите проби с щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244.



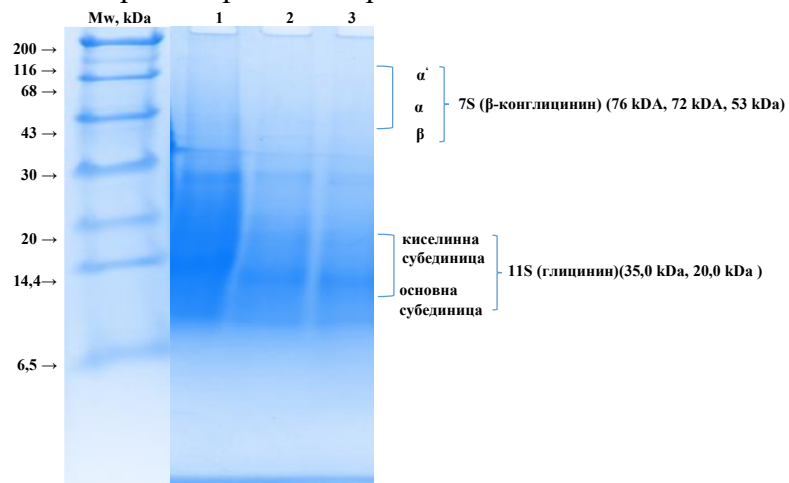
Фигура 9. SDS-PAGE на щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 култивирани в растителна хранителна среда 5% грахов протеин в присъствие на 2% ГЛЮКОЗА

*1. 5% грахов протеин и 2% глюкоза, неинокулирана среда; 2. *L. helveticus* h70 култивиран в хранителна среда 5% грахов протеин и 2% глюкоза; 3. *L. helveticus* b244 култивиран в хранителна среда 5% грахов протеин и 2% глюкоза.

Подобна тенденция се наблюдава и при протеиновите ивици в диапазона 14,4 – 30 kDa. Наличието на нискомолекулни пептиди е очевидно във ферментиралите проби в диапазона под 6,5 kDa, докато в неинокулираната среда не се установи нито един от тези нискомолекулни пептиди. По-ниският интензитет на оцветяване на ивиците почти не се детектира след настъпилата хидролиза, което най-вероятно се дължи на по-нататъшно разграждане до аминокиселини. Електрофоретичният анализ потвърди, че когато щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 се култивират в растителна хранителна среда с 5% грахов протеин в присъствие на 2% глюкоза се установяват нискомолекулни пептиди (< 6,5 kDa), а хидролизата на вицилин е по-бърза от тази на субединиците

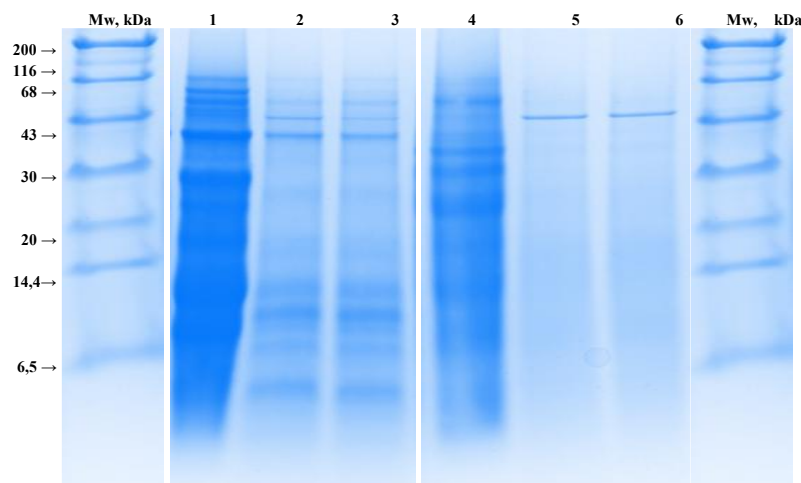
легумин. Освен това, броят на пептидните ивици под фракциите на субединиците легумин е по-висок, което показва образуване на пептиди с по-ниско молекулно тегло.

