

Т.Н. Головач¹, Н.К. Жабанос¹, Н.Н. Фурик¹, В.П. Курченко²,
С.В. Ризевский²

¹Институт мясо-молочной промышленности,

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И УРОВЕНЬ ФЕРМЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ РАСЩЕПЛЕНИИ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ МОЛОКА ПРОБИОТИЧЕСКИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Введение. Основными биологически ценными белками молока являются казеин, β -лактоглобулин (β -лг), α -лактальбумин (α -ла), иммуноглобулины, лактоферрин и сывороточный альбумин. Они проявляют свою активность непосредственно или после расщепления на специфические пептиды [1]. В реакции с протеолитическими ферментами из казеиновой и сывороточной фракций генерируются различные биологически активные пептиды, которые оказывают эффект на иммунную, пищеварительную, сердечно-сосудистую и нервную системы (таблица 1).

Таблица 1 – Биологические активности белков и пептидов молока [1]

Эффект	Активная субстанция, эффектор
опиоидный антагонист	лактоферроксины
опиоидный агонист	α -лакторфины, β -лакторфины
антимикробный	лактоферрин, лактоферрицин
иммуномодулирующий	иммунопептиды (иммуноказокинины)
гипотензивный	лактокинины, казокинины
антиоксидантный	пептиды из α -лактальбумина и β -лактоглобулина (Met-His-Ile-Arg-Leu, Tyr-Val-Glu-Glu-Leu)
гипохолестеринемический	пептид из β -лактоглобулина (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys)
антитромбоцитарный	казоплателин
связывание минералов	казеинофосфопептиды

Они высвобождаются из аминокислотной последовательности исходного белка во время пищеварения в желудочно-кишечном тракте, в результате ферментации молока пробиотическими микроорганизмами или путем гидролиза протеазами *in vitro*. В связи с этим получили развитие технологии, позволяющие изолировать биологически активные пептиды в форме пищевых добавок. В естественном виде они

присутствуют в ферментированных продуктах: йогурте, кефире, сыре и др. [2].

Известно, что большинство молочнокислых бактерий (МКБ) обладают протеиназами, локализованными в клеточной стенке (ПКС, или протеиназы клеточной стенки). ПКС осуществляют гидролиз казеина до олигопептидов, которые поглощаются бактериальной клеткой, где осуществляется их расщепление до короткоцепочечных пептидов и аминокислот. В настоящее время разработана модель микробной деградации казеина, транспорта и расщепления пептидов, регуляции стадий протеолиза [1, 2]. 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 PrtV из *Lb. bulgaricus*. Установлено, что геномная и плазмидная локализация prtP-генов характерна для лактококков; ПКС лактобацилл кодируются бактериальным геномом [3, 4]. В соответствии с субстратной специфичностью протеиназ лактококков выделены основные типы ПКС: 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 [5, 6]. У представителей рода *Lactobacillus* обнаружены ферменты PI-, PIII-типов и промежуточного PI/PIII-типа; протеиназа с PI/PIII-специфичностью выделена из *Str. thermophilus* [7].

Так в результате гидролиза белков молока протеолитическими ферментами МКБ высвобождаются аминокислоты и пептиды, формирующие специфические органолептические свойства кисломолочных продуктов. Вместе с тем, при ферментации казеина и сывороточных белков некоторыми пробиотическими МКБ образуются биологически активные пептиды, что является актуальным при разработке продуктов функциональной направленности. Получение специфических пептидов (в частности, с гипотензивным, антимикробным, иммуностимулирующим, антифунгальным и др. эффектами) представляет особый интерес для пищевой и фармацевтической промышленности.

В целом, с учетом современного уровня фундаментальных исследований в области изучения очищенных ПКС (их структуры, субстратной специфичности) 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 для получения кисломолочных продуктов с заданным белковым и пептидным составом. Актуальным направлением является совершенствование методических подходов для разделения и количественного определения казеиновой и сывороточной фракций молока.

Цель работы – изучение субстратных свойств казеина и сывороточных белков при расщеплении протеолитическими системами термофильных лактобацилл, сравнительная характеристика ферментированного белкового компонента молока.

