

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКОВ МОЛОКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ МЕЗОФИЛЬНЫХ ЛАКТОКОККОВ И ТЕРМОФИЛЬНЫХ СТРЕПТОКОККОВ

Т.Н. Головач, Н.К. Жабанос, Н.Н. Фурик, В.П. Курченко*

РУП «Институт мясо-молочной промышленности»,

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Сокращения

α -ла – α -лактальбумин

Lb. – *Lactobacillus*

Lc. – *Lactococcus*

Str. – *Streptococcus*

β -лг – β -лактоглобулин

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВОМ – восстановленное обезжиренное молоко

МКБ – молочнокислые бактерии

ПА – протеолитическая активность

ПААГ – полиакриламидный гель

ПКС – протеиназа клеточной стенки

СОМ – сухое обезжиренное молоко

Введение

Известно, что молочнокислые бактерии: *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. и *Streptococcus* spp. – являются Грам-положительными, неспорообразующими, каталаза-отрицательными и факультативно-анаэробными бактериями с ферментативным метаболизмом [1]. Они выделены из различных источников: кисломолочных продуктов, напитков, кормов [2]. Наиболее важным направлением является использование МКБ в качестве заквасочных культур для получения ферментированных молочных продуктов. В частности, первостепенное экономическое значение имеют штаммы *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Кроме того, некоторые МКБ применяют как пробиотические микроорганизмы [3] и продуценты биологически активных пептидов [4–5].

МКБ нуждаются в экзогенном источнике пептидов и аминокислот, которые образуются путем гидролиза казеина – основного белка молока. Использование казеина инициируется в результате его расщепления бактериальной протеиназой, связанной с клеточной стенкой (ПКС); образовавшиеся олигопептиды поглощаются с участием специфического пептидного транспорта и в дальнейшем под действием различных внутриклеточных пептидаз гидролизуются на короткоцепочечные пептиды и аминокислоты [6–7].

На данный момент разработана модель микробной деградации казеина, транспорта и расщепления соответствующих пептидов, изучена регуляция перечисленных стадий [8–10]. Первый этап утилизации казеина молочнокислыми бактериями предусматривает участие ПКС. Обнаружены, клонированы и охарактеризованы пять различных типов данных ферментов: в частности, PrtP из *Lc. lactis* и *Lb. paracasei*, PrtH из *Lb. helveticus*, PrtR из *Lb. rhamnosus*, PrtS из *Str. thermophilus*, и PrtB из *Lb. bulgaricus* [11–17]. Установлено, что prtP-гены лактококков могут иметь как геномную, так и плазмидную локализацию. В то же время ПКС лактобацилл кодируются бактериальным геномом [14, 18].

Сравнительный анализ ПКС различных штаммов лактококков [19–20] на основании специфики воздействия на казеин позволил выявить два типа протеиназ: 1) НР- или РІ-тип, предпочтительно расщепляющий β -казеин с/без незначительным количеством α_{s1} -казеина в

течение 24 ч ферментации; 2) АМІ- или РІІІ-тип, гидролизующий α_{s1} - и β -казеин, но с иной сайт-специфичностью, чем РІ-тип (согласно данным электрофоретического анализа).

Согласно более поздним исследованиям [6, 21] РІ-тип предпочтительно гидролизует β -казеин на >100 различных олигопептидов размером 4–30 аминокислотных остатков; к-казеин расщепляется менее эффективно. В то же время РІІІ-тип способен гидролизовать α_{s1} -, β - и к-казеины в равной степени [22]. Кроме того, ПКС разделяют на 7 групп (a, b, c, d, e, f и g) согласно их специфичности действия на фрагмент α_{s1} -казеина в позиции 1–23 (f1–23) [6]. Для *Lactobacillus* сообщается о наличии ферментов РІ-, РІІІ-типов и промежуточного РІ/РІІІ-типа. ПКС с РІ/РІІІ-специфичностью выделена из *Str. thermophilus* [16], *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 763 и *L. lactis* subsp. *lactis* UC317 [23–24].

Интерес к протеолитической системе МКБ связан с их широким применением в различных отраслях пищевой промышленности, в частности, сыроделии [25], при изготовлении йогуртов [26], заквасок [27] и обработке мяса [28]. Исследования в данном направлении связаны как с выявлением и количественной оценкой протеолитической активности МКБ, влияния на нее различных факторов, так и, в меньшей степени, с характеристикой физико-химических свойств, специфичностью действия и установлением локализации отдельных ферментов.