В контраст с хранителната среда съдържаща 9% сухо обезмаслено мляко и растителната хранителна среда съдържаща 5% грахов протеин и 2% глюкоза, в растителната хранителна среда съдържаща 5% соев протеин в присъствие на 2% глюкоза не бяха установени високомолекулни протеинови фракции в интервала над 30 kDa, както в неинокулираната хранителна среда, така и във ферментиралите проби. На фиг. 10 се вижда хидролиза на 11S глицинин с по-ниска интензивност на оцветяване на ивицата с Mw 27 kDa в пробите ферментирани с щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244, по-високата степен на хидролиза води до по-светли ивици за протеиновите фракции в сравнение с неинокулираната проба. След проведената ферментация в хранителната среда съдържаща 5% соев протеин в присъствие на 2% глюкоза се установява, че протеиновите фракции на 11S глицинин се разграждат до по-нискомолекулни фракции като се образуват нови пептиди с молекулна маса около 12 kDa. Тези пептиди не присъстват в неинокулираната проба. Хидролизата на киселинната субединица на 11S глицинин по-бързо настъпва в сравнение с тази на основната субединица 11S глицинин. Броят на пептидните ивици под фракциите на основната субединица 11S глицинин е по-висок, което показва образуването на пептиди с по-ниско молекулно тегло. Това е важно за намаляване алергенността на продуктите. Резултатите, получени от SDS-PAGE електрофорезата за ферментирала растителна хранителна среда с 5% соев протеин в присъствие на 2% глюкоза при използване на щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 показаха по-ниска степен на хидролиза на протеините спрямо ферментиралата растителна хранителна среда с 5% грахов протеин в присъствие на 2% глюкоза.



Фигура 10. SDS-PAGE на щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 култивирани в растителна хранителна среда 5% соев протеин в присъствие на 2% ГЛЮКОЗА

*1. 5% соев протеин и 2% глюкоза, неинокулирана среда; 2. *L. helveticus* h70 култивиран в хранителна среда 5% соев протеин и 2% глюкоза; 3. *L. helveticus* b244 култивиран в хранителна среда 5% соев протеин и 2% глюкоза.



Фигура 11. SDS-PAGE на щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 култивирани в комбинирани хранителни среди

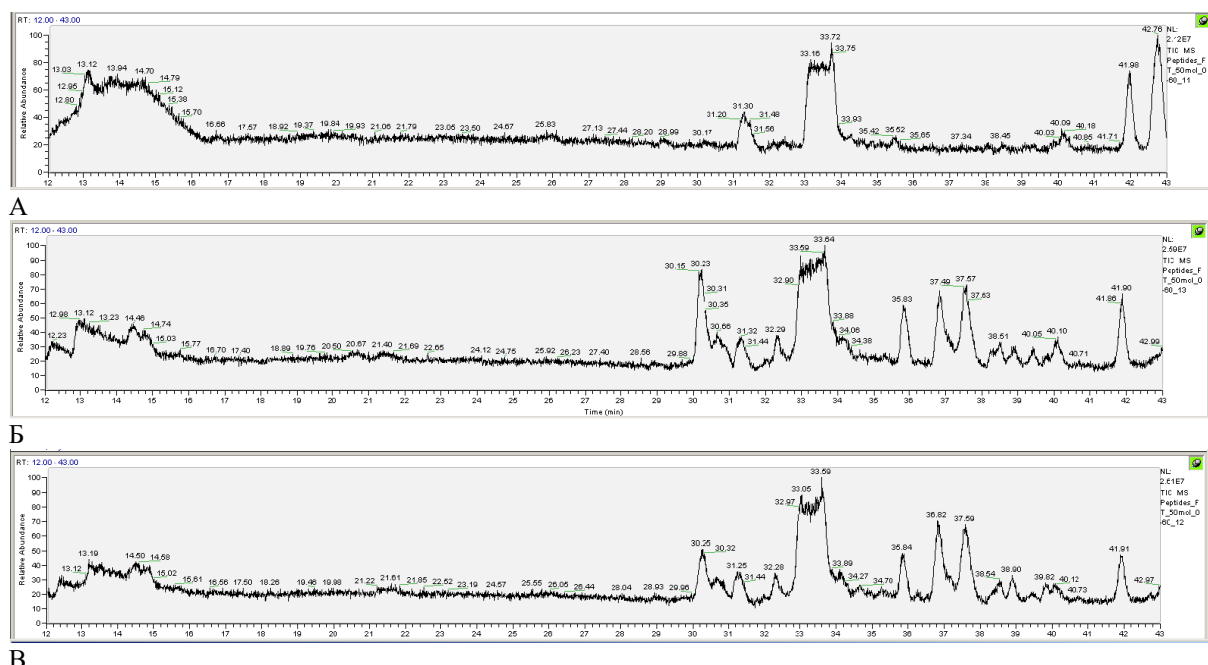
*1. Хранителна среда 9% сухо обезмаслено мляко и 5% грахов протеин, неинокулирана среда; 2. *L. helveticus* h70 култивиран в комбинирана хранителна среда 9% сухо обезмаслено мляко и 5% грахов протеин; 3. *L. helveticus* b244 култивиран в комбинирана хранителна среда 9% сухо обезмаслено мляко и 5% грахов протеин; 4. Хранителна среда 9% сухо обезмаслено мляко и 5% соев протеин, неинокулирана среда; 5. *L. helveticus* h70 култивиран в комбинирана хранителна среда 9% сухо обезмаслено мляко и 5% соев протеин; 6. *L. helveticus* b244 култивиран в комбинирана хранителна среда 9% сухо обезмаслено мляко и 5% соев протеин.

В представените комбинирани хранителни среди беше наблюдавана подобна тенденция по отношение на ефекта на протеолиза по време на ферментация с щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 със значително намаляване на интензитета на оцветяване на протеиновите ивици в сравнение с неинокулираната хранителна среда. Получените резултати ясно демонстрират протеолитичната способност на *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 да разграждат не само млечните протеини, но и протеиновите фракции в хранителните среди съдържащи грахов и соев протеин в една или друга степен.

5.2. Доказване на новообразувани пептидни фракции по метода ултрависокоэффективна течна хроматография с маспектрометрия (UHPLC-MS)

Предварително селектираните щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 бяха култивирани в среда 9% сухо обезмаслено мляко (COM), среда 9% сухо обезмаслено мляко (COM) в присъствие на 5% грахов протеин, среда 9% сухо обезмаслено мляко (COM) в присъствие на 5% соев протеин, хранителна среда 5% грахов протеин в присъствие на 2 % глюкоза и хранителна среда 5% соев протеин в присъствие на 2 % глюкоза.

Пептидните профили на щамовете *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 култивирани в млечна среда са представени на фиг. 12. Неинокулираната проба (9% СОМ) (Фиг. 12 – А) се характеризира с четири основни пептидни фракции с времена на елуиране 31,30 min, 33,16-33,75 min, 41,98 min и 42,76 min. Тези пептидни фракции са лесно разпознаваеми в пробите, ферментирани от двата щама с изключение на четвъртата при 42,76 min. На фигурата се вижда, че ферментацията извършена под действието на двата щама *L. helveticus* води до детектиране на два нови пика в диапазона 30,20-30,66 min, още преди първата основна фракция. Първият нов пик при време на елуиране 30,23 min беше по-силно изразен при щам *L. helveticus* h70 (Фиг.12 – Б), за разлика от *L. helveticus* b244 (Фиг. 12 – В). Втората новообразувана пептидна фракция (30,66 min) беше сравнително еднаква и при двата щама. След първата основна пептидна фракция (31,30 min) отново се появиха по един сравнително еднакъв пик и за двата щама *L. helveticus* с време на елуиране 32,28-32,29 min. За разлика от първата основна пептидна фракция, във втората се наблюдаваше появата на множество пикове сравними и за двата щама *L. helveticus*. Третата основна пептидна фракция остана почти непроменена вследствие млечнокиселата ферментация. Докато последната пептидна фракция беше разградена след действието на протеолитичните системи на *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 и напълно отсъстваше.