Материалы и методы исследования. В экспериментальной работе применяли штаммы из Централизованной отраслевой коллекции РУП «Институт мясо-молочной промышленности»: *Lactobacillus helveticus* 382 LA-AV (*Lb. helveticus* 382 LA-AV, Hel) и *Lb. acidophilus* 2649 TL-O (Ac).

1.1 Определение уровня протеолитической активности (ПА) МКБ. Методика предполагает увеличение количества бактериальных клеток (внесение концентрированной бактериальной суспензии) и протеолиз при фиксированных значениях активной кислотности среды, что направлено на возрастание глубины гидролиза белков до уровня, при котором использование предложенных методов позволяет достоверно оценить убыль субстратов.

Приготовление образцов ферментированного обезжиренного молока включало получение бактериальных суспензий *Lb. helveticus* 382 LA-AV, *Lb. acidophilus* 2649 TL-O и их смеси (1 : 1), ферментативную реакцию, состоящую в инкубировании бактериальной суспензии (смеси суспензий) и субстрата (восстановленного обезжиренного молока, ВОМ). Последующий анализ продуктов микробного протеолиза осуществляли с применением различных методических подходов: колориметрического метода, электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В случае колориметрического метода анализу подвергались низкомолекулярные соединения белковой природы, не осаждаемые трихлоруксусной кислотой (ТХУ).

Так по данным колориметрических исследований (метод M.L. Anson) уровень ПА определяли количеством тирозина (Тур, мг/мл), высвобождаемого при гидролизе и выявляемого в цветной реакции с реагентом Фолина по изменению светопоглощения в видимой области

спектра (при λ_{620}); содержание Туг в ферментированном молоке рассчитывали по калибровочному графику.

Помимо указанного методического подхода, разделение сложной белково-пептидной смеси в денатурирующих условиях (при внесении в систему додецилсульфата натрия, ДСН) предполагает распределение компонентов в полиакриламидном геле согласно их молекулярной массе (ДСН-электрофорез). Наряду с этим, принцип ВЭЖХ состоит в разделении компонентов смеси, основанном на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами. Разделение происходит за счет различной растворимости анализируемых веществ в неподвижной фазе, химически привитой к поверхности неподвижного носителя, и в подвижной фазе (растворителе). В частности, привитая фаза представляла собой неполярный алкильный остаток C_8 , а подвижная более полярная фаза – смесь ацетонитрила с 0,1 % водным раствором трифторуксусной кислоты, в которой проводилось градиентное элюирование. Следует особо отметить, что анализ ДСН-электрофореграмм и хроматографических профилей позволяет установить как количественный, так и качественный (субстратную специфичность) состав ферментированных белков молока. ПА в данном случае определяли количеством белка (казеина, мг/мл), расщепленного бактериальной суспензией ($ОП_{600}=1$); убыль белкового субстрата рассчитывали согласно калибровочным графикам для α -, β - и κ -казеина.

Интересным представлялось сопоставление результатов разделения продуктов микробного протеолиза как по молекулярной массе, так и полярности компонентов белково-пептидной смеси; а также по количеству не осаждаемой ТХУ низкомолекулярной фракции, детектируемой колориметрически (λ_{620}).

Экспериментально установлено, что расщепление 1,0 мг/мл (белка) по данным ДСН-электрофореза и ВЭЖХ условно соответствует 0,025 мг/мл (Туг), регистрируемого колориметрическим методом.

1.2 Анализ ферментированных белков в кисломолочных продуктах. *Lb. helveticus* 382 LA-AV и *Lb. acidophilus* 2649 TL-O культивировали в пастеризованном ВОМ (37 °С). Использовали пролонгированное время ферментации (24 ч) по сравнению с технологическим процессом получения кисломолочных продуктов (8–12 ч) для установления потенциальной возможности использования перечисленных выше методов для оценки относительно невысокого количества гидролизованного субстрата.