Цель работы – установление особенностей расщепления белков молока протеолитическими системами мезофильных лактококков и термофильных стрептококков и определение уровня их протеолитической активности.

Материалы и методы

Для получения образцов ферментированных молочных белков применяли молоко обезжиренное сухое распылительной сушки по СТБ 1858 с м.д. белка 30% и производства Fluka (Швейцария) с м.д. белка 33,8%; в качестве маркеров использовали α -казеин (м.д. белка $\geq 70\%$), β -казеин (м.д. белка 98%) и к-казеин (м.д. белка $\geq 70\%$) производства Sigma (США). Перечень исследуемых штаммов МКБ (из Централизованной отраслевой коллекции РУП «Институт мясо-молочной промышленности») для получения ферментированного обезжиренного молока представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Перечень лактококков, используемых в эксперименте

Паспортный номер	Видовая принадлежность	Оптимальные условия культивирования	
		pH	T, °C
<u>Мезофильные лактококки</u>			
1031 M-A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	6,6–6,8	30±1
2344 M-A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	–/–	–/–
1940 M-ADf	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	–/–	–/–
2071 M-ADf	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	–/–	–/–
981 M-A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	–/–	–/–
100 M-A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	–/–	–/–
947 M-ADG	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	–/–	–/–
1335 M-ADG	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	–/–	–/–
1557 M-A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	–/–	–/–
2325 M-A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	–/–	–/–
970 M-AD	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	–/–	–/–
17 M-AD	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	–/–	–/–
<u>Термофильные стрептококки</u>			
439 ST-A	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	6,6–6,8	42±1
438 ST-A	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	–/–	–/–
613 ST-AV	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	–/–	–/–
1134 ST-AV	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	–/–	–/–

Определение протеолитической активности молочнокислых бактерий (согласно модифицированной методике [29]). Готовили 10% раствор СОМ (восстановленного обезжиренного молока, далее ВОМ) в дистиллированной воде; для отделения нерастворимого осадка полученный раствор центрифугировали при 4 g в течение 20 мин; отделяли супернатант и пастеризовали его при 85°C в течение 15 мин. МКБ культивировали в пастеризованном 10% растворе СОМ в течение 18 ч при оптимальной температуре (таблица 1) и оценивали полученный сгусток (1-я перевивка); далее ферментированным ВОМ, полученным на стадии 1-й перевивки, инокулировали очередную порцию пастеризованного молока (2-я перевивка), выдерживали в течение 24 ч; образцы хранили при 8°C. Для получения бактериальной суспензии образцы ферментированного ВОМ смешивали с фосфатно-цитратным буфером (pH 7,0) в соотношении 2 : 3, центрифугировали при 6 g, 10 мин – 1-й цикл. Осадок ресуспендировали в фосфатном буфере, центрифугировали при 8 g, 20 мин – 2-й и 3-й циклы; отбирали супернатант до конечного объема осадка 1,5 мл и ресуспендировали. С целью приготовления реакционной смеси 0,5 мл бактериальной суспензии смешивали с 0,5 мл фосфатно-цитратного буфера (pH 5,5/ 6,5) и измеряли ОП₆₀₀ полученной бактериальной суспензии. В качестве субстрата использовали 0,5% раствор белков молока (СОМ производства Fluka, Швейцария) в фосфатно-цитратном буфере (pH 5,5/6,5).

Контрольная проба: 150 мкл субстрата смешивали с 150 мкл бактериальной суспензии и немедленно отбирали 50 мкл образца для ДСН-электрофореза. Для инактивации протеаз в 250 мкл смеси вносили 500 мкл 12% ТХУ и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре; центрифугировали при 13 g, 5 мин.

Опытные образцы: 150 мкл субстрата смешивали с 150 мкл бактериальной суспензии, инкубировали при оптимальной температуре (таблица 1) в течение 24 ч, отбирали 50 мкл для электрофоретического анализа; далее вносили 12% ТХУ и готовили аналогично контрольным образцам.

Определение протеолитической активности МКБ спектрофотометрическим методом. Полученные супернатанты опытных и контрольных образцов (после осаждения белка 12% ТХУ) оставляли для последующего определения ПА методом М. Kunitz (1946) [30] согласно описанию [29]. Принцип метода заключается в измерении количества неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктов бактериального протеолиза. Расчет ПА проводили в ЕА/мл (бактериальной суспензии с ОП₆₀₀=1,0).

Контроль степени протеолиза ферментированных белков молока осуществляли согласно модифицированной методике (Р. Kabadjova-Hristova et al., 2006), предполагающей использование ДСН-электрофоретического анализа в полиакриламидном геле [31].

Приготовление контрольных и опытных образцов ферментированного обезжиренного молока для нанесения на полиакриламидный гель: 50 мкл образца (реакционной смеси) немедленно ресуспендировали в 50 мкл буфера разделяющего геля, вносили 50 мкл диссоциирующей смеси и инкубировали на кипящей водяной бане в течение 10 мин; вносили 50 мкл раствора для окрашивания; полученные образцы наносили на гель и осуществляли электрофоретическое разделение белковой смеси [31].

Анализ электрофореграмм проводили с помощью системы гель-документации Image Master VDS–SL и программного обеспечения ImageMaster ID Software version 4.20 (Amersham Bioscience, США). Протеолитическую активность (мг/мл) определяли как количество белка (мг), ферментированного 1 мл бактериальной суспензии с ОП₆₀₀=1,0. Расщепленный белок рассчитывали согласно калибровочным графикам для α-, β- и κ-казеина.

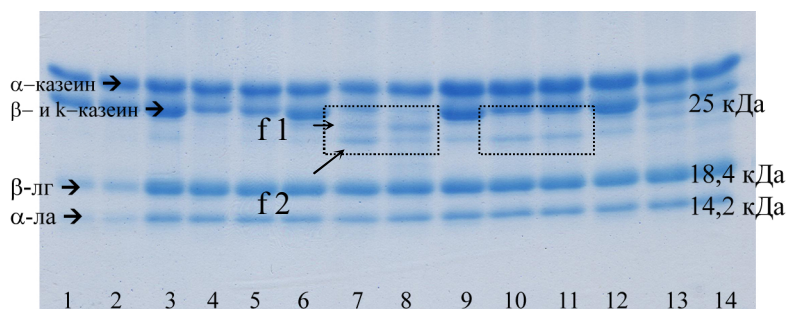
Результаты и обсуждение

Изучены особенности ферментации белков молока (казеиновой и сывороточной фракций) мезофильными лактококками и термофильными стрептококками. В качестве объекта исследований использовали молочнокислые бактерии, перечень которых

представлен в таблице 1. Протеолитическую активность анализировали при pH 5,5 и pH 6,5 в связи с тем, что значение активной кислотности исходного восстановленного СОМ составляет 6,5–6,6 ед. и оптимальные условия культивирования показаны при pH 6,6–6,8 (таблица 1), тогда как при ферментации молока значение активной кислотности понижается до $\leq$ pH 5,5.

Осуществлен сравнительный анализ продуктов протеолиза белков молока ферментными системами представителей группы мезофильных лактококков: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (далее *Lc. lactis*) 1031 М-А, *Lc. lactis* 2344 М-А, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (далее *Lc. diacetylactis*) 1940 М-АDf, *Lc. diacetylactis* 2071 М-АDf. В результате 2-х переживок в пастеризованном обезжиренном молоке образовались плотные сгустки. Полученные бактериальные суспензии инкубировали с ВОМ (2,5 мг/мл белка) при 30°C. На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов микробного протеолиза. Очевидно, что большее количество субстрата расщепляется протеолитической системой *Lc. lactis* 2344 М-А при pH реакционной смеси 6,5. Для *Lc. lactis* 1031 М-А, *Lc. diacetylactis* 1940 М-АDf и 2071 М-АDf влияние активной кислотности на количество расщепленных α -, β - и κ -казеина не установлено. В пептидном профиле ВОМ, ферментированного *Lc. diacetylactis* 1940 М-АDf, выявлен 1 промежуточный продукт протеолиза f2 (рисунок 1, дорожки 9–11), тогда как при использовании *Lc. lactis* 2344 М-А и *Lc. diacetylactis* 2071 М-АDf обнаруживаются 2 крупных пептида (f1 и f2) с аналогичной молекулярной массой и другие минорные компоненты (рисунок 1, дорожки 6–8 и 12–14). Это обусловлено сходными продуктами расщепления κ - и β -казеинов, которые преимущественно подвергаются гидролизу. Кроме того, количество нативных сывороточных белков при ферментации ВОМ не изменяется.

Определена протеолитическая активность мезофильных лактококков: *Lc. lactis* 981 М-А, *Lc. lactis* 100 М-А, *Lc. diacetylactis* 947 М-АDГ и *Lc. diacetylactis* 1335 М-АDГ. Все перечисленные штаммы обладали высокой сквашивающей активностью, что сопровождалось образованием сгустков плотной консистенции. Бактериальную суспензию использовали для определения ПА, что предусматривало применение ДСН-электрофореза (рисунок 2).

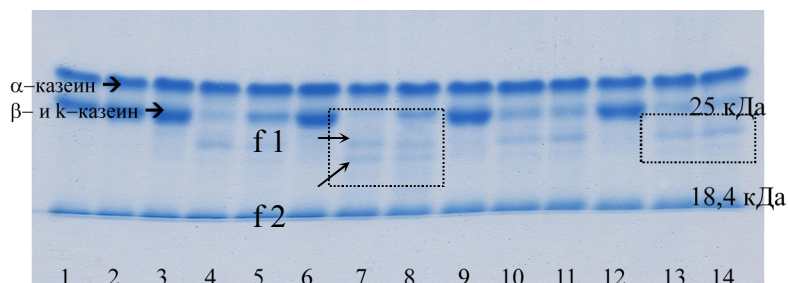


1 1 – контроль ВОМ, pH 5,5; 2 – контроль ВОМ, pH 6,5; 3 – *Lc. lactis* 1031 М-А (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при pH 5,5, 5 – при pH 6,5; 6 – *Lc. lactis* 2344 М-А (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза при pH 5,5, 8 – при pH 6,5; 9 – *Lc. diacetylactis* 1940 М-АDf (контроль, суспензия), 10 – продукты протеолиза при pH 5,5, 11 – при pH 6,5; 12 – *Lc. diacetylactis* 2071 М-АDf (контроль, суспензия), 13 – продукты протеолиза при pH 5,5, 14 – при pH 6,5

Рисунок 1 – ДСН-электрофореграмма (12% ПААГ) образцов ВОМ, ферментированного *Lc. lactis* 1031 М-А и 2344 М-А, *Lc. diacetylactis* 1940 М-АDf и 2071 М-АDf

В пептидном профиле обезжиренного молока, подвергнутого ферментации *Lc. lactis* 100 М-А, установлено наличие двух крупных пептидов (f1 и f2) (рисунок 2, дорожки 6–8), тогда как в случае *Lc. lactis* 981 М-А, *Lc. diacetylactis* 947 М-АDГ и *Lc. diacetylactis* 1335 М-АDГ обнаружен фрагмент f1 и следовые количества f2 (рисунок 2, дорожки 3–5 и 9–14). Это, вероятно, указывает как на сходную сайт-специфичность бактериальных

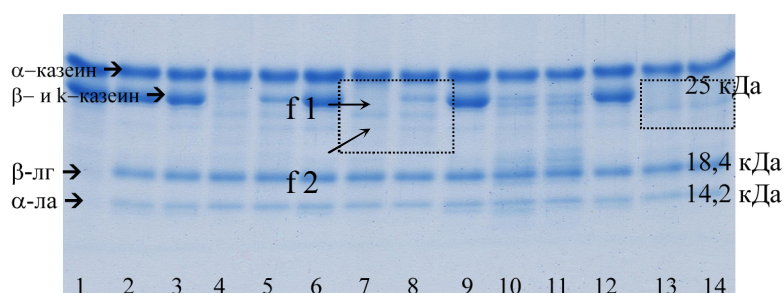
эндопептидаз (1), так и различную глубину гидролиза белковых субстратов: κ - и β -казеинов (2); α -казеин практически не расщепляется. В целом, для исследованных штаммов характерны аналогичные продукты протеолиза с молекулярной массой (m_r) $18,4 \text{ кДа} < m_r < 25 \text{ кДа}$. Для *Lc. lactis* 981 М-А и *Lc. lactis* 100 М-А очевидно возрастание количества гидролизованной казеиновой фракции при pH 5,5; в то же время для *Lc. diacetylactis* 947 М-ADG и *Lc. diacetylactis* 1335 М-ADG влияние активной кислотности среды на глубину протеолиза белковых субстратов не установлено.



1 – контроль BOM, pH 5,5; 2 – контроль BOM, pH 6,5; 3 – *Lc. lactis* 981 М-А (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при pH 5,5, 5 – при pH 6,5; 6 – *Lc. lactis* 100 М-А (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза при pH 5,5, 8 – при pH 6,5; 9 – *Lc. diacetylactis* 947 М-ADG (контроль, суспензия), 10 – продукты протеолиза при pH 5,5, 11 – при pH 6,5; 12 – *Lc. diacetylactis* 1335 М-ADG (контроль, суспензия), 13 – продукты протеолиза при pH 5,5, 14 – при pH 6,5

Рисунок 2 – ДСН-электрофореграмма (12% ПААГ) образцов BOM, ферментированного *Lc. lactis* 981 М-А, *Lc. lactis* 100 М-А, *Lc. diacetylactis* 947 М-ADG и 1335 М-ADG

Изучены особенности ферментации белков молока представителями группы мезофильных лактококков: *Lc. lactis* 1557 М-А, *Lc. lactis* 2325 М-А, *Lc. diacetylactis* 17 М-AD и *Lc. diacetylactis* 970 М-AD. Для всех исследуемых штаммов после 2-х перевивок показано образование плотных сгустков. В BOM, ферментированном *Lc. lactis* 1557 М-А, *Lc. lactis* 2325 М-А и *Lc. diacetylactis* 970 М-AD, выявлены аналогичные продукты микробного протеолиза (f1 и f2) (рисунок 3, дорожки 3–8 и 12–14). В то же время в пептидном профиле образца, полученного с применением *Lc. diacetylactis* 17 М-AD, показаны многочисленные промежуточные пептиды (рисунок 3, дорожки 9–11).



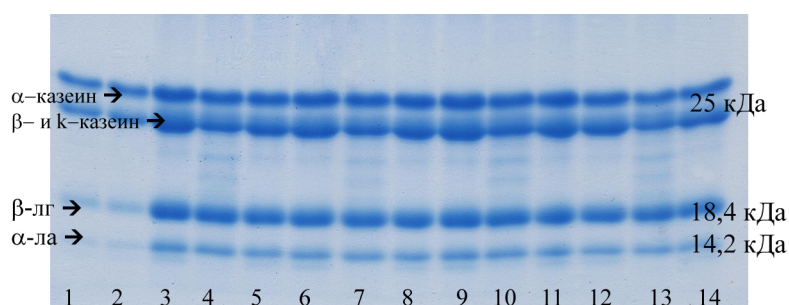
1 – контроль BOM, pH 5,5; 2 – контроль BOM, pH 6,5; 3 – *Lc. lactis* 1557 М-А (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при pH 5,5, 5 – при pH 6,5; 6 – *Lc. lactis* 2325 М-А (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза при pH 5,5, 8 – при pH 6,5; 9 – *Lc. diacetylactis* 17 М-AD (контроль, суспензия), 10 – продукты протеолиза при pH 5,5, 11 – при pH 6,5; 12 – *Lc. diacetylactis* 970 М-AD (контроль, суспензия), 13 – продукты протеолиза при pH 5,5, 14 – при pH 6,5

Рисунок 3 – ДСН-электрофореграмма (12% ПААГ) образцов BOM, ферментированных *Lc. lactis* 1557 М-А и 2325 М-А, *Lc. diacetylactis* 17 М-AD и 970 М-AD

Так сходный состав белков и пептидов характерен для BOM, ферментированного *Lc. lactis* 1557 М-А и *Lc. lactis* 2325 М-А, тогда как для представителей другой группы –

Lc. diacetylactis 17 M-AD и *Lc. diacetylactis* 970 M-AD – обнаружены существенные отличия в сайтах расщепления казеинов. Согласно данным ДСН-электрофоретического анализа, α -казеин гидролизуетсся значительно медленнее, чем β - и κ -казеин, а микробные протеазы практически не реагируют с сывороточными белками. Бóльшая протеолитическая активность наблюдается в случае ферментации BOM при pH 5,5 мезофильными лактококками *Lc. lactis* 1557 M-A и 2325 M-A; в эксперименте с использованием *Lc. diacetylactis* 17 M-AD и 970 M-AD значение активной кислотности среды (pH 5,5 и pH 6,5) не влияет на эффективность расщепления белков молока.

Определена протеолитическая активность термофильных МКБ: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 439 ST-A, *Str. thermophilus* 438 ST-A, *Str. thermophilus* 613 ST-AV и *Str. thermophilus* 1134 ST-AV. Образование плотных сгустков при сквашивании BOM (1–2-я перевивки) показано для всех перечисленных штаммов *Str. thermophilus*. Продукты ферментации BOM термофильными МКБ отражены на рисунке 4.



1 – контроль BOM, pH 5,5; 2 – контроль BOM, pH 6,5; 3 – *Str. thermophilus* 439 ST-A (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при pH 5,5, 5 – при pH 6,5; 6 – *Str. thermophilus* 438 ST-A (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза при pH 5,5, 8 – при pH 6,5; 9 – *Str. thermophilus* 613 ST-AV (контроль, суспензия), 10 – продукты протеолиза при pH 5,5, 11 – при pH 6,5; 12 – *Str. thermophilus* 1134 ST-AV (контроль, суспензия), 13 – продукты протеолиза при pH 5,5, 14 – при pH 6,5

Рисунок 4 – ДСН-электрофореграмма (12% ПААГ) образцов COM, ферментированного *Str. thermophilus* 439 ST-A, 438 ST-A, 613 ST-AV и 1134 ST-AV

Гидролиз преимущественно проходил при pH 5,5, о чем также свидетельствовало образование промежуточных пептидов (рисунок 4, дорожки 4, 7, 10 и 13). Установлено, что протеолитические системы исследованных *Str. thermophilus* гидролизуют β - и κ -казеин предпочтительнее, чем α -казеин; основные сывороточные белки: β -лактоглобулин и α -лактальбумин не используются в качестве источника белкового азота.

Согласно полученным экспериментальным данным исследованные штаммы разделены на группы в соответствии с уровнем протеолитической активности, оптимумом pH, субстратной специфичностью (таблица 2).

К группе с минимальной ПА (0–1,0 мг/мл) отнесены термофильные МКБ: *Str. thermophilus* 439 ST-A, *Str. thermophilus* 438 ST-A, *Str. thermophilus* 613 ST-AV, *Str. thermophilus* 1134 ST-AV. Протеолитическая активность большинства изученных мезофильных лактококков (11 из 12 штаммов) не превышает 2,0 мг/мл (или <2000 ЕА/мл), что обусловлено, главным образом, низкой эффективностью гидролиза α -казеина.

Установлено, что термофильные стрептококки *Streptococcus* spp. (4 штамма) и мезофильные лактококки *Lc. lactis* (3 из 6 штаммов) эффективнее гидролизуют казеиновую фракцию белков молока при значении pH реакционной смеси 5,5. Вместе с тем, для 6 изученных штаммов *Lc. diacetylactis* не выявлено изменение ПА при исследуемых значениях активной кислотности (pH 5,5 и 6,5) (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика *Lactococcus* spp. и *Streptococcus* spp. согласно уровню протеолитической активности, оптимума pH, субстратной специфичности

Группы МКБ		Перечень МКБ
Уровень ПА	низкий 0–1,0 мг/мл 0–1000 ЕА/мл	<i>Str. thermophilus</i> 439 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 438 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 613 ST-AV, <i>Str. thermophilus</i> 1134 ST-AV, <i>Lc. lactis</i> 1031 M-A, <i>Lc. diacetylactis</i> 1940 M-Adf ⁽³⁾
	средний 1,0–2,0 мг/мл 1000–2000 ЕА/мл	<i>Lc. lactis</i> 981 M-A ^(3,5) , <i>Lc. lactis</i> 2344 M-A ^(2,6) , <i>Lc. diacetylactis</i> 2071 M-Adf <i>Lc. lactis</i> 1557 M-A ⁽⁴⁾ , <i>Lc. lactis</i> 2325 M-A, <i>Lc. lactis</i> 100 M-A ⁽²⁾ , <i>Lc. diacetylactis</i> 17 M-AD ⁽¹⁾ , <i>Lc. diacetylactis</i> 947 M-ADG, <i>Lc. diacetylactis</i> 1335 M-ADG, <i>Lc. diacetylactis</i> 970 M-AD
Предпочтительное значение pH	pH 5,5	<i>Lc. lactis</i> 981 M-A, <i>Lc. lactis</i> 100 M-A, <i>Lc. lactis</i> 1557 M-A, <i>Str. thermophilus</i> 439 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 438 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 613 ST-AV, <i>Str. thermophilus</i> 1134 ST-AV
	pH 6,5	<i>Lc. lactis</i> 2344 M-A
	не влияет	<i>Lc. lactis</i> 2325 M-A ⁽⁷⁾ , <i>Lc. lactis</i> 1031 M-A, <i>Lc. diacetylactis</i> 1940 M-Adf, <i>Lc. diacetylactis</i> 2071 M-Adf, <i>Lc. diacetylactis</i> 1335 M-ADG, <i>Lc. diacetylactis</i> 17 M-AD, <i>Lc. diacetylactis</i> 970 M-AD, <i>Lc. diacetylactis</i> 947 M-ADG
Предпочтительное расщепление субстрата в смеси казеинов	α -казеин	–
	β - и κ -казеин	<i>Lc. lactis</i> 1031 M-A, <i>Lc. lactis</i> 981 M-A, <i>Lc. lactis</i> 100 M-A, <i>Lc. lactis</i> 1557 M-A, <i>Lc. lactis</i> 2325 M-A, <i>Lc. lactis</i> 2344 M-A, <i>Lc. diacetylactis</i> 1940 M-Adf, <i>Lc. diacetylactis</i> 2071 M-Adf, <i>Lc. diacetylactis</i> 1335 M-ADG, <i>Lc. diacetylactis</i> 17 M-AD, <i>Lc. diacetylactis</i> 970 M-AD, <i>Lc. diacetylactis</i> 947 M-ADG, <i>Str. thermophilus</i> 439 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 438 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 613 ST-AV, <i>Str. thermophilus</i> 1134 ST-AV

Примечание. По данным спектрофотометрических исследований штамм отнесен к группе с высоким⁽¹⁾, низким⁽²⁾, промежуточным⁽³⁾ (≈ 1000 ЕА/мл) и низким (pH 6,5)/ средним (pH 5,5)⁽⁴⁾ уровнем ПА; по результатам ДСН-электрофореза уровень ПА при pH 6,5 и 5,5 низкий и средний соответственно⁽⁵⁾, при pH 5,5 и 6,5 промежуточный ($\approx 1,0$ мг/мл) и средний соответственно⁽⁶⁾; согласно методу М. Kunitz оптимум pH 5,5⁽⁷⁾

Отличия в уровне ПА и при различных показателях pH могут быть связаны с образованием крупных промежуточных пептидов (рисунки 1–3), видимых на ДСН-электрофореграмме, но осаждаемых трихлоруксусной кислотой, а также наличием продуктов протеолиза, не содержащих Туг, Тгр или Phe, которые обеспечивают поглощение при λ_{280} , что приводит к заниженным значениям ПА при использовании спектрофотометрического метода.

Среди исследованной выборки мезофильных лактококков и термофильных стрептококков большая часть преимущественно гидролизует β - и κ -казеин, тогда как α -казеин практически не используется в качестве субстрата или расщепляется менее эффективно. Кроме того, анализ ДСН-электрофореграмм позволил установить, что микробные протеазы не гидролизуют основные сывороточные белки (β -лактоглобулин и α -лактальбумин).

Выводы

Охарактеризована протеолитическая активность представителей различных групп молочнокислых бактерий (*Lactococcus* spp. и *Streptococcus* spp.) на основании ДСН-электрофоретического анализа образцов ферментированного обезжиренного молока при сопоставлении с результатами спектрофотометрических исследований. Данные, полученные спектрофотометрическим и электрофоретическим методами, в совокупности

позволяют наиболее полно оценить как уровень ПА и влияние на него активной кислотности среды (по количеству неосаждаемых продуктов ферментативной реакции), так и качественный и количественный состав отдельных фракций (согласно белковым и пептидным профилям ДСН-электрофореграмм).

Результаты научно-исследовательской работы в дальнейшем позволят планировать компонентный состав ферментированных молочных продуктов на основе знаний об уровне ПА используемых МКБ, оптимальных значений каталитической активности микробных протеиназ, особенностей гидролиза белков казеиновой и сывороточной фракций с целью получения источника молочного белка с приемлемыми органолептическими свойствами и физико-химическими показателями.

Список литературы

1. Axelsson, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology / L. Axelsson // In: Salminen S, von Wright A (eds) Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, New York – 1998. – P. 1–72.
2. Leroy, F. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry / F. Leroy, L. Devuyst // Trends Food Sci Technol. – 2004. – Vol. 15. – P. 67–78.
3. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms / M. Saxelin [et al.] // Curr Opin Biotechnol. – 2005. – Vol. 16. – P. 204–211.
4. Meisel, H. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties / H. Meisel, W. Bockelman // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1999. – Vol. 76. – P. 207–215.
5. Korhonen, H. Food-derived bioactive peptides - opportunities for designing future foods / H. Korhonen, A.M. Pihlanto // Curr Pharm Des. – 2003. – Vol. 9, № 16. – P. 1227–1230.
6. The proteolytic systems of lactic acid bacteria / E.R.S. Kunji [et al.] // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1996. – Vol. 70. – P. 187–221.
7. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria / J.E. Christensen [et al.] // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1999. – Vol. 76. – P. 217–246.
8. Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis* / S. Tynkkynen [et al.] // J Bacteriol. – 1993. – Vol. 175. – P. 7523–7532.
9. Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply / E. Guedon [et al.] // J Bacteriol. – 2001. – Vol. 183. – P. 3614–3622.
10. The *Lactococcus lactis* CodY regulon: identification of a conserved cis-regulatory element / den C.D. Hengst [et al.] // J Biol Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 34332–34342.
11. Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2 / J. Kok [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 1988. – Vol. 54. – P. 231–238.
12. Holck, A. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151 / A. Holck, H. Naes // J Gen Microbiol. – 1992. – Vol. 138. – P. 1353–1364.
13. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus debrueckii* subsp. *bulgaricus* / C. Gilbert [et al.] // J Bacteriol. – 1996. – Vol. 178. – P. 3059–3065.
14. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 / J.A. Pederson [et al.] // J Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – P. 4592–4597.
15. Siezen, R.J. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria / R.J. Siezen // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1999. – Vol. 76. – P. 139–155.
16. *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.

17. Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 / I. Pastar [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2003. – Vol. 69. – P. 5802–5811.
18. 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.
19. Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{s1} -, β - and κ -casein / S. Visser [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 52. – P. 1162–1166.
20. Visser, S. Specificity of a cell-envelope-located proteinase (PIII-type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AMI in its action on bovine β -casein / S. Visser, A.J.P.M. Robben, C.J. Slangen // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1991. – Vol. 35. – P. 477–483.
21. 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.
22. Pritchard, G.G. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria / G.G. Pritchard, T. Coolbear // FEMS Microbiol Rev. – 1993. – Vol. 12. – P. 179–206.
23. Monnet, V. Substrate specificity of the cell envelope-located proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763 / V. Monnet, J.P. Ley, S. Gonzalez // Int. J. Biochem. – 1992. – Vol. 24. – P. 707–718.
24. Cloning and partial sequencing of the proteinase gene complex from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317 / J. Law [et al.] // J. Gen. Microbiol. – 1992. – Vol. 138. – P. 709–718.
25. 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.
26. 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.
27. Spicher, G. Proteolytic activity of sourdough bacteria / G. Spicher, W. Nierle // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1988. – Vol. 28. – P. 487–492.
28. Hammes, W.P. Lactic acid bacteria in meat fermentation / W.P. Hammes, A. Bantleon, S. Min // FEMS Microbiol Rev. – 1990. – Vol. 87. – P. 165–174.
29. Evidence for proteolytic activity of lactobacilli isolated from kefir grains // P. Kabadjova-Hristova [et al.] // Biotechnol. Equip. – 2006. – Vol. 20. – P. 89–94.
30. Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties / M. Kunitz // J. Gen. Physiol. – 1946. – Vol. 30. – P. 291–310.
31. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. – М.: Наука; 1981. – С. 56–65.

FEATURES OF MILK PROTEIN CLEAVAGE WITH PROTEOLYTIC SYSTEM OF MESOPHILIC LAKTOCOCCI AND THERMOPHILIC STREPTOCOCCI

T.N. Halavach, N.K. Zhabanos, N.N. Furik, V.P. Kurchenko*

RUE «Institute of Meat and Dairy Industry»,

**Belarusian State University, Minsk, Belarus

Experimental data on the hydrolysis characteristics of casein protein fractions during skim milk fermentation with mesophilic lactococci and thermophilic streptococci, effect of medium acidity on the cleavage of substrates has been obtained. The proteolytic activity of *Lactococcus* spp. and *Streptococcus* spp. has been established on the basis of spectrophotometric studies and SDS-electrophoretic separation of samples with fermented skimmed milk.