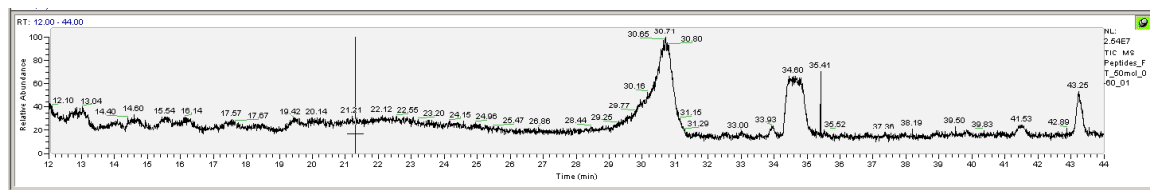


Фигура 12. (А-В) Пептидни профили получени при култивиране на щамовете *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 в 9% сухо обезмаслено мляко (СОМ)

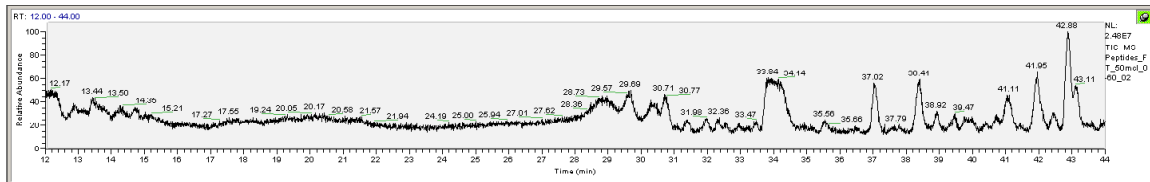
А. 9% СОМ, неинокулирана среда; Б. h70 култивиран в 9% СОМ; В. b244 култивиран в 9% СОМ.

*9% СОМ – сухо обезмаслено мляко

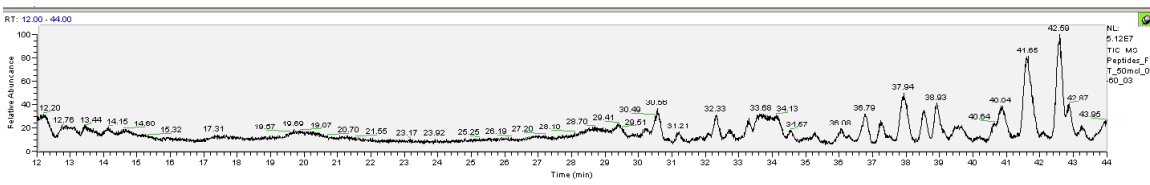
Неинокулираната проба (5% грахов протеин в присъствие на 2% глюкоза) (фиг.13-А) се характеризираше с три основни пептидни фракции, които могат условно да бъдат обозначени като висока-(30,71 min), средна-(34,60 min) и ниско-(43,25 min) молекулна пептидна фракция. За всеки от двата тествани щама във ферментиралите проби пептидните фракции с висока и средна молекулна маса бяха напълно разградени с появата на множество нови пептидни фракции (фиг. 13 – Б, В). Във ферментиралите проби бяха установени множество пептиди с ниска молекулна маса в диапазона от 36 min до 42 min време на елуиране, като пиковите след 41 min бяха по-силно изразени, което показва по-голямо разграждане на пептидните фракции до нискомолекулни пептиди. Резултатите от фиг.13 показват, че протеините, както и пептидите с по-висока молекулна маса са били разградени до пептиди с по-ниска молекулна маса в хода на ферментацията. И за двата щама *L. helveticus* не се наблюдаваха значителни разлики по отношение на степента на разграждане и появата на нови пикове. С предимство в пробата с щам *L. helveticus* b244 се наблюдаваха повече пикове в диапазона между 35 min до 41 min време на елуиране в сравнение с щам *L. helveticus* h70.



А



Б



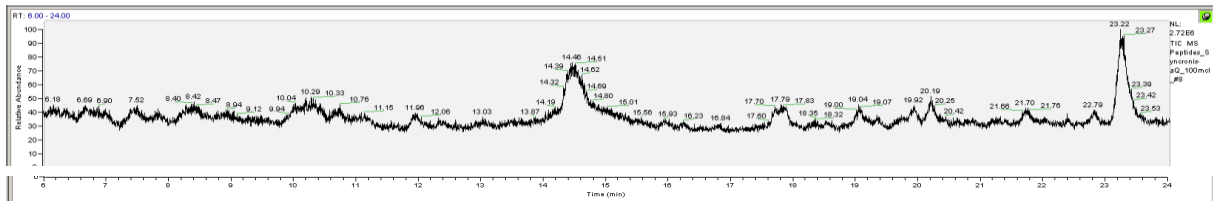
В

Фигура 13. (А-В) Пептидни профили получени при култивиране на щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 в хранителна среда 5% Грахов протеин в присъствие на 2% Глюкоза

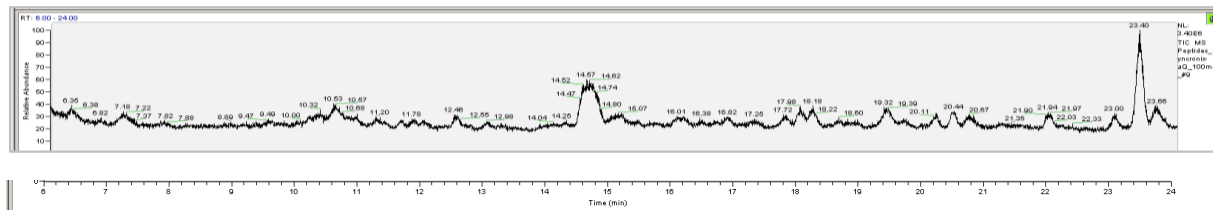
А. 5% Грахов протеин + 2% Глюкоза, неинокулирана среда; Б. h70 култивиран в 5% Грахов протеин+2% Глюкоза; В. b244 култивиран в 5% Грахов протеин + 2% Глюкоза

В контраст с пептидните профили получени в растителната среда с 5% грахов протеин в присъствие на 2% глюкоза ферментирала с *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244, в растителната среда съдържаща 5% соев протеин и 2% глюкоза не се наблюдаваше значително разграждане на пептидните фракции (фиг. 14). Неинокулираната проба (5%

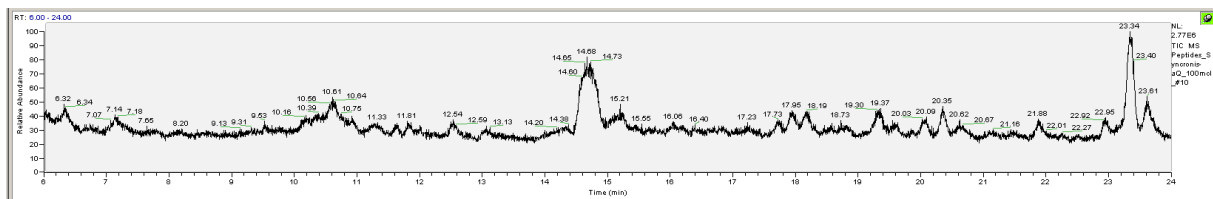
соев протеин в присъствие на 2% глюкоза) (фиг. 14-А) се характеризира с две основни пептидни фракции съответно на 14,46 min и 23,27 min. Тези фракции също се установиха във ферментиралите проби, получени от двата щамове. Между тези два пика бяха наблюдавани множество второстепенни пикове, както в неинокулираната, така и във ферментиралите проби. Тези резултати предполагат, че соевите протеини и пептидите с по-висока молекулна маса се разграждат по-трудно или изобщо не се разграждат до пептиди с по-ниска молекулна маса по време на ферментация.



А



Б



В

Фигура 14. (А-В) Пептидни профили получени при култивиране на щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 в хранителна среда 5% Соев протеин в присъствие на 2% Глюкоза

А. 5% Соев протеин + 2% Глюкоза, неинокулирана среда; Б. h70 култивиран в 5% Соев протеин+2% Глюкоза; В. b244 култивиран в 5% Соев протеин + 2% Глюкоза.

5.3 Заключение

След проведените изследвания за SDS-PAGE електрофореза и UHPLC-MS анализа се доказа, че пептидни фракции на нискомолекулни пептиди бяха установени при култивиране на щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244 в растителна хранителна среда с грахов протеин. Комбинираните хранителни среди съдържащи млечни и растителни протеини оказаха синергичен ефект и допринесоха за появата на нови пептидни фракции след ферментация с щамове *L. helveticus* h70 и *L. helveticus* b244.

ИЗВОДИ

1. При провеждане на първоначален скрининг на 50 щама лактобацили, спадащи към четири вида *Lactobacillus delbr. ssp. bulgaricus* (30), *Lactobacillus helveticus* (11), *Lacticaseibacillus casei* (4) и *Lactiplantibacillus plantarum* (5) при култивиране на хранителна среда с 10% сухо обезмаслено се селектираха с най-висока протеолитична активност щамове *Lactobacillus helveticus* АВ, *Lactobacillus helveticus* h25, *Lactobacillus helveticus* h48, *Lactobacillus helveticus* h70, *Lactobacillus helveticus* b244 и *Lacticaseibacillus casei* c1. При култивиране на хранителна среда 5% грахов протеин в присъствие на 2 % глюкоза и 5% соев протеин в присъствие на 2 % глюкоза се селектираха с най-висока протеолитична активност щамове *Lactobacillus helveticus* h70 и *Lactobacillus helveticus* b244.
2. Установи се, че граховият протеинов хидролизат, соевият протеинов хидролизат и суроватъчният протеин WP 80 в най-висока степен активират протеолитичната система при селектираните щамове лактобацили. Щамове *Lactobacillus helveticus* b244 и *Lactobacillus helveticus* h70 показаха най-висока специфична протеолитична активност в диапазона на 16,85 U/mg протеин – 57,29 U/mg протеин и 10,61 U/mg протеин – 64,96 U/mg протеин.
3. Доказана е щамово-специфична аминопептидазна активност при изследване на четири аминопептидази – левцин-аминопептидаза, лизин-аминопептидаза, аргинин –аминопептидаза и пролин-аминопептидаза от селектираните щамове лактобацили. Щам *Lactobacillus helveticus* h25 показва най-високи специфични левцин и лизин аминопептидазни активности съответно 696,76 U/mg протеин и 816,20 U/mg протеин. Аргинин и пролин аминопептидазни активности бяха установени при култивиране на щамове *Lactobacillus helveticus* в хранителна среда 10% сухо обезмаслено мляко и хранителна среда mMRS с 1% грахов протеинов хидролизат. Щам *Lactobacillus helveticus* h48 показва най-високи специфични аргинин и пролин аминопептидазни активности в изследваните хранителни среди, равняващи се на 4,43 U/mg протеин и 3,84 U/mg протеин.
4. Доказано е, че щам *Lactobacillus helveticus* b244 показва най-висока АСЕ-инхибиторна активност при култивиране на хранителна растителна среда със соев протеин и грахов протеин. Допълнително се установи АСЕ-инхибиторна активност при култивиране на комбинирани хранителни среди съдържащи млечен и растителен протеин (грахов и соев протеин) при щамове *Lactobacillus helveticus* h70 и *Lactobacillus helveticus* b244. Най-висока АСЕ-инхибиторна активност беше получена в изцяло растителна хранителна среда съдържаща 5 % соев протеин и 2% глюкоза. Щам *Lactobacillus helveticus* b244 показва най-високи стойности на АСЕ-инхибиторна активност във всички тествани среди, равняваща се на 75,5 U/mg протеин.
5. След проведената SDS-PAGE трис-трицинова електрофореза се установи, че избраните щамове *Lactobacillus helveticus* h70 и *Lactobacillus helveticus* b244

активно хидролизират не само млечните протеини, но и протеиновите фракции в хранителни среди съдържащи растителни протеини. Електрофоретичният анализ потвърди, че когато щамове *Lactobacillus helveticus* h70 и *Lactobacillus helveticus* b244 се култивират в хранителна среда с грахов протеин присъстват нискомолекулни пептиди < 6,5 kDa.

6. Доказано е, че след проведена ултрависокоефективна течна хроматография с масспектрометрия (UHPLC-MS) пептидни фракции на нискомолекулни пептиди са установени при култивиране на щамове *Lactobacillus helveticus* h70 и *Lactobacillus helveticus* b244 в растителна хранителна среда с грахов протеин.
7. Комбинираните хранителни среди съдържащи млечни и растителни протеини (грахов и соев протеин) оказаха синергичен ефект и допринесоха за появата на нови пептидни фракции след ферментация с щамове *Lactobacillus helveticus* h70 и *Lactobacillus helveticus* b244.

ПРИНОСИ

1. Доказа се, че граховият протеинов хидролизат, соевият протеинов хидролизат и суроватъчният протеин WP 80 се явяват щамово-специфични активатори на специфична протеолитична активност при селектираните щамове.
2. Доказа се получаването на биоактивни пептиди с ACE-инхибиторна активност при култивиране на избрани щамове лактобацили на хранителни среди, съдържащи грахов и соев протеин.
3. За първи път са формулирани две нови растителни хранителни среди съдържащи грахов и соев протеин, подходящи за култивиране на избрани щамове лактобацили, които са лесно приложими в производствения процес.
4. За първи път са формулирани комбинирани хранителни среди с млечни и растителни протеини (грахов и соев протеин) за получаване на биологично-активни пептиди.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Панайотова, Т.М.**, Urshev, Z.L. and Iliev, I.N., 2023. Specific protease-and aminopeptidase activity of potential bioactive peptide-producing lactobacilli in media with plant protein hydrolysates. BULGARIAN CHEMICAL COMMUNICATIONS, p.57. DOI: 10.34049/bcc.55.C.0006 (Q4)
2. **Панайотова, Т.**, Urshev, Z., Angelova, S. and Iliev, I., 2024. Proteolytic activity of different lactic acid bacteria species cultivated on media with plant proteins. Acta Microbiologica Bulgarica, 40 (4), pp.520-525. <https://doi.org/10.59393/amb24400412> (Q4)
3. **Панайотова, Т.**, Urshev, Z., Yordanova, K. and Iliev, I., 2025. Proteolysis and Peptide Formation from Pea and Soy Protein by Two *Lactobacillus helveticus* Strains. Acta Microbiologica Bulgarica, 41 (2), pp.239-243. <https://doi.org/10.59393/amb25410213> (Q4)

ЛИТЕРАТУРА

Пълният литературен обзор, както и списък с цитираните литературни източници може да бъде намерен в дисертационния труд.