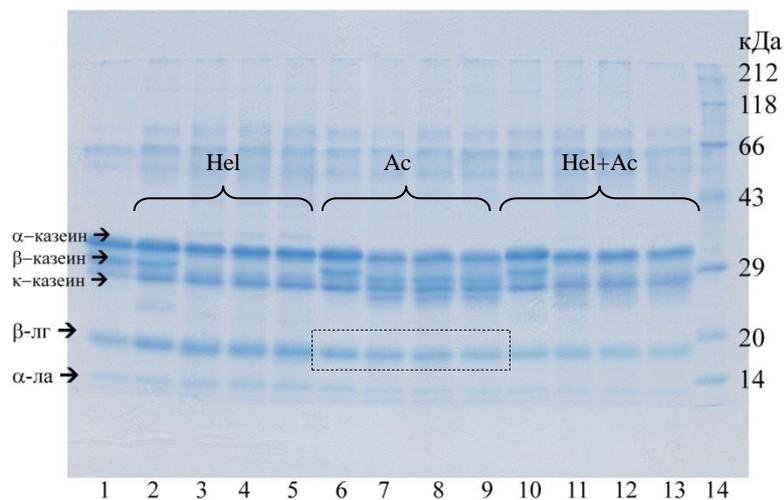
Образцы ферментированного ВОМ анализировали с применением ВЭЖХ и ДСН-электрофореза. Кроме того, количество низкомолекулярной белковой фракции ($m_r \leq 10$ кДа) устанавливали путем определения общего азота (СТБ ISO 8968-1-2008) как в ультрафильтратах образцов, так и после осаждения белковой составляющей ТХУ.

1.3 Статистическая обработка данных. Построение графиков и математическую обработку результатов исследований осуществляли при помощи компьютерной программы «Microsoft Office Excel 2003» (Microsoft Corporation, США). При статистической обработке данных результаты представляли как среднее арифметическое значение \pm доверительный интервал. Достоверность различий между выборками экспериментальных данных определяли методом доверительных интервалов при уровне значимости $p < 0,05$ ($n = 3$).

Результаты и их обсуждение.

2.1. Сравнительный анализ методических подходов, используемых для изучения протеолитической активности МКБ и их комбинаций. Согласно данным качественного и количественного анализа ДСН-электрофореграммы и хроматограмм (рис. 1, 2) при ферментации ВОМ *Lb. helveticus* 382 LA-AV, *Lb. acidophilus* 2649 TL-O и их смесью образуются уникальные белково-пептидные профили. Так протеолитическая система *Lb. helveticus* 382 LA-AV преимущественно расщепляет β -казеин (рис. 1, дорожки 2–5; рис. 2), тогда как эндопептидазы *Lb. acidophilus* 2649 TL-O гидролизуют α -, β - и κ -казеин (рис. 1, дорожки 6–9; рис. 2).

В случае совместной ферментации обезжиренного молока *Lb. helveticus* 382 LA-AV и *Lb. acidophilus* 2649 TL-O увеличивается количество гидролизованного α - и κ -казеина (рис. 1, дорожки 10–13; рис. 2), которые практически не расщепляются протеазами *Lb. helveticus* 382 LA-AV. Следует особо отметить, что высокоактивные ферменты ацидофильной палочки способны гидролизовать основной сывороточный белок – β -лактоглобулин (рис. 1, дорожки 6–9, в рамке).



1 – контроль, обезжиренное молоко (2,5 мг/мл); 2 – Hel (контроль), 3 – Hel-1 (ферментированное молоко, ФМ), 4 – Hel-2 (ФМ), 5 – Hel-3 (ФМ); 6 – Ac (контроль), 7 – Ac-1 (ФМ); 8 – Ac-2 (ФМ), 9 – Ac-3 (ФМ); 10 – Hel+Ac (контроль), 11 – Hel+Ac-1 (ФМ); 12 – Hel+Ac-2 (ФМ), 13 – Hel+Ac-3 (ФМ); 14 – маркер

Рисунок 1 – ДСН-электрофореграмма образцов обезжиренного молока, ферментированного Hel, Ac и их комбинацией (Hel+Ac)

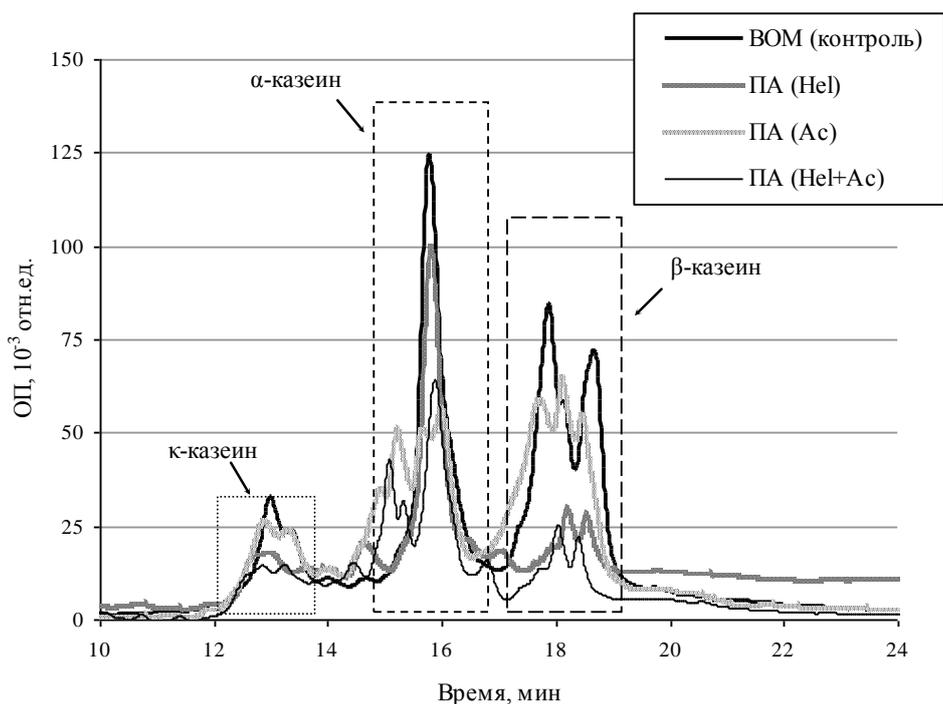


Рисунок 2 – ВЭЖХ-профили обезжиренного молока, ферментированного Hel, Ac и их комбинацией (Hel+Ac)

(для расчета уровня ПА молочнокислых бактерий)

Проведен комплексный сравнительный анализ уровня ПА, установленного с использованием ряда методических подходов (рис. 3).

Различия между данными, полученными при количественном анализе ДСН-электрофореграммы и ВЭЖХ-профилей не достоверны. Так уровень ПА возрастает в ряду *Lb. acidophilus* 2649 TL-O → *Lb. helveticus* 382 LA-AV → комбинация и составляет 0,47–0,48 → 0,64–0,75 → 0,97–1,12 0,47–1,12 мг (казеина)/ мл (бактериальной суспензии). Полученная зависимость также характерна для колориметрического метода (рис. 3), в частности, уровень ПА возрастает в аналогичной последовательности МКБ и достигает 0,013 → 0,035 → 0,040 мг/мл (Тур).

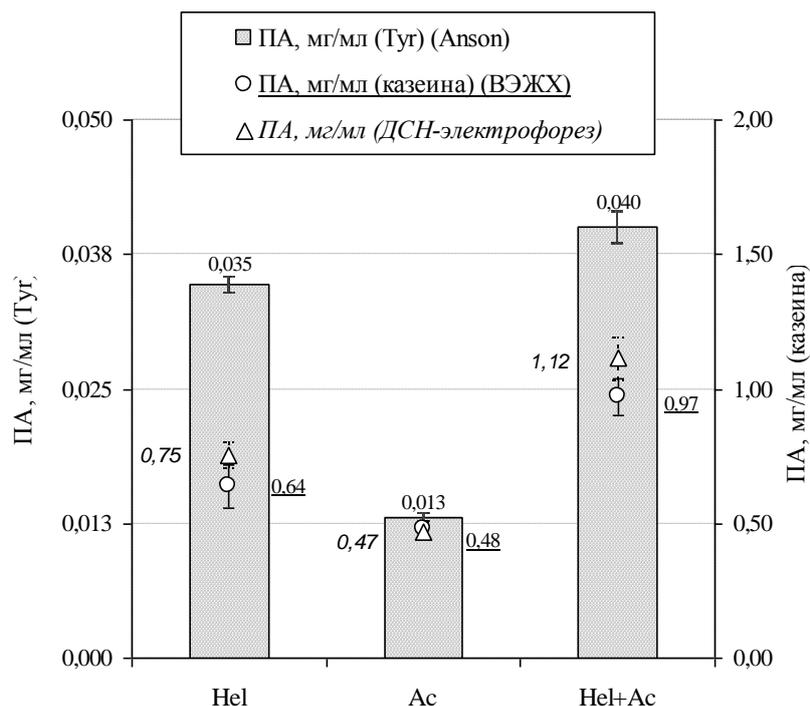


Рисунок 3 – Характеристика уровня протеолитической активности Hel, Ac и их комбинации (Hel+Ac) согласно данным колориметрических исследований, ДСН-электрофореза и ВЭЖХ

Очевидно, что в случае *Lb. helveticus* 382 LA-AV необходимо индивидуально оценивать соотношение количества расщепленного казеина на ДСН-электрофореграмме и хроматограммах и гидролизованной фракции, регистрируемой методом M.L. Anson. С учетом ранее проведенных исследований относительно невысокое количество казеина (0,64–0,75 мг/мл) подвергается расщеплению ферментами из *Lb. helveticus* 1191 TL-A до низкомолекулярных соединений (0,035 мг/мл (Тур), условно соответствующего 1,40 мг/мл гидролизованного субстрата).

Напротив, для *Lb. acidophilus* 2649 TL-O установлена высокая сходимость результатов, полученных с применением всех методических

подходов (рис. 3). В связи с этим при совместной ферментации белков молока *Lb. helveticus* 382 LA-AV и *Lb. acidophilus* 2649 TL-O наблюдается превышение количества установленной низкомолекулярной фракции над фактическим значением расщепленного казеина, что является характерным признаком *Lb. helveticus* 382 LA-AV.

Выявленные отличия в уровне ПА могут быть связаны с накоплением низкомолекулярных пептидов в культуральной среде, что приводит к завышенным значениям ПА при применении колориметрического метода. Кроме того, спектр проведенных исследований не позволяет обсудить особенности транспорта продуктов гидролиза в бактериальную клетку, а также возможные эффекты, возникающие при совместном культивировании штаммов с различными физиолого-биохимическими свойствами. Следует отметить, что *Lb. helveticus* 382 LA-AV развивается в молоке быстрее, чем *Lb. acidophilus* 2649 TL-O, что соответственно обуславливает накопление большего количества микробной биомассы и продуктов протеолиза, которые могут быть использованы другими микроорганизмами при совместной ферментации молочного белка. Установлено возрастание количества гидролизованной казеиновой фракции (по данным ДСН-электрофореза и ВЭЖХ в 1,5-2,2 раза) и глубины ее расщепления при использовании комбинации (Hel + Ac), что определяется различной субстратной специфичностью бактериальных протеолитических систем и синергическим эффектом при совместном их воздействии на белковый компонент молока.

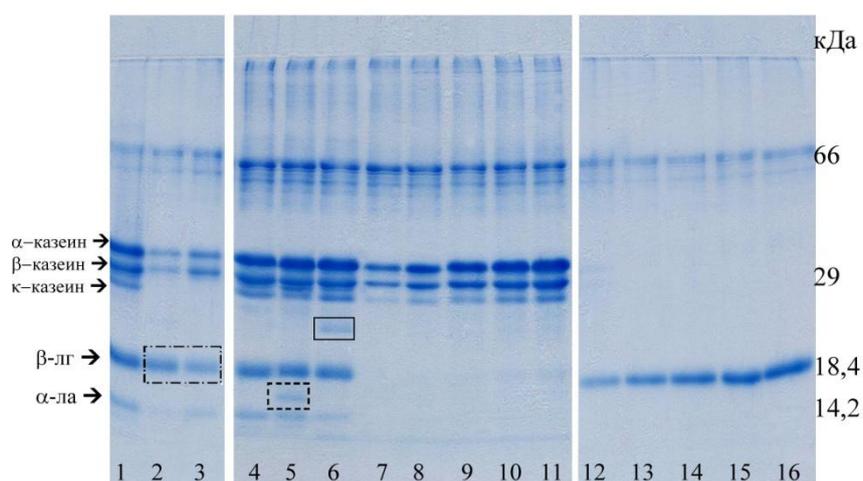
Таким образом, основными характеристиками ПА являются количество гидролизованных белков молока (уровень ПА), а также субстратная специфичность микробных протеаз. Кроме того, в случае подбора микроорганизмов в состав поливидовых заквасок и концентратов необходимо учитывать эффект совместного воздействия протеолитических систем различных бактерий на казеиновую и сывороточную фракции при ферментации молока. Следует особо отметить, что сравнительная характеристика экспериментальных данных, полученных с применением альтернативных методических подходов обеспечивает наиболее полное представление об особенностях бактериального гидролиза белковых фракций молока, об уровне протеолитической активности МКБ различных групп и их комбинаций.

2.2 Определение количества гидролизованного белка в технологическом процессе получения ферментированных молочных продуктов и оптимизация соответствующих методических подходов

Представлена сравнительная характеристика профилей разделения продуктов микробного протеолиза (в кисломолочных продуктах) по молекулярной массе (ДСН-электрофорез), полярности компонентов белково-пептидной смеси (ВЭЖХ), а также по количеству низкомолекулярной фракции белковой природы, не осаждаемой ТХУ и отделяемой ультрафильтрацией.

На ДСН-электрофореграмме (рис. 4) отражен белково-пептидный профиль молока, ферментированного *Lb. helveticus* 382 LA-AV и *Lb. acidophilus* 2649 TL-O (дорожки 5 и 6), и соответствующих образцов после частичного осаждения казеиновой фракции (дорожки 2 и 3). При ферментации ВОМ с использованием *Lb. helveticus* 382 LA-AV и *Lb. acidophilus* 2649 TL-O, обладающих эндопептидазами с различной субстратной специфичностью, обнаружены характерные пептиды (рис. 4, дорожки 5 и 6, в рамке).

Следует особо отметить способность ацидофильной палочки расщеплять основной сывороточный белок – β -лактоглобулин (рис. 4, дорожки 2 и 3, в рамке); вместе с тем, количественный анализ сывороточной фракции затруднен по причине относительного низкого содержания сывороточной фракции в белковой составляющей молока (20 %, где 10 % β -лг).



1 – контроль (ВОМ), 2 – ФМ (Hel, супернатант), 3 – ФМ (Ac, супернатант); 4 – контроль (ВОМ), 5 – ФМ (Ac), 6 – ФМ (Hel); 7 – 0,23 мг/мл $\alpha\beta\kappa$ -смеси, 8 – 0,92 мг/мл, 9 – 1,38 мг/мл, 10 – 1,84 мг/мл, 11 – 2,3 мг/мл; 12 – 0,1 мг/мл β -лг, 13 – 0,2 мг/мл, 14 – 0,3 мг/мл, 15 – 0,4 мг/мл, 16 – 0,5 мг/мл

Рисунок 4 – ДСН-электрофореграмма молока, ферментированного Ac и Hel, смеси стандартов казеинов и β -лг

Согласно результатам ВЭЖХ (рис. 5) в образце, ферментированном *Lb. helveticus* 382 LA-AV, содержится частично гидролизованный β -казеин, тогда как эндопептидазы *Lb. acidophilus* 2649 TL-O расщепляют α - и β -казеин. Это согласуется с особенностями протеолиза казеина и сывороточных белков протеолитическими системами изучаемых лактобацилл, что подробно изложено в п. 2.1.

На рисунке 6 представлены сводные данные количественного анализа низкомолекулярной белковой фракции в образцах ВОМ, ферментