

ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ МОЛОКА ФЕРМЕНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

РУП «Институт мясо-молочной промышленности»,

**Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*



Головач Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории прикладных биотехнологий и детского питания отдела биотехнологий РУП «Институт мясо-молочной промышленности». *e-mail: tatsiana999@tut.by*

Научные интересы связаны с разработкой технологии получения ферментативного гидролизата белков молока для продуктов специализированного и детского питания, питательных сред микробиологического назначения; изучением протеолитической активности промышленно-ценных молочнокислых бактерий.



***Курченко Владимир Петрович**, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией прикладных проблем биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета *e-mail: kurchenko@tut.by*

Среди научных интересов большое место занимают исследования по биотехнологии получения функциональных продуктов питания

Сокращения

Lb. – *Lactobacillus*.

Lc. – *Lactococcus*.

mr – молекулярная масса, кДа.

Str. – *Streptococcus*.

α -ла – α -лактальбумин.

β -лг – β -лактоглобулин.

АГ – антигенность.

БСА – бычий сывороточный альбумин.

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

ИФА – иммуноферментный анализ.

КСБ – концентрат сывороточных белков.

М.д. – массовая доля.

МКБ – молочнокислые бактерии.

Отн. ед. – относительная единица.

ПА – протеолитическая активность.

ПКС – протеиназа клеточной стенки.

Введение

Молоко является важным продуктом питания для населения различных возрастных групп. Наряду с высокой питательной ценностью белкового компонента молока, в нем содержится более 20 аллергенов [1], среди которых основными являются казеин и сывороточные белки: β -лактоглобулин (рисунок 1), α -лактальбумин и бычий сывороточный альбумин [2, 3]. По последним данным до 10% детей раннего возраста страдают пищевой аллергией [4]. Увеличение случаев заболеваемости связывают с экологическими факторами и изменениями в рационе питания [5]. Разработка специализированных гипоаллергенных продуктов – проблема, актуальная для пищевой промышленности и здравоохранения.

Ферментативный гидролиз белкового компонента молока (протеолиз) направлен на получение продуктов с низким аллергенным потенциалом и высокой питательной ценностью [3] (рисунок 2). Положительный физиологический эффект при потреблении гидролизованных белков достигается за счет лучшего усвоения короткоцепочечных пептидов в кишечном тракте по сравнению с нативными белками и аминокислотами [6]. Получение биологически активных пептидов, в частности, с гипотензивным, антимикробным, иммуностимулирующим, антифунгальным и др. эффектами, представляет особый интерес для пищевой и фармацевтической промышленности [1] (рисунок 2).

В настоящее время применение гидролизатов востребовано, главным образом, в качестве компонента молочных смесей для детского питания профилактического и лечебного назначения [7, 8]. В Республике Беларусь гидролизаты белков молока не изготавливаются, а потребность в них при производстве специализированных продуктов для питания детей раннего возраста обеспечивается за счет импорта.

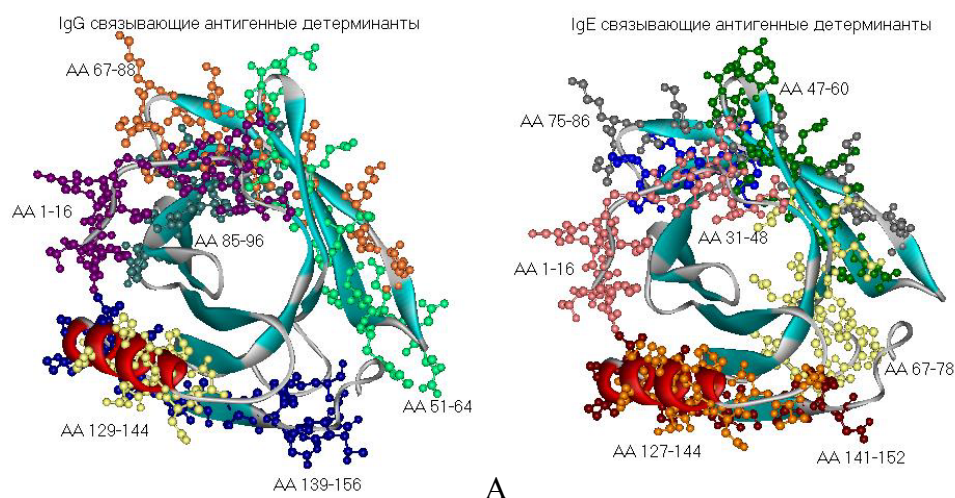


Рисунок 1 – Согласно К.-М. Järvinen et al. (2001) [9] в молекуле β -лактоглобулина выявлены 7 IgE и 6 IgG связывающих антигенных детерминант

Основными характеристиками ферментативных гидролизатов являются степень гидролиза белковых субстратов, пептидный состав и остаточная антигенность – количество нерасщепленного белка, сохраняющего способность взаимодействовать с антителами [5]. Согласно степени гидролиза выделяют частичные гидролизаты, содержащие пептиды различной длины и минимальное количество свободных аминокислот, и глубокие гидролизаты, представленные короткоцепочечными пептидами и аминокислотами. Остаточная АГ частичных гидролизатов, используемых в смесях профилактического назначения, составляет 10^{-3} относительных единиц (отн. ед.) и более, тогда как глубоких гидролизатов, являющихся компонентом продуктов лечебного питания, – 10^{-6} – 10^{-4} отн. ед., или в 10^4 – 10^6 раз меньше антигенности нативных белков [10, 11]. При тяжелых случаях пищевой аллергии применяют исключительно аминокислоты, не обладающие антигенными свойствами [12]. Существенным недостатком глубоких гидролизатов и смесей аминокислот является их выраженный горький вкус. Вместе с тем, их вносят в качестве источника азота в микробиологические питательные среды. Перспективным представляется использование частичных гидролизатов с приемлемыми органолептическими показателями в клиническом, геродиетическом и спортивном питании.

Сложность получения частичных гидролизатов связана с выбором высокоактивных ферментов для эффективного расщепления белков молока: в частности, β -лг, α -ла и БСА, – для которых характерна компактная глобулярная структура, определяющая относительную устойчивость к протеолизу [1]. Увеличение степени гидролиза сывороточных белков, выхода пептидной фракции и понижение ее антигенных свойств достигается установлением

оптимальных условий предварительной тепловой обработки белковых субстратов и ферментативного гидролиза.

Актуальность исследований обусловлена необходимостью усовершенствования технологий изготовления частичных гидролизатов с заданными физико-химическими и иммунохимическими свойствами. Экспериментальные данные по оптимизации условий термообработки и ферментативного гидролиза белков молока являются основой создания промышленной биотехнологии получения частичных гидролизатов и организации производства продуктов специального назначения с их использованием.

Вместе с тем, протеолиз является важным биохимическим процессом при получении различных ферментированных продуктов [13] (рисунок 2). Изучение физиолого-биохимических и промышленно ценных свойств молочнокислых бактерий (в частности, *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* и др.) является актуальным направлением исследований прикладной биотехнологии, что связано с широким применением микроорганизмов в различных отраслях пищевой промышленности, в частности: сыроделии [14], при изготовлении йогуртов [15] и заквасок [16].

Известно, что бактерии нуждаются в экзогенном источнике пептидов и аминокислот, которые образуются путем гидролиза казеина – основного белка молока. Использование казеина инициируется в результате его расщепления бактериальной протеазой, связанной с клеточной стенкой. Образовавшиеся олигопептиды поглощаются посредством специфического пептидного транспорта и в дальнейшем под действием различных внутриклеточных пептидаз расщепляются на короткоцепочечные пептиды и аминокислоты [17, 18]. Кроме того, при ферментации казеина некоторыми МКБ образуются биологически активные пептиды, что является актуальным при разработке продуктов функциональной направленности (таблица 1). Так пептидный и аминокислотный профиль гидролизованного белка молока определяет биологически активные и органолептические свойства ферментированных продуктов.

Таблица 1 – Биологические активности белков и пептидов молока [19, 20]

Эффект	Активная субстанция / эффектор
Опиоидный антагонист	лактоферроксины
Опиоидный агонист	α -лакторфины, β -лакторфины
Антимикробный	лактоферрин, лактоферрицин
Иммуномодулирующий	иммунопептиды, н.п. иммуноказокинин
Гипотензивный	лактокинины, казокинины
Антиоксидантный	пептиды α -ла и β -лг, н.п.: Met-His-Ile-Arg-Leu, Tyr-Val-Glu-Glu-Leu
Гипохолестеролемический	пептиды β -лг, н.п. Ile-Ile-Ala-Glu-Lys
Противотромбный	казоплателин
Связывание минералов	казеинофосфопептиды

Достигнуты значительные успехи в изучении свойств очищенных бактериальных протеаз, установлении механизмов их каталитического действия, особенностей расщепления отдельных белков казеиновой фракции и соответствующих пептидных карт [13, 21, 22].

В настоящее время целесообразным представляется, во-первых, исследование особенностей гидролиза казеина в поликомпонентной системе молока, являющегося основным сырьем при получении ферментированных продуктов; во-вторых, проведение эксперимента *in situ* (т.е. в связанном с клеточной стенкой состоянии). Практическая значимость данных об уровне протеолитической активности молочнокислых бактерий различных групп, влияния на нее различных факторов среды, субстратной специфичности микробных протеаз заключается в научно обоснованном подходе при подборе МКБ для получения ферментированных продуктов с заданными физико-химическими и органолептическими характеристиками.

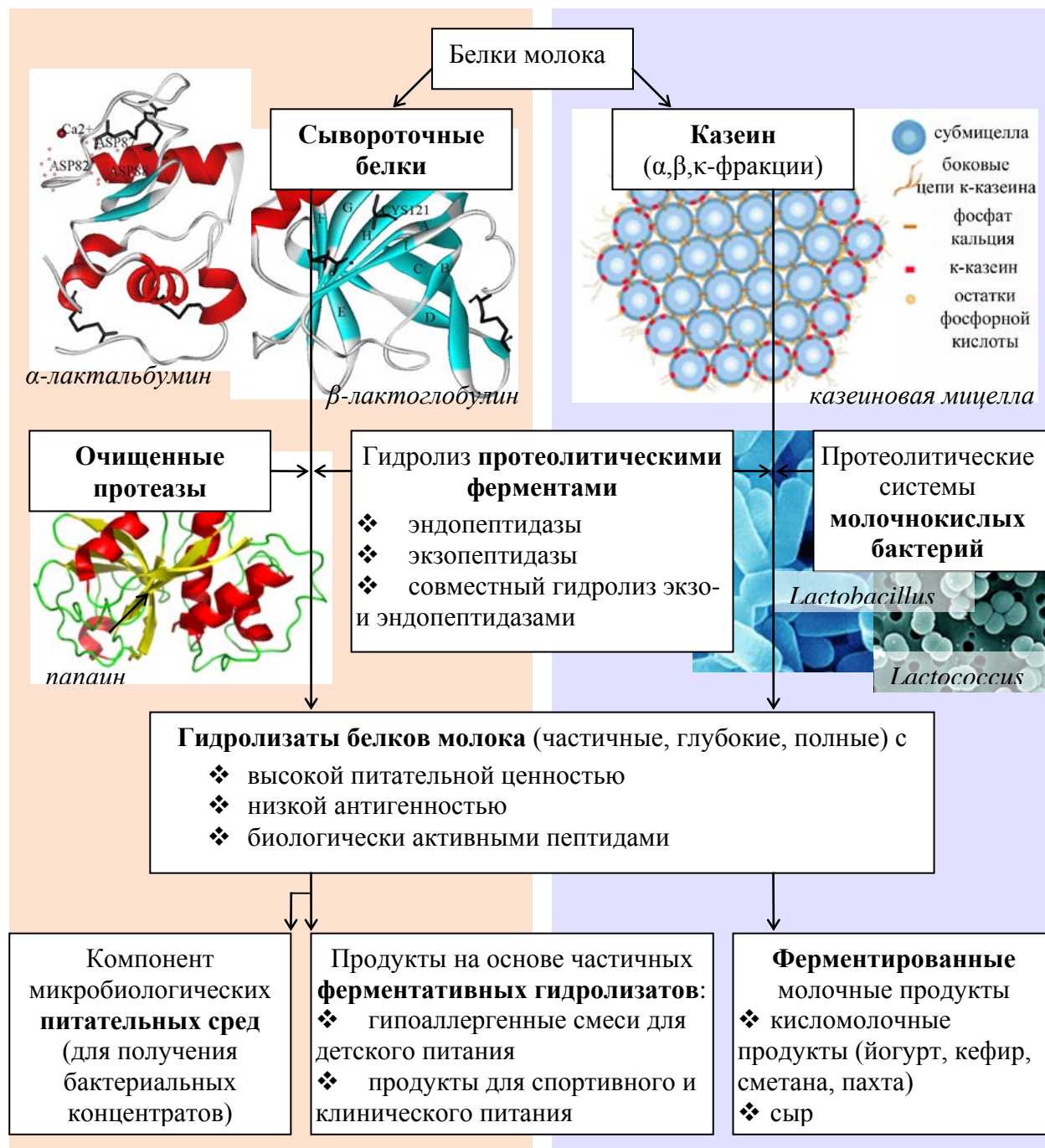


Рисунок 2 – Схема получения функциональных молочных продуктов и питательных сред на основе гидролизатов белков молока

I Ферментативные гидролизаты белков молока с низкой антигенностью для продуктов детского и специализированного питания

Оптимизация гидролиза белков молока различными протеазами. Расщепление белков-аллергенов осуществляют с использованием широкого спектра протеаз – ферментов класса гидролаз, катализирующих гидролитический разрыв пептидных связей. Среди них известны ферменты микробного (алкалаза, нейтраза, термолизин), животного (пепсин, трипсин, химо tripsин) и растительного (папаин, бромелаин, фицин) происхождения с различными механизмами каталитического действия. Изучение особенностей гидролиза белков молока специфическими протеазами, а также при совместном их воздействии направлено на установление оптимальных параметров получения *частичного гидролизата с заданным пептидным составом, а также иммунохимическими свойствами как компонента продуктов специализированного питания* [3, 5].

Согласно исследованиям по оптимизации условий гидролиза основных сывороточных белков сериновыми (алкалаза и трипсин), аспарагиновой (пепсин) и цистеиновой (папаин) протеазами, металлопротеазами (термолизин, нейтраза), комплексными ферментными препаратами (флейворзим, протосубтилин) представлена сравнительная характеристика соответствующих частичных гидролизатов (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика частичных гидролизатов сывороточных белков, полученных с применением различных протеаз в оптимизированных условиях [23, 24]

Фермент, используемый для получения частичного гидролизата	Количество расщепленных белков в гидролизате, %			Массовая доля фракции с $m_r \leq 10$ кДа ³ , %	Соотношение α -аминного и общего азота ³ , AN/TN, %	Остаточная АГ ультрафильтрата гидролизата, 10 ⁻³ отн. ед.
	β -лг	α -ла	БСА			
Пепсин ¹	0	100	100	46,1±1,8	12,7±1,3	0,058±0,005
Папаин ¹	61,6±4,9	30,0±4,5	0	51,9±0,6	13,7±1,0	8,06±0,51
Термолизин ¹	100	100	0	97,0±1,3	23,3±0,6	2,11±0,02
Нейтраза ¹	77,9±3,9	29,8±3,6	0	48,0±1,9	16,8±0,8	7,85±0,46
Трипсин ¹	100	100	0	92,4±1,5	18,2±0,6	3,66±0,13
Алкалаза ¹	100	100	0	93,0±0,6	17,8±1,0	4,88±0,08
<i>Трипсин и алкалаза¹</i>	<i>100</i>	<i>100</i>	<i>0</i>	<i>93,2±2,0</i>	<i>22,0±1,3*</i>	<i>0,38±0,03*</i>
Протосубтилин ²	96,9±2,4	71,9±3,2	0	52,8±3,1	15,1±1,1	4,66±0,38
Флейворзим ²	74,7±3,0	62,6±2,9	0	36,8±1,2	22,0±1,0	9,19±0,64

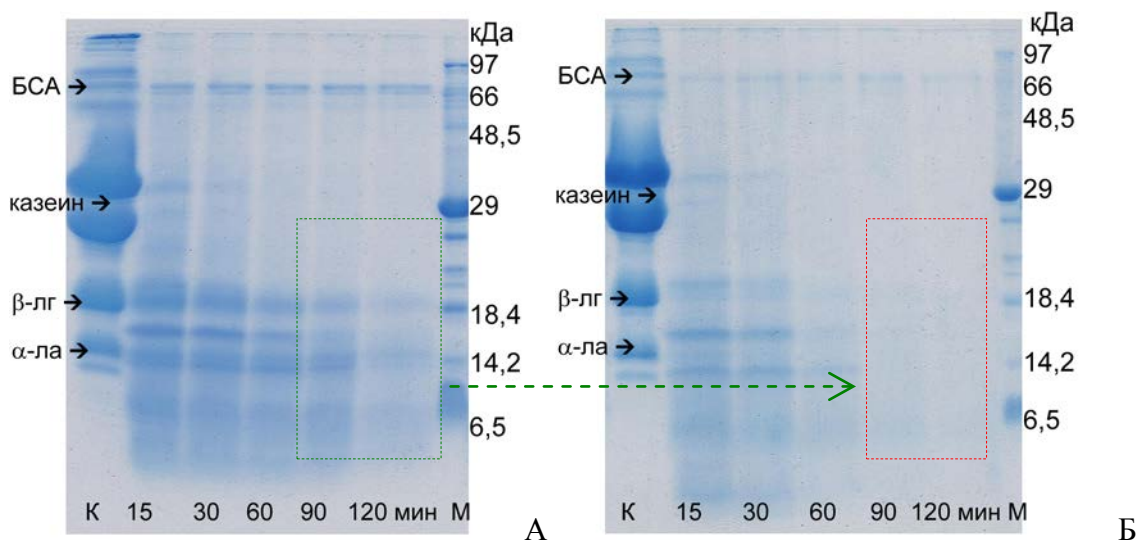
Примечание: ¹ – данные по количеству расщепленных сывороточных белков в гидролизатах получены согласно электрофореза в нативных условиях и ² – в соответствии с результатами ВЭЖХ; ³ – содержание белка в гидролизатах и ультрафильтратах определяли по ГОСТ 30648.2–99, α -аминный азот – по ГОСТ 13805–76 (п. 3.9); * – статистически достоверные различия по отношению к данным для трипсина, алкалазы ($p < 0,05$; $n = 3$).

Для исследуемых протеаз показана различная субстратная специфичность по отношению к β -лг, α -ла и БСА. Так β -лг устойчив к гидролизу пепсином при активной кислотности среды pH 2. В то же время папаин, термолизин, нейтраза, трипсин, алкалаза и протосубтилин эффективно расщепляют данный белковый субстрат в нейтральных и щелочных средах. Для пепсина, термолизина, трипсина, алкалазы и протосубтилина установлен протеолиз α -ла в оптимизированных условиях. В случае БСА показана исключительная устойчивость в нейтральных и щелочных средах к расщеплению различными эндопептидазами: трипсином, алкалазой, нейтрозой, термолизином, протосубтилином и папаином. Лишь ультрафильтрация гидролизатов и пепсиновый протеолиз позволили удалить БСА, что обуславливает необходимость определения альтернативного пути увеличения биодоступности данного белка. Для комплексного препарата (флейворзима) в оптимизированных условиях характерна экзопептидазная активность. Его внесение совместно с эндопептидазами необходимо для повышения выхода короткоцепочечных пептидов и аминокислот. Кроме того, степень гидролиза (AN/TN)

белков молочной сыворотки при использовании ряда эндопептидаз убывает в последовательности: термолизин, трипсин, алкалаза, нейтраз, протосубтилин, папаин, пепсин (таблица 2), – что обусловлено субстратной и сайт-специфичностью ферментов и особенностями конформации β -лг, α -ла и БСА при изучаемых параметрах среды [23, 24].

Предпочтительным для гидролиза β -лг и α -ла термолизином является рН 8, а максимальная степень протеолиза показана при 70°C. В образцах КСБ, расщепленного термолизином, выявлены наибольший выход фракции с молекулярной массой (m_r) ≤ 10 кДа – $(97,0 \pm 1,3)\%$; остаточная АГ ультрафильтрата составила $(2,11 \pm 0,02) \times 10^{-3}$ отн. ед. В то же время установлена высокая эффективность гидролиза сывороточных белков при использовании трипсина или алкалазы. Показано, что в смеси сывороточных белков они преимущественно расщепляют β -лг. В полученных частичных гидролизатах (таблица 2) содержится 90,9–95,2% фракции с $m_r \leq 10$ кДа; антигенные свойства ультрафильтратов гидролизатов понижаются до $(3,53–4,96) \times 10^{-3}$ отн. ед. Совместное воздействие данных протеаз приводит к существенному уменьшению остаточной АГ до $(0,38 \pm 0,03) \times 10^{-3}$ отн. ед. в результате наиболее полного гидролиза пептидных связей (таблица 2). Таким образом, экспериментально обоснованным является выбор термолизина, трипсина и алкалазы для получения белкового компонента с низким антигенным потенциалом (т.е. в ≥ 1000 раз меньше антигенности нативных сывороточных белков) [23–28].

В микробиологии и биотехнологии гидролизаты вносят в **питательные среды для культивирования микроорганизмов**. Основным показателем питательной ценности среды является содержание α -аминного азота. Исследовательская работа в данном направлении связана с определением подходов, позволяющих увеличить выход свободных аминокислот и короткоцепочечных пептидов, которые непосредственно усваиваются бактериальной клеткой [13]. При изучении особенностей гидролиза белков молока установлено, что казеин активно расщепляется эндопептидазами: алкалазой и нейтразой [30]. Совместное внесение экзо- и эндопептидаз позволяет увеличить эффективность протеолиза за счет образования под действием алкалазы или нейтразы промежуточных пептидов, которые служат субстратом для экзопептидазы (новозима), что приводит к возрастанию доли α -аминного азота с 55–58 до 68,4–74,4 мг% наряду с уменьшением временных затрат (рисунок 3) [30–31].



К – контроль (субстрат без фермента), М – маркер

Рисунок 3 – ДСН-электрофореграмма гидролизатов белков молока, полученных с использованием алкалазы (А), комплекса алкалазы и новозима (Б) при продолжительности ферментативной реакции 15–120 мин

Предложен способ получения гидролизата белков молока для микробиологических питательных сред [32], предполагающий комплексное использование экзо- и эндопептидаз,

что обеспечивает сокращение продолжительности протеолиза с 42 ч [33] до 2–3 ч и увеличение выхода α -аминного азота на 10,4–19,4 мг%.

Комплексное использование тепловой обработки и протеолиза для получения частичных гидролизатов сывороточных белков. Известно, что сохранение третичной структуры является неотъемлемым фактором проявления иммунореактивности нативными белками молока [34]. Различные технологические процессы переработки молочного сырья: **нагревание, высокое давление, ферментативный гидролиз** и др. – могут изменить **аллергенный потенциал продуктов питания** [35]. Это обеспечивается конформационными переходами в белковых молекулах, приводящих к экспонированию, разрушению или ограничению доступа к антигенным эпитопам, а также изменением перевариваемости денатурированных субстратов. В связи с этим сочетание термообработки и протеолиза представляется перспективным путем снижения антигенных свойств белков молока [36]. Так, например, детально изучен процесс денатурации β -лг А в температурном диапазоне 37–80°C [37]. Согласно ЯМР-исследованиям разворачивание структуры β -лг приводит к необратимой денатурации β -складчатых структур (А–I) в следующем порядке: D–E структуры (55–60°C); C–D и α -спирали (60–65°C); A–B, A–I и E–F (65–70°C); A–H, B–C, и F–G (75–80°C). При температуре 80°C происходит практически полное разворачивание молекулы β -лг, исключая G–H пару (рисунок 1.10), связанную дисульфидным мостиком.

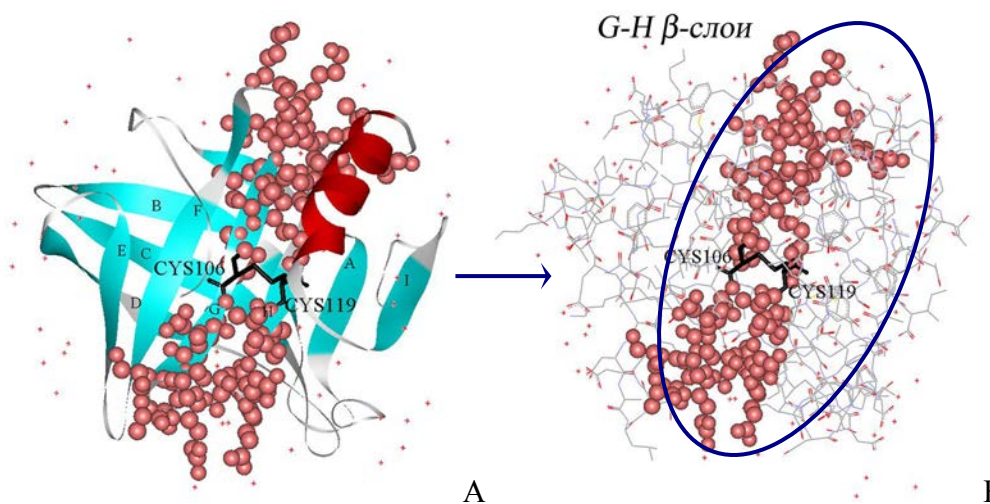


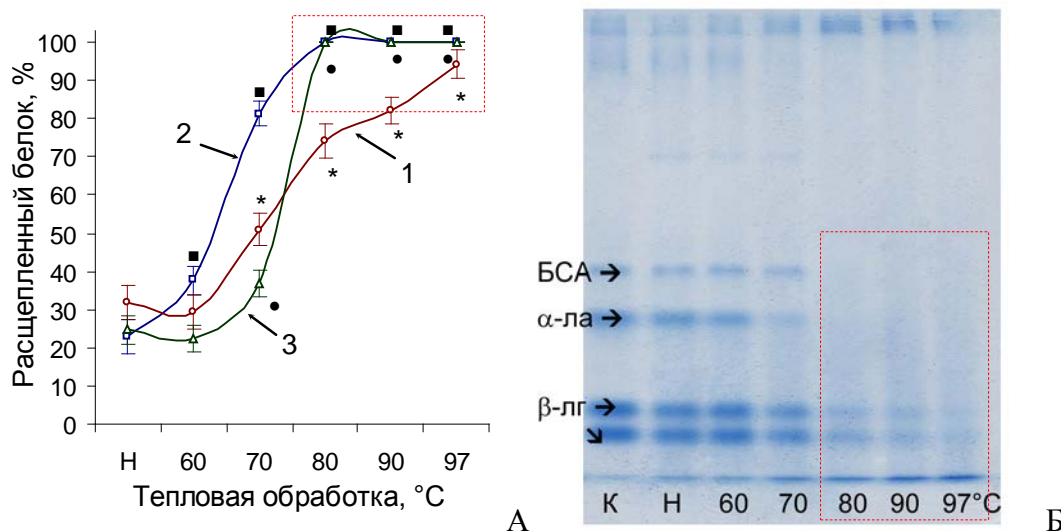
Рисунок 4 – Сохранение G–H β -складчатых слоев после тепловой обработки 80°C: нативный (А) и термообработанный β -лг (Б) [109]

Наряду со значительными успехами, достигнутыми в определении механизмов действия биологических катализаторов, установлении структуры и биологических свойств нативных и термоденатурированных белков молока, характеристике продуктов их протеолиза, некоторые аспекты ферментативного гидролиза изучены недостаточно. Главным образом, это касается основных сывороточных белков, для которых характерна компактная глобулярная структура, определяющая относительную устойчивость к протеолизу [1]. Целесообразным представляется детальное исследование субстратной специфичности пептидаз по отношению к **нативным и денатурированным β -лг, α -ла и БСА** в составе молочной сыворотки; а также определение высокоактивных ферментов и параметров гидролиза, обеспечивающих эффективное расщепление сывороточных белков [23–28].

Показана необходимость сравнительного анализа иммунохимических свойств нативных и термообработанных β -лг, α -ла и БСА как в моно-, так и в поликомпонентной системе молочной сыворотки для определения оптимальных условий предварительной тепловой обработки, направленной на увеличение степени гидролиза белковых субстратов и понижение антигенных свойств продуктов протеолиза. В связи с этим растворы очищенных β -лг, α -ла и БСА, а также смеси сывороточных белков в составе КСБ инкубировали при 60–70–80–90–97°C (рН 8, 10 мин), затем подвергли гидролизу алкалазой. Методом двойной

радиальной иммунодиффузии установлено, что антигенные свойства термообработанного β -лг практически не изменяются, тогда как существенное снижение иммунореактивности α -ла показано после нагревания при $\geq 90^\circ\text{C}$, а БСА – при $\geq 80^\circ\text{C}$. В связи с этим **устойчивость белков-антигенов молочной сыворотки к термоденатурации, обусловленная способностью связывать специфические антитела, уменьшается в ряду β -лг \rightarrow α -ла \rightarrow БСА** [27]. Согласно данным электрофореза количество расщепленного β -лг составляет около 60% и возрастает до 90% в случае предварительной тепловой обработки субстрата при 97°C . Это связано с конформационными перестройками в белковой глобуле β -лг, приводящими к высвобождению ранее скрытых сайтов протеолиза. Уменьшение иммунореактивности показано для гидролизатов β -лг, подвергнутого нагреванию при 70 – 97°C . Кроме того, температурное воздействие на БСА ($\geq 70^\circ\text{C}$) и α -ла ($\geq 80^\circ\text{C}$) позволяет повысить количество расщепленного белка и получить гидролизат, не связывающий антитела против сывороточных альбуминов в реакции иммунодиффузии [27, 38].

Наряду с этим, в гидролизатах нативной и инкубированной при 60°C молочной сыворотки содержится 70% исходного β -лг. Термоденатурация при 70 – 80 – 97°C обеспечивает возрастание количества гидролизованного белка до 50 – 75 – 95% соответственно (рисунок 5А, кривая 1; Б). Существенное возрастание степени протеолиза α -ла отмечено после нагревания при $\geq 70^\circ\text{C}$, а БСА – при $\geq 80^\circ\text{C}$. Кроме того, в результате тепловой обработки при 80 – 90 – 97°C гидролизуется практически весь α -ла и БСА (рисунок 1А, кривые 2 и 3; Б) [23, 27, 39].

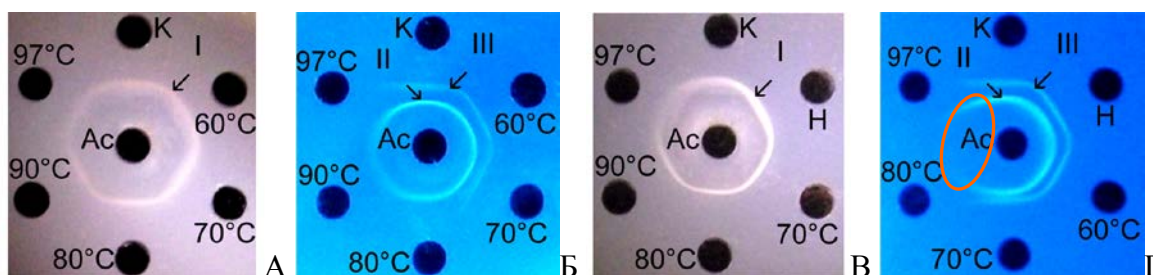


А – График зависимости степени протеолиза сывороточных белков: β -лг (кривая 1), α -ла (кривая 2) и БСА (кривая 3) – от температуры обработки; * – статистически достоверные различия по отношению к данным для Н при гидролизе β -лг, ■ – α -ла и • – БСА ($p < 0,05$; $n = 3$). Б – Электрофореграмма (в нативных условиях) продуктов гидролиза β -лг: К – контроль (КСБ без фермента), Н – гидролизат нативного КСБ, 60 – 97°C – гидролизат КСБ, термообработанного при 60 – 97°C

Рисунок 5 – Степень протеолиза алкалазой КСБ, подвергнутого предварительной тепловой обработке при 60 – 97°C

В реакции иммунодиффузии для образцов КСБ, термообработанных при $\geq 80^\circ\text{C}$, отмечено смещение линии преципитации комплекса $-\beta\text{-лг-At}$ – и уменьшение его количества (рисунок 6А: I). После нагревания β -лг при 97°C показано существенное уменьшение иммунореактивности продуктов его протеолиза алкалазой (рисунок 6Б: I) [38]. В то же время конформационные переходы в белках фракции сывороточных альбуминов, приводящие к понижению иммунореактивности, инициируются при $\geq 90^\circ\text{C}$ для α -ла и $\geq 80^\circ\text{C}$ в случае БСА (рисунок 6Б: II и III). Выявлено, что гидролизаты КСБ, подвергнутые предварительной обработке при 80 и 97°C , не способны взаимодействовать с антителами против сывороточных альбуминов (рисунок 6Г: II и III; выделено овалом) [39]. Отличия в

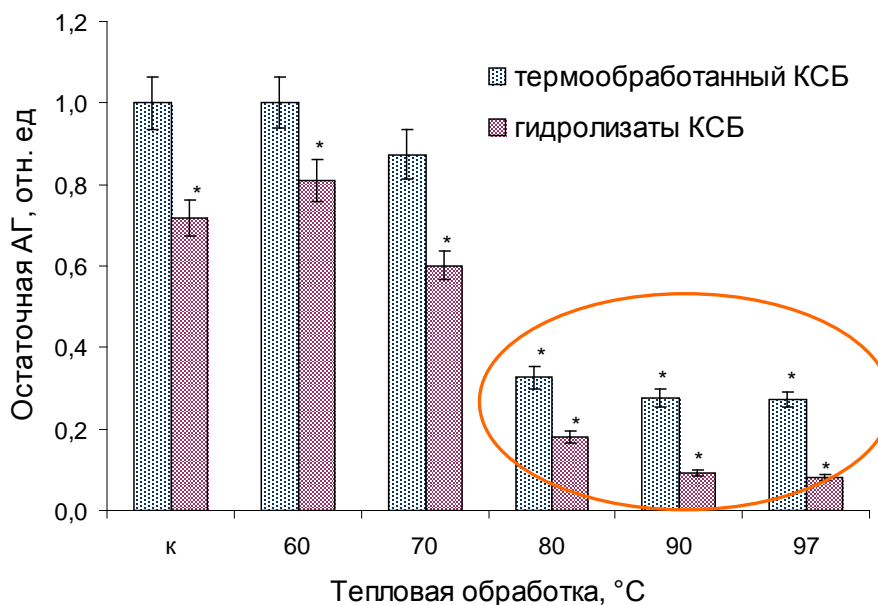
зависимостях, полученных при гидролизе очищенных сывороточных белков и КСБ, а также особенности антигенных свойств белков и их гидролизатов связаны с агрегационными процессами в составе термообработанной молочной сыворотки и субстратной специфичностью алкалазы.



А и Б: К – контроль (нативный КСБ), 60–97 – образцы КСБ, термообработанного при 60–97°C. В и Г: К – контроль (нативный КСБ), Н – гидролизат нативного КСБ, 60–97 – гидролизаты КСБ, термообработанного при 60–97°C. Ас – антисыворотка; I – линия преципитации комплекса $-\beta\text{-лг-Ат}-$; II – комплекса $-\alpha\text{-ла-Ат}-$; III – комплекса $-\text{БСА-Ат}-$

Рисунок 6 – Двойная радиальная иммунодиффузия в агарозном геле нативного и термообработанного КСБ (А и Б) и гидролизатов алкалазой (В и Г) с использованием антисыворотки против $\beta\text{-лг}$ (А и В) и сывороточных альбуминов (Б и Г)

Согласно данным ИФА нагревание при 80–90–97°C обуславливает уменьшение иммунореактивности КСБ до 67,4–72,8%. Остаточная АГ продуктов гидролиза нативных и термообработанных при 60 и 70°C сывороточных белков составляет около 71,8, 80,9 и 60,1% соответственно, а нагретого при $\geq 80^\circ\text{C}$ КСБ – понижается уже в 5,2–13,7 раза (рисунок 7) [23, 24, 39].



К – нативный КСБ и гидролизат нативного КСБ; 60–97°C – тепловая обработка КСБ при 60–97°C и гидролизаты термообработанного при 60–97°C КСБ; * – статистически достоверные различия по отношению к данным для контроля ($p < 0,05$; $n=3$)

Рисунок 7 – Конкурентный ИФА термообработанного КСБ и его гидролизатов алкалазой

Кроме того, в результате тепловой обработки при 80–90–97°C протеолизу подвергается практически весь $\alpha\text{-ла}$ и БСА (рисунок 5). Следовательно, существенное снижение антигенных свойств сывороточных белков в составе КСБ достигается путем комплексного использования тепловой обработки при $\geq 80^\circ\text{C}$ и последующего протеолиза. В связи с тем,

что β -лг и α -ла достаточно эффективно гидролизуются алкалазой (таблица 1), увеличение степени их протеолиза можно достичь за счет возрастания концентрации фермента, тогда как термоденатурация при 80°C является оптимальным необходимым условием для расщепления БСА [23, 39].

Предложена технологическая схема получения гидролизованного белкового компонента для продуктов специализированного питания (рисунок 8). Она предусматривает приготовление раствора КСБ, тепловую обработку субстрата (80°C , 10 мин, рН 8), подготовку и внесение протеазы (алкалазы), ферментативный гидролиз, инактивацию фермента и/или ультрафильтрацию гидролизата, сушку.

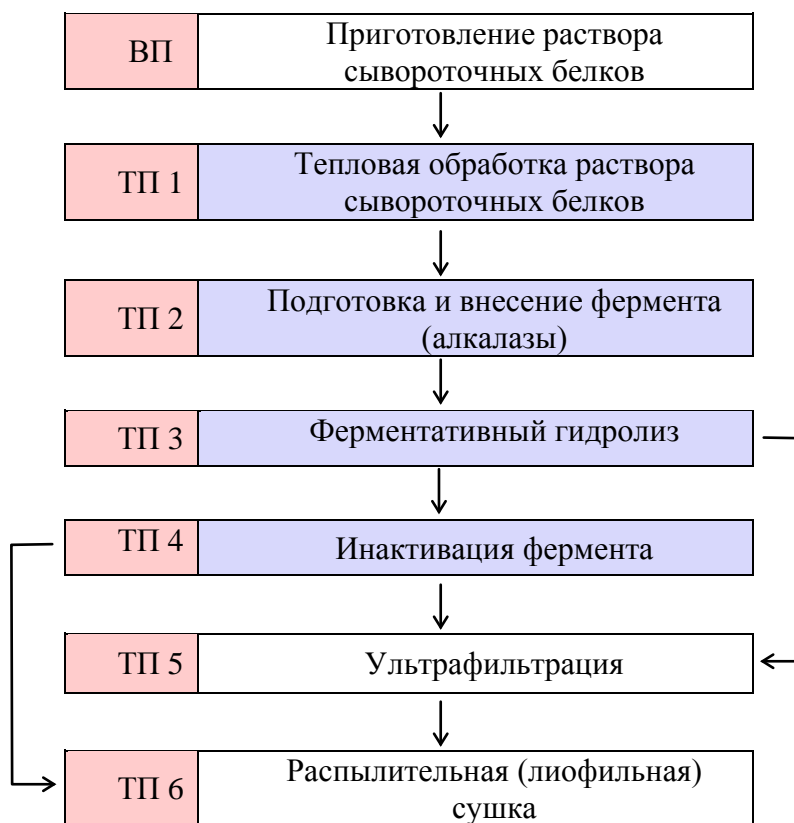
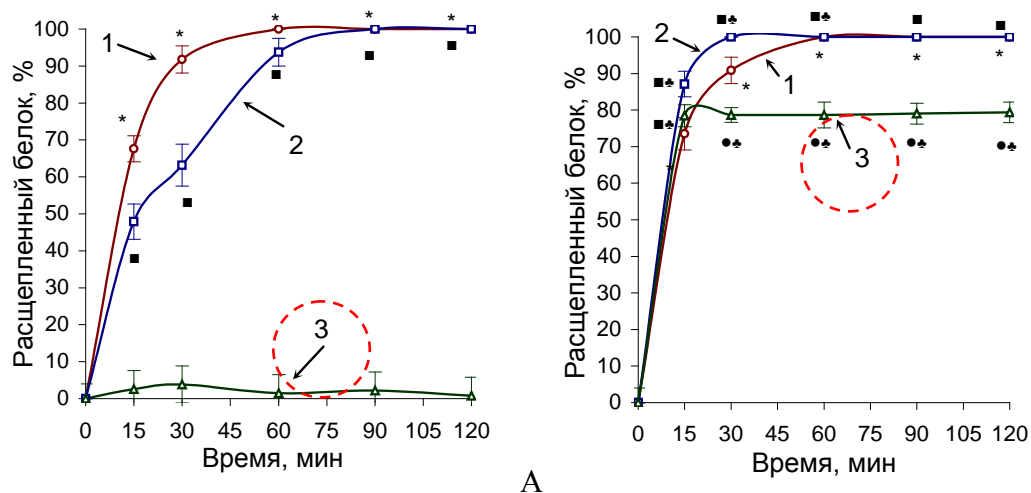


Рисунок 8 – Технологическая схема получения гидролизата сывороточных белков

Представлена сравнительная характеристика гидролизата термообработанного КСБ, полученного по данной технологической схеме, и гидролизата нативного КСБ [23, 39]. По результатам анализа электрофореграмм в гидролизате нативных сывороточных белков (120 мин) обнаруживаются лишь следовые количества β -лг и α -ла, а содержание БСА соответствует исходному (рисунок 9А). Предварительная тепловая обработка КСБ обеспечила расщепление на продукты промежуточного гидролиза около 80% БСА и достоверное возрастание степени протеолиза α -ла в ходе ферментативного процесса (рисунок 4Б). Установлено, что на долю фракции с $m_r \leq 3$ кДа приходится около $(88,7 \pm 0,6)\%$ белкового компонента гидролизата (таблица 3).

Термоденатурация сывороточных белков при 80°C (10 мин, рН 8) с последующим протеолизом алкалазой приводит к увеличению выхода фракции с $m_r \leq 10$ кДа на $3,7$ – $6,3\%$ и достоверному возрастанию степени гидролиза субстратов с $(17,8 \pm 1,0)\%$ до $(20,3 \pm 0,8)\%$.



А

Б

β -лг (кривая 1), α -ла (кривая 2) и БСА (кривая 3); * – статистически достоверные различия по отношению к данным для контроля (КСБ без фермента) при гидролизе β -лг, ■ – α -ла и • – БСА, ♣ – по отношению к данным для эксперимента с нативным КСБ ($p < 0,05$; $n = 3$)

Рисунок 9 – Графики зависимости количества расщепленных белков нативного КСБ (А) и термообработанного КСБ (Б) от продолжительности гидролиза алкалазой

По данным ИФА остаточная АГ ультрафильтрата гидролизата термообработанного КСБ (10 кДа) понижается в 20–25 раз по сравнению с продуктами протеолиза нативного КСБ. Не установлено ингибирование связывания специфических антител для ультрафильтрата, содержащего фракцию с $m_r \leq 3$ кДа (таблица 3). Кроме того, ультрафильтраты не образуют иммунные комплексы в реакции иммунодиффузии [23, 26, 39].

Таблица 3 – Характеристика гидролизатов нативного и термообработанного КСБ

Описание образца	Массовая доля общего белка по отношению к исходному гидролизату, %	Распределение продуктов гидролиза по m_r (кДа), % / остаточная АГ ультрафильтратов, 10^{-3} отн. ед.
Гидролизат <u>нативного</u> КСБ	100	$m_r > 10$ – 6,4–7,6 / 4,88±0,08
Ультрафильтрат гидролизата, 10 кДа	93,0±0,6	
Гидролизат термообработанного КСБ	100	$m_r > 30$ – 0–0,8
Ультрафильтрат гидролизата, 30 кДа	99,6±0,4	$30 \geq m_r > 10$ – 0,5–2,7 / 4,15±0,32
Ультрафильтрат гидролизата, 10 кДа	98,0±0,7*	$10 \geq m_r > 3$ – 8,0–10,6 / 0,22±0,02*
Ультрафильтрат гидролизата, 3 кДа	88,7±0,6	$m_r \leq 3$ – 88,1–89,3 / н/о

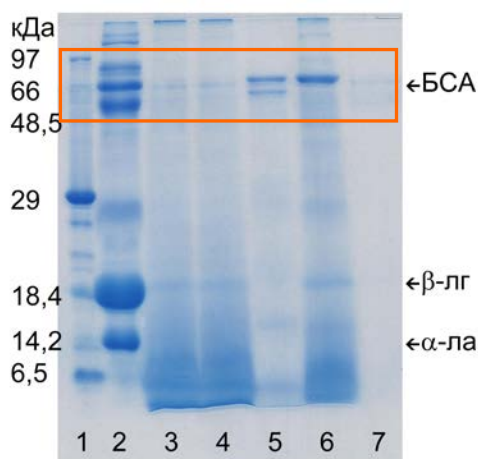
Примечание: * – статистически достоверные различия по отношению к данным для ультрафильтрата гидролизата нативного КСБ ($p < 0,05$; $n = 3$); н/о – ингибирование связывания метки в ИФА не установлено

В соответствии с известным способом получения гидролизата сывороточных белков со средней степенью гидролиза [40] содержание компонента с $m_r \geq 11,2$ кДа в неочищенном гидролизате нативных белков составляет около 15,2%, а после ультрафильтрации (20 кДа) понижается до 2,6–3,2%. Напротив, в неочищенных гидролизатах нативного и денатурированного КСБ обнаружено до 7,6 и 2,7% фракции с $m_r > 10$ кДа (таблица 3), что является преимуществом перед исходным гидролизатом нативных белков и сопоставимо с его ультрафильтратом соответственно [40]. Согласно экспериментальным данным на долю фракции с $m_r \leq 3$ кДа приходится около (88,7±0,6)% белкового компонента гидролизата термообработанного КСБ. Наряду с этим в частичном гидролизате [41] количество

указанной фракции достигает лишь 77,3%. Очевидно, нагревание сывороточных белков в предложенных условиях: в частности, при 75°C (30 мин) или 85°C (10 мин) при pH 7,5 – и гидролиз трипсином и химотрипсином не обеспечивают достижение результата, полученного по представленной технологической схеме (рисунок 8). Отличия обусловлены, во-первых, использованием высокоактивной эндопептидазы (алкалазы). Во-вторых, установлены оптимальные условия предварительной тепловой обработки β -лг, α -ла и БСА в составе молочной сыворотки, что обеспечивает эффективный гидролиз непосредственно указанной протеазой. Таким образом, **новый способ получения частичного ферментативного гидролизата сывороточных белков** отличается от аналогов, наиболее близких по техническому решению, применением предварительной тепловой обработки белкового субстрата в оптимизированных условиях и последующим гидролизом алкалазой; предназначен для изготовления частичных гидролизатов как компонента продуктов специализированного питания.

Сравнительная характеристика частичных гидролизатов сывороточных белков.

Согласно разработанному способу изготовлены опытные образцы частичных ферментативных гидролизатов. Технологическая схема их получения предусматривала приготовление раствора сывороточных белков, предварительную тепловую обработку субстрата в оптимизированных условиях, внесение фермента, протеолиз, термоинактивацию фермента, сушку (распылительную и лиофильную) жидкого гидролизата. По результатам сравнительного исследования физико-химических свойств опытных образцов и импортных аналогов установлено, что наибольшая степень гидролиза (AN/TN) характерна для образца «PRODIET GF 006» (Ingredia, Франция) – (22,5±2,5)%. Однако по данным ДСН-электрофореза в нем обнаружена фракция сывороточных альбуминов. В образце «Nilmar 8360» (Nilmar, США) с соотношением α -аминного азота к общему 12,5% также содержится БСА (рисунок 10, дорожки 5 и 6, в рамке). В разработанном гидролизате практически не выявляются сывороточные белки (рисунок 10, дорожки 3 и 4), а степень гидролиза составляет (15,5±0,6)%. Указанные образцы являются частичными ферментативными гидролизатами [23, 26, 42].

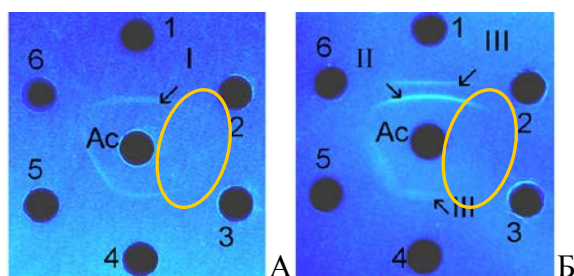


1 – маркер; 2 – контроль КСБ; 3 – образец гидролизата, полученный распылительной сушкой, и 4 – образец гидролизата, полученный лиофильной сушкой (БГУ, РФ); 5 – «PRODIET GF 006»; 6 – «Nilmar 8350»; 7 – гидролизат белков молочной сыворотки (ЗАО «Биопрогресс», РФ). Образцы уравнированы по белку

Рисунок 10 – ДСН-электрофореграмма гидролизатов сывороточных белков

В гидролизате белков молочной сыворотки (ЗАО «Биопрогресс», РФ) пептидная фракция не обнаружена (рисунок 10, дорожка 7); вместе с тем, на этой же дорожке отмечено наличие следового количества БСА. В связи с этим указанный образец относится к глубоким гидролизатам.

Минимальное ингибирование связывания антител в конкурентном ИФА показано для образца «PRODIET GF 006» – $(0,84 \pm 0,04) \times 10^{-3}$ отн. ед., тогда как максимальное значение характерно для «Hilmar 8350» – $(52,9 \pm 2,0) \times 10^{-3}$ отн. ед. В то же время остаточная АГ образцов, полученных распылительной и лиофильной сушкой, составляет $(1,22 \pm 0,07) \times 10^{-3}$ и $(0,96 \pm 0,05) \times 10^{-3}$ отн. ед. соответственно, что 1,3 раза больше, чем у «PRODIET GF 006», и в 48 раз меньше по сравнению с «Hilmar 8350». Для глубокого гидролизата (ЗАО «Биопрогресс», РФ) ингибирование связывания антител не установлено. Полученные данные обусловлены различной степенью гидролиза образцов и согласуются с результатами ДСН-электрофореза (рисунок 10). В результате качественного анализа антигенности в реакции иммунопреципитации для гидролизатов «PRODIET GF 006» и «Hilmar 8350» показана способность к образованию иммунных комплексов с антителами против β -лг и сывороточных альбуминов (рисунок 11: 4 и 5). В образцах опытных гидролизатов и глубоком гидролизате производства ЗАО «Биопрогресс» (РФ) бивалентные антигенные детерминанты не обнаружены (рисунок 11: 2, 3 и 6). Иммунореактивность гидролизатов «PRODIET GF 006» и «Hilmar 8350» связана как с остаточным количеством сывороточных белков (рисунок 10), так и с наличием продуктов протеолиза, содержащих бивалентные антигенные детерминанты [23, 42].



1 – КСБ; 2 и 3 – гидролизаты, полученные лиофильной и распылительной сушкой соответственно (БГУ, РФ); 4 – «PRODIET GF 006»; 5 – «Hilmar 8350»; 6 – гидролизат белков молочной сыворотки (ЗАО «Биопрогресс», РФ); Ac – антисыворотка; I – линия преципитации комплекса $[\beta\text{-лг-Ат}]$, II – $[\alpha\text{-ла-Ат}]$, III – $[\text{БСА-Ат}]$ –

Рисунок 11 – Двойная радиальная иммунодиффузия в агарозном геле гидролизатов сывороточных белков с использованием антисыворотки против β -лг (А), α -ла и БСА (Б)

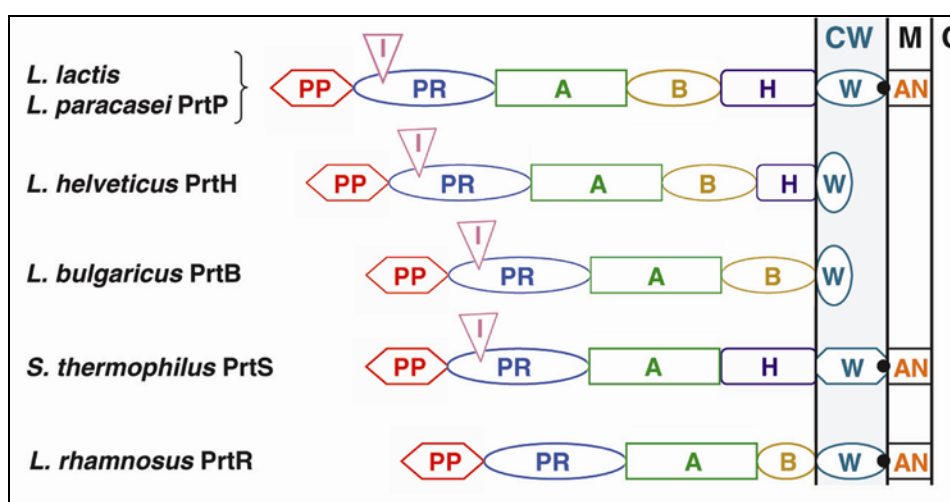
Таким образом, сравнительный анализ физико-химических и иммунохимических свойств показал соответствие разработанного гидролизата требованиям, предъявляемым к категории частичных гидролизатов. Во-первых, он представлен продуктами ферментативного гидролиза сывороточных белков: в частности, обнаружены лишь следовые количества нерасщепленной белковой фракции. Во-вторых, разработанный гидролизат не связывает антитела против β -лг, α -ла и БСА в реакции иммунодиффузии; остаточная АГ образцов, полученных лиофильной и распылительной сушкой (БГУ, РФ), составляет $(1,22 \pm 0,07) \times 10^{-3}$ и $(0,96 \pm 0,05) \times 10^{-3}$ отн. ед. соответственно. В то же время анализ импортных аналогов: «PRODIET GF 006» и «Hilmar 8350», – предназначенных для продуктов специализированного питания, показал наличие негидролизованной фракции БСА. В-третьих, образцы частичных гидролизатов обладают приемлемыми органолептическими свойствами. Предложенный способ позволяет получить частичный ферментативный гидролизат сывороточных белков, который может быть использован в качестве компонента продуктов специализированного питания (детского, спортивного, клинического, геродиетического), для обогащения молочных, мясных, хлебо-булочных изделий [23, 26, 42].

II Особенности протеолиза белков молока промышленно-ценными молочнокислыми бактериями различных групп

Протеолитическая система молочнокислых бактерий обеспечивает развитие микроорганизмов в обогащенных белком средах. Комбинированное действие протеиназ и пептидаз обеспечивает прокариотическую клетку короткоцепочечными пептидами и

аминокислотами, которые проникают через цитоплазматическую мембрану за счет наличия специфических транспортных белков. Поглощенные пептиды подвергаются дальнейшему расщеплению внутриклеточными пептидазами [13].

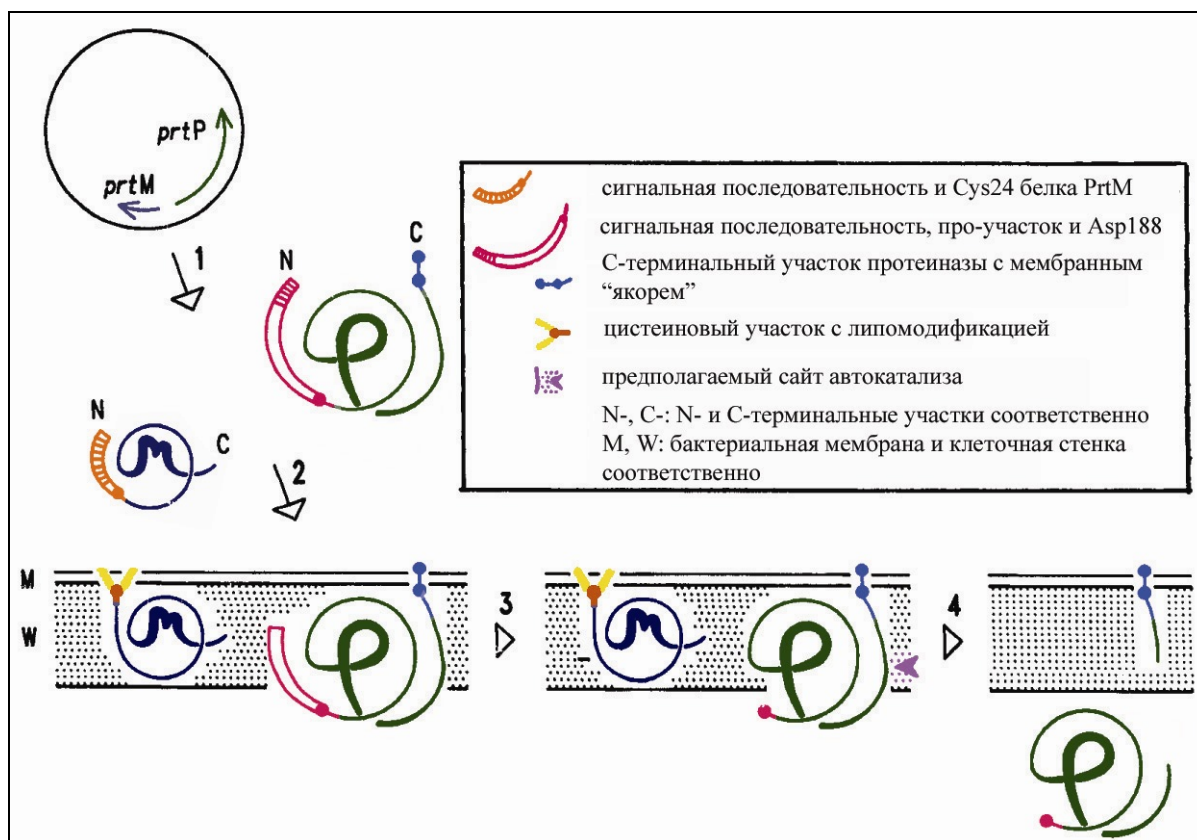
Большинство молочнокислых бактерий обладают протеиназами, локализованными в клеточной стенке (ПКС, или протеиназы клеточной стенки) (рисунок 12) [43]. Согласно различиям в доменной организации протеиназ выделяют пять типов ПКС: PrtP из *Lc. lactis* и *Lb. paracasei*, PrtH из *Lb. helveticus*, PrtR из *Lb. rhamnosus*, PrtS из *Str. thermophilus* и PrtB из *Lb. Bulgaricus* [44]. В соответствии с субстратной специфичностью протеиназы лактококков классифицируют следующим образом: PI-тип преимущественно гидролизует β -казеин на >100 различных олигопептидов размером 4–30 аминокислотных остатков; PIII-тип расщепляет α_{s1} -, β - и κ -казеины в равной степени [45]. Вместе с тем, у представителей рода *Lactobacillus* обнаружены ферменты PI-, PIII-типов и промежуточного PI/PIII-типа; протеиназа с PI/PIII-специфичностью выделена из *Str. thermophilus* [46]. Геномная и плазмидная локализация prtP-генов характерна для лактококков; ПКС лактобацилл кодируются бактериальным геномом [14, 47].



CW – клеточная стенка, М – мембрана, С – цитоплазма, PP – пре-про-домен, PR – каталитический домен, I – вставочный домен, А – А-домен, В – В-домен, Н – спиральный домен, W – спейсерный домен, чёрная точка – специфический сигнал, AN – мембранный домен. В-домен в относительно мал; фермент отличается отсутствием спирального и вставочного доменов; W-домен в большей степени гомологичен некоторым поверхностным антигенам, синтезируемым стрептококками, AN-домен содержит атипичный специфический сигнал

Рисунок 12 – Схематическое изображение ПКС из различных штаммов МКБ (модель согласно [43])

Протеиназы закреплены на бактериальной мембране с помощью погруженного в нее С-терминального участка белковой молекулы, что отражено на рисунке 13 [48]. Расположенный за «якорной» последовательностью Pro-богатый участок С-терминального домена, контактирует с клеточной стенкой и является соединяющим звеном между N- и С-терминальными доменами. Удаление «якорной последовательности» приводит к высвобождению протеиназы в культуральную среду. Продукт гена prtM – мембранный липопротеин – необходим для получения функциональной протеиназы. В настоящее время разработана модель микробной деградации казеина, транспорта и расщепления пептидов, регуляции стадий протеолиза (рисунок 14) [17, 18, 43].



- (1) Бактериальная плаزمида несет гены *prtM* и *prtP*.
- (2) Липомодификация белка, участвующего в пре-созревании, в позиции Cys₂₄ и последующий протеолиз SPase II (пролипопротеин-сигнальная аминопептидаза), в результате чего зрелый белок оказывается закрепленным в бактериальной мембране. Пре-про-протеиназа транслоцируется через клеточную мембрану, расщепляется эквивалентом SPase I (сигнальной пептидазы), закрепляясь в мембране посредством C-терминального участка фермента.
- (3) Удаление про-последовательности путем расщепления пептидной связи Thr₈₇–Asp₁₈₈ приводит к образованию зрелой активной протеиназы.
- (4) Автокаталитическое расщепление протеиназы заключается в удалении C-терминального пептида (сохраняется протеолитическая активность). Инкубирование в свободном от Ca²⁺ буфере стимулирует автокаталитическую реакцию в результате повышения активности протеиназы и высвобождения сайтов протеолиза в белковой молекуле

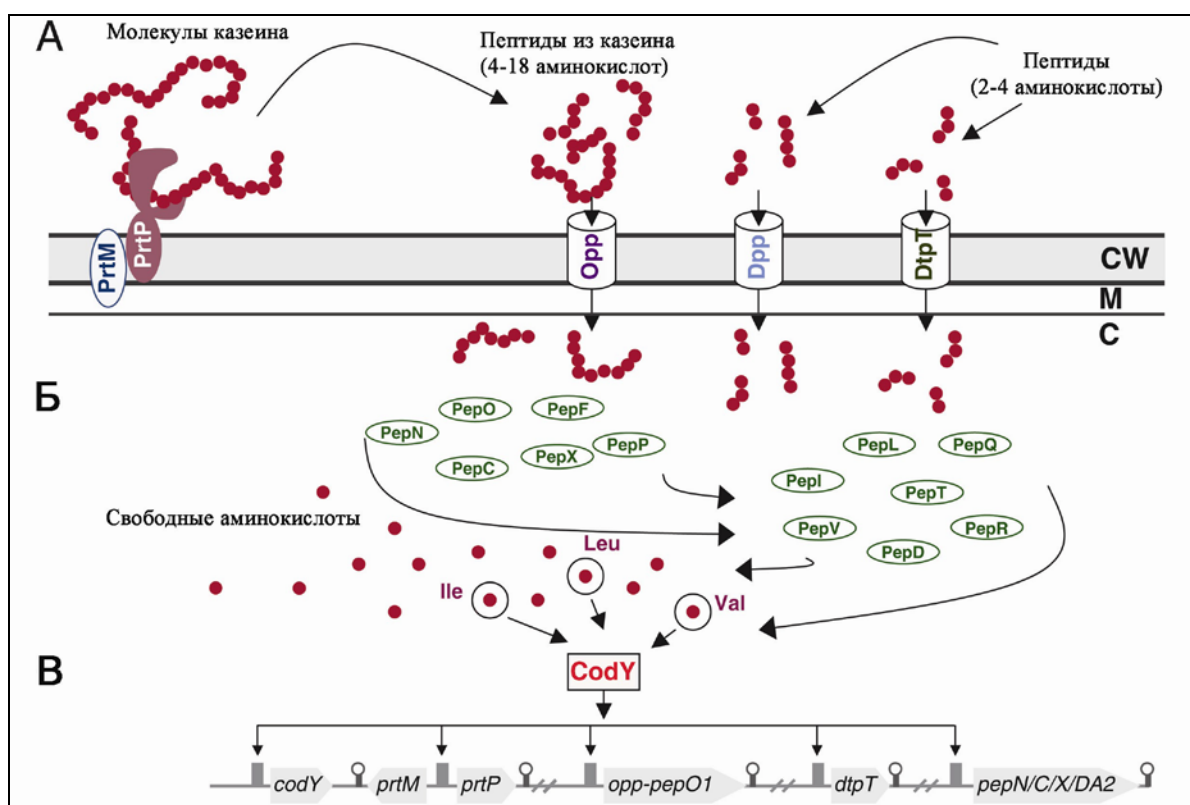
Рисунок 13 – Модель созревания протеиназы [48]

В целом, с учетом современного уровня фундаментальных исследований в области изучения очищенных ПКС (их структуры, субстратной специфичности [13–22, 43–50]) прикладное направление связано с определением протеолитической активности МКБ различных групп (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. и *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* и др.) и их комбинаций, а также особенностей ферментации белкового компонента молока микробными протеолитическими системами.

Практическая значимость настоящей работы определяется необходимостью направленного подбора МКБ в состав моно- и поливидовых заквасок и концентратов для получения ферментированных молочных продуктов с заданным белковым и пептидным составом.

Получены **экспериментальные данные об особенностях гидролиза белков молока протеолитическими системами промышленно-ценных молочнокислых бактерий** (в частности, *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* и

Propionibacterium sp.; из Центрально отраслевой коллекции РУП «Институт мясо-молочной промышленности») [51–52].



А. PrtP – протеиназа клеточной стенки, Opp – пермеаза олигопептидов, DtpT – ион-зависимый транспортер ди- и трипептидов, Dpp – АВС-транспортер пептидов, содержащих 2–9 аминокислотных остатков.

Б. Внутриклеточные пептидазы. PepO и PepF – эндопептидазы, PepN/PepC/PepP – основные аминокислотные пептидазы, PepX – X-пролилдипептидаминопептидаза, PepT – трипептидаза, PepQ – пролидаза, PepR – пролиназа, PepI – Pro-иминопептидаза, PepD и PepV – дипептидазы D и V.

В. Транскрипционный репрессор CodY чувствителен к содержанию в клетке аминокислот с разветвленной цепью (АКРЦ: Ile, Leu и Val); используя АКРЦ в качестве кофакторов CodY подавляет экспрессию генов, кодирующих компоненты протеолитической системы *Lc. lactis*. Рисунок 14 – Схематическое отображение функционирования и регуляции протеолитической системы лактококков при расщеплении казеина (согласно данным [17, 18, 43]).

На рисунке 15 представлена типичная ДСН-электрофореграмма образцов молока, ферментированного *Lb. acidophilus* 1186 LA-AVF и 2649 TL-O, *Lb. fermentum* 2650 TL-O и 2652 TL-O. По результатам анализа продуктов электрофоретического разделения выявлено эффективное расщепление как казеиновой, так и сывороточной фракций (в частности, β -лактоглобулина) протеазами *Lb. acidophilus* 1186 LA-AVF и 2649 TL-O (рисунок 15, дорожки 2–7, в рамке). Не установлена способность расщеплять белки молочной сыворотки при ферментации штаммами *Lb. fermentum* (рисунок 15, дорожки 8–13). В образцах обезжиренного молока, ферментированного *Lb. acidophilus* 1186 LA-AVF и 2649 TL-O при pH 5,5, практически не обнаружена казеиновая фракция и продукты ее частичного протелиза, тогда как при pH 6,5 выявлены как следовые количества казеинов, так и соответствующих пептидов (рисунок 15, дорожки 4–7). Вместе с тем, для *Lb. fermentum* 2650 TL-O и 2652 TL-O больший уровень ПА установлен при pH 5,5 (рисунок 15, дорожки 8–13).

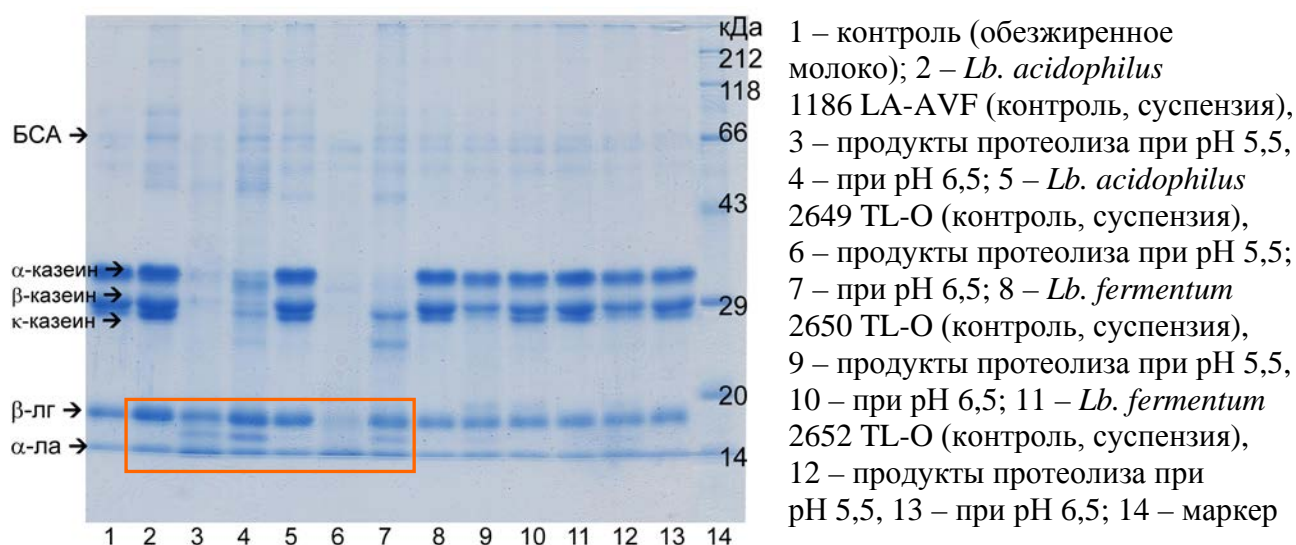


Рисунок 15 – ДСН-электрофореграмма обезжиренного молока, ферментированного *Lb. acidophilus* 1186 LA-AVF и 2649 TL-O, *Lb. fermentum* 2650 TL-O и 2652 TL-O

На основании данных ДСН-электрофоретического анализа и ВЭЖХ (рисунок 16) изучены особенности гидролиза белкового компонента обезжиренного молока **комбинациями МКБ**, а также определен уровень их протеолитической активности. Установлено, что диапазон значений ПА молочнокислых бактерий исследованной выборки: *Lc. lactis* 782 M-A, *Str. thermophilus* 1095 ST-AV, *Propionibacterium sp.* 2388 МИО-К и *Lb. casei* 1188 ML-OF – составляет 1,26–3,12 мг (казеина)/мл (бактериальной суспензии). Для протеолитической системы *Lc. lactis* 782 M-A показано преимущественное расщепление β -казеина, тогда как *Str. thermophilus* 1095 ST-AV, *Propionibacterium sp.* 2388 МИО-К и *Lb. casei* 1188 ML-OF гидролизуют α - и β -казеин; сывороточные белки не используются микробными протеазами в качестве субстрата. Наиболее полное расщепление белков казеиновой фракции (α - и β -казеина) достигается при внесении пропионовокислых бактерий (*Propionibacterium sp.* 2388 МИО-К) в основу, представленную лактококками либо комбинацией *Lc. lactis* 782 M-A и *Str. thermophilus* 1095 ST-AV.

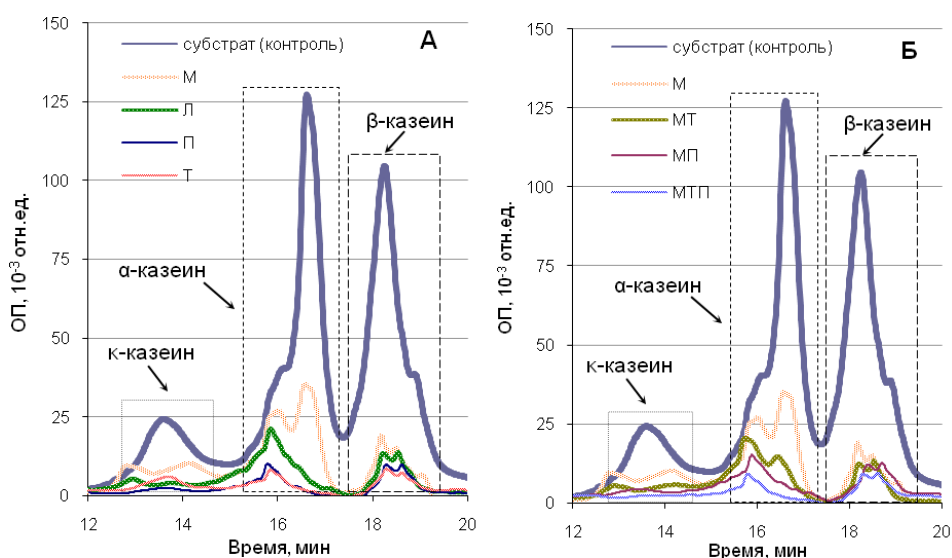


Рисунок 16 – ВЭЖХ-профили обезжиренного молока, ферментированного *Lc. lactis* 782 M-A (М), *Str. thermophilus* 1095 ST-AV (Т), *Propionibacterium sp.* 2388 МИО-К (П), *Lb. casei* 1188 ML-OF (Л) и их **комбинациями**

Применение полученных экспериментальных данных связано с целенаправленным подбором молочнокислых бактерий в состав моно- и поливидовых заквасок и концентратов с учетом оптимальных условий для проявления каталитической активности микробных протеаз, особенностей гидролиза белков казеиновой и сывороточной фракций. Это обеспечит планирование компонентного состава ферментированных молочных продуктов: в частности, получение источника молочного белка с приемлемыми органолептическими свойствами и заданными физико-химическими показателями (белковым, пептидным и аминокислотном составом).

Выводы

Охарактеризованы гидролизаты белков молока (казеина и сывороточных белков), полученные с применением ферментов с различными механизмами каталитического действия и путем ферментации протеолитическими системами промышленно-ценных молочнокислых бактерий.

Представлено доказательство эффективности применения алкалазы, трипсина или термолизина для гидролиза нативных β -лактоглобулина и α -лактальбумина, обеспечивающих получение белкового компонента с содержанием пептидной фракции 90,9–98,3 %, остаточная антигенность которой в 200–480 раз ниже нативных сывороточных белков. Обосновано совместное использование сериновых протеаз (алкалазы и трипсина) для увеличения степени гидролиза белков молочной сыворотки и снижения остаточной антигенности продуктов протеолиза в 8,6–14,2 раза. Оптимизированы условия предварительной тепловой обработки сывороточных белков, обеспечивающей гидролиз бычьего сывороточного альбумина алкалазой и уменьшение остаточной антигенности пептидной фракции в 20–25 раз. Разработан способ получения частичного гидролизата сывороточных белков для продуктов специализированного питания, преимущество которого заключается в расщеплении всех белков-аллергенов. Разработан способ получения гидролизата белков молока для микробиологических питательных сред на основе совместного применения ферментов с эндо- и экзопептидазной активностью, сокращающего продолжительность гидролиза с 42 до 2–3 ч.

Получены экспериментальные данные об особенностях ферментации белкового компонента молока, в частности, казеиновой и сывороточной фракций, различными молочнокислыми бактериями: *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* и *Propionibacterium* sp., а также их комбинациями. Сочетание действия бактериальных протеолитических систем обеспечивает получение ферментированного молока с заданным белковым и пептидным составом, что является основой создания продуктов функционального назначения.

Список литературы

1. Wal, J.M. Bovine milk allergenicity / J.M. Wal // Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2004. – Vol. 93. – P. 2–11.
2. Sorva, R. β -Lactoglobulin secretion in human milk varies widely after cow's milk ingestion in mothers of infants with cows' milk allergy / R. Sorva, S. Makinen-Kiljunen, K. Juntunen-Backman // J. Allergy Clin. Immunol. – 1994. – Vol. 93. – P. 787–792.
3. El-Agamy, E.I. The challenge of cow milk protein allergy / E.I. El-Agamy // Small Rumin. Res. – 2007. – Vol. 68. – P. 64–72.
4. Ревякина, В.А. Иммунологические основы развития атопического дерматита и новая стратегия терапии / В.А. Ревякина // Педиатрия. Приложение к журналу «Консилиум Медикум». – 2004. – № 3. – С. 3–7.
5. Heyman, M. Evaluation of the impact of food technology on the allergenicity of cow's milk proteins / M. Heyman // Proc. Nutr. Soc. – 1999. – Vol. 58, № 3. – P. 587–592.
6. Oligopeptides: mechanism of renal clearance depends on molecular structure / H. Minami [et al.] // Am. J. Physiol. – 1992. – Vol. 263, № 2. – P. 109–115.
7. Clemente, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition / A. Clemente // Trends Food Sci. Technol. – 2000. – Vol. 11. – P. 254–262.

8. Use of hydrolysates in the treatment of cow's milk allergy / L. Terracciano [et al.] // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2002. – Vol. 89, № 1. – P. 86–90.
9. IgE and IgG binding epitopes on α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cow's milk allergy / K.M. Jarvinen [et al.] // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2001. – Vol. 126. – № 2. – P. 111–118.
10. Ragno, V. Allergenicity of milk protein hydrolysates formulae in children with cow's milk substitutes / V. Ragno // *Eur. J. Pediatr.* – 1993. – Vol. 152. – P. 760–762.
11. Special formulas in infant nutrition: a review / J. Maldonado [et al.] // *Early Hum. Dev.* – 1998. – Vol. 53, № 1. – P. 23–32.
12. de Boissieu, D. Allergy to extensively hydrolyzed cow milk proteins in infants: identification and treatment with an acid-based formula / de D. Boissieu, P. Matarazzo, C. DuPont // *J. Pediatr.* – 1997. – Vol. 131. – P. 744–747.
13. Savijoki, K. Proteolytic systems of lactic acid bacteria / K. Savijoki, H. Ingmer, P. Armament // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 71. – P. 394–406.
14. Peterson, S.D. Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese: a review / S.D. Peterson, R.T. Marshall // *J. Dairy Sci.* – 1990. – Vol. 73. – P. 1395–1410.
15. Zourari, A. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review / A. Zourari, J.P. Accolas, M.J. Desmazeaud // *Lait.* – 1992. – Vol. 72. – P. 1–34.
16. Spicher, G. Proteolytic activity of sourdough bacteria / G. Spicher, W. Nierle // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1988. – Vol. 28. – P. 487–492.
17. The proteolytic systems of lactic acid bacteria / E.R.S. Kunji [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1996. – Vol. 70. – P. 187–221.
18. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria / J.E. Christensen [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1999. – Vol. 76. – P. 217–246.
19. Ebringer, L. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products – review / L. Ebringer, M. Ferenčik, J. Krajčovič // *Folia Microbiol.* – 2008. – Vol. 53, № 5. – P. 378–394.
20. Hurley, W.L. Milk protein / W.L. Hurley // *InThech: Croatia, 2012.* – Vol. 1. – P. 3–82.
21. Kok, J. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria / J. Kok // *FEMS Microbiology Reviews.* – 1990. – Vol. 87. – P. 15–42.
22. Graham, G. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria / G. Graham, G.G. Pritchard, T. Coolbear // *FEMS Microbiology Reviews.* – 1993. – Vol. 12. – № 1–3. – Pages 179–206.
23. Головач, Т.Н. Антигенные свойства нативных и термообработанных сывороточных белков и их частичных ферментативных гидролизатов / Т.Н. Головач, В.П. Курченко, Л.И. Сурвило // *Труд. Белорусск. гос. ун-та. Сер.: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем.* – 2011. – Т. 6, Ч. 1. – С. 209–223.
24. Снижение аллергенных свойств белков молока. Технологические подходы / В.П. Курченко [и др.] // *Молочная промышленность.* – 2012. – № 4. – С. 73–75.
25. Сравнительная характеристика и оценка антигенных свойств продуктов гидролиза сывороточных белков сериновыми протеазами трипсином и алкалазой / Т.Н. Головач [и др.] // *Пищевая промышленность: наука и технологии.* – 2010. – № 9. – С. 20–26.
26. Головач, Т.Н. Перспективные биокатализаторы для получения ферментативных гидролизатов сывороточных белков / Т.Н. Головач, Н.К. Жабанос, В.П. Курченко // *Перспективные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК: сб. науч. трудов V Междунар. науч.-практ. симпозиума, г. Москва, 26–27 мая 2010 г. / ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии; редкол.: В.А. Полякова и Л.В. Римаревой.* – М.: ВНИИПБТ, 2010. – С. 171–176.
27. Головач, Т.Н. Аллергенность белков молока и пути ее снижения / Т.Н. Головач, В.П. Курченко // *Труд. Белорусск. гос. ун-та. Сер.: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем.* – 2010. – Т. 5, Ч. 1. – С. 9–55.
28. Головач, Т.Н. Характеристика частичного гидролизата сывороточных белков, полученного с использованием термостабильной бактериальной эндопептидазы / Т.Н. Головач, В.П. Курченко, Н.К. Жабанос // *Инновационные процессы в АПК: материалы*

III Междунар. науч.-практ. конф. преподавателей, молодых ученых и студентов, г. Москва, 13–15 апреля 2011 г. / ФГОУ ВПО Российский университет дружбы народов. – М: РУДН, 2011. – Ч. 1. – С. 93–94.

29. Frokjaer, S. Use of hydrolysates for protein supplementation / S. Frokjaer // *Food Technol.* – 1994. – Vol. 48. – P. 86–88.

30. Головач, Т.Н. Культивирование молочнокислых бактерий в питательных средах на основе гидролизатов белков молока / Т.Н. Головач // Труд. Белорусск. гос. ун-та. Сер.: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2010. – Т. 5, Ч. 1. – С. 118–126.

31. Совместное использование эндо- и экзопептидаз для гидролиза белков молока / Т.Н. Головач, В.П. Курченко // Совершенствование и внедрение современных технологий получения и переработки продукции животноводства: сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф., г. Троицк, 23–24 марта 2011 г. / ФГОУ ВПО Урал. гос. академия вет. медицины. – Троицк: УГАВМ, 2011. – С. 58–64.

32. Способ получения гидролизата белков молока (варианты): пат. 16161 Респ. Беларусь, МПК А 23 J 3/34, А 23 J 1/20, С 12 N 1/20 / Т.Н. Головач, Н.К. Жабанос, Н.Н. Фурик, В.П. Курченко; заявитель РУП «Институт мясо-молочной промышленности». – № а 20101723; заявл. 2010.11.30; опубл. 2012.08.30 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2012. – № 4. – С. 58–59.

33. Способ производства гидролизованного молока: пат. 2225122 РФ, МПК А 23 С 9/00, 9/13, А 23 J 3/08 / Ю.Я. Свириденко, Г.Д. Перфильев, Г.М. Свириденко, Д.В. Абрамов, М.П. Кангин; ВНИИМС. – № а 2001135054/13; заявл. 26.12.2001; опубл. 10.03.2004 // Официальный бюл. / Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. – 2004. – № 7.

34. The antigenic response of β -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation / N. Kleber [et al.] // *Eur. Food Res. Technol.* – 2004. – Vol. 219. – P. 105–110.

35. Paschke, A. Stability of bovine allergens during food processing / A. Paschke, M. Besler // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2002. – Vol. 89. – P. 16–20.

36. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion / K. Takagi [et al.] / *Biol. Pharm. Bull.* – 2003. – Vol. 26, № 7. – P. 969–973.

37. Heat-resistant structural features of bovine β -lactoglobulin A revealed by NMR H/D exchange observations / P.J.V. Edwards [et al.] // *Int. Dairy J.* – 2002. – Vol. 12. – P. 331–344.

38. Головач, Т.Н. Протеолиз и антигенные свойства нативного и термизированного β -лактоглобулина / Т.Н. Головач, Е.М. Червяковский, В.П. Курченко // Доклады НАН Беларуси. – 2010. – Т. 54, № 4. – С. 78–83.

39. Головач, Т.Н. Физико-химическая и иммунохимическая характеристика частичного гидролизата сывороточных белков / Т.Н. Головач, Е.М. Червяковский, В.П. Курченко // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2011. – № 1(11). – С. 28–34.

40. Способ получения ферментативного гидролизата сывороточных белков со средней степенью гидролиза: пат. 2375910 РФ, МПК А 23 J 3/08, А 23 J 3/30, А 23 J 3/34, А 23 J 1/20 / В.И. Круглик, С.Н. Зорин, И.В. Гмошинский, Д.В. Пономарев, Н.Е. Никитина, А.А. Абрамова, И.Н. Волкова, Н.В. Ревякина; заявитель ЗАО «Компания «Нутритек». – № а 20081220114/13; заявл. 03.06.2008; опубл. 20.12.2009 // Официальный бюл. / Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. – 2009. – № 15.

41. Milk protein partial hydrolysate and infant formula containing same: pat. 5405637 USA, int. cl. А 23 С 21/02 / S.B. Martinez, H.L. Leary, D.J. Nichols. – Appl. № 85 213, filed 1993.06.30. // *European Pat. Off.*

42. Whey protein partial hydrolysates for specialized and infant nutrition / V.P. Kurchenko [et al.] // *Russ. Agric. Sci.* – 2011. – Vol. 37, № 1. – С. 90–93.

43. Doeven, M.K. Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms / M.K. Doeven, J. Kok, B. Poolman // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 57. – P. 640–649.

44. Siezen, R.J. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria / R.J. Siezen // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1999. – Vol. 76. – P. 139–155.

45. The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides / V. Juillard [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177. – P. 3472–3478.

46. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization / M.D. Fernandez-Espla [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – P. 4772–4778.

47. Stefanitsi, D. The presence of two proteinases associated with the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus* / D. Stefanitsi, G. Sakellaris, J.R. Garel // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1995. – Vol. 128. – P. 53–58.

48. Laan, H. Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Wg2 / H. Laan, W.N. Konings // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1989. – Vol. 55. – P. 3101–3106.

49. Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis* / E. Guedon [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2001. – Vol. 40. – P. 1227–1239.

50. Probing direct interactions between CodY and the oppD promoter of *Lactococcus lactis* / den C.D. Hengst [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – P. 512–521.

51. Изучение особенностей ферментации белков молока (казеиновой и сывороточной фракций) мезофильными и термофильными лактобациллами / Т.Н. Головач [и др.] // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья: сб. научн. тр. 2011. Вып. 6 / РУП «Институт мясо-молочной промышленности»; редкол.: А.В. Мелешеня [и др.] – Минск, РУП «Институт мясо-молочной промышленности», 2012. – С. 263–272.

52. Закономерности расщепления белков молока протеолитическими системами мезофильных лактококков и термофильных стрептококков / Т.Н. Головач [и др.] // Труд. Белорусск. гос. ун-та. Сер.: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2011. – Т. 6, Ч. 2. – С. 66–74.

MILK PROTEIN HYDROLYSIS WITH ENZYME PREPARATION AND PROTEOLYTIC SYSTEMS OF LACTIC ACID BACTERIA

T.N. Halavach, V.P. Kurchenko*

RUE «Institute for Meat and Dairy Industry», Minsk, Belarus

*Belarusian State University, Minsk, Belarus

Review has been devoted to the problem of directed usage of proteases with different mechanisms of catalytic action and also proteolytic systems of industrial valuable lactic acid bacteria for obtaining the hydrolyzed protein component with specified physicochemical and immunochemical properties for products of functional food. The substrate specificity of proteases in relation to whey protein allergens of cow's milk (β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin) has been characterized; heat treatment and hydrolysis conditions for cleavage of all whey proteins and reduction of their antigenicity have been optimized. A new method of producing partial whey protein hydrolysate as a component of specialized food products has been developed where (in contrast to known analogs) degradation of bovine serum albumin has been achieved. A new short time method for making milk proteins hydrolysate for microbiological nutrient medium with complex usage of exo- and endopeptidase has been proposed. The features of milk protein component fermentation with lactic acid bacteria (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Propionibacterium* sp.) and also their combination have been studied. The proteolytic activity of microorganisms and specificity of bacterial proteinases reaction on proteins of casein and whey fractions have been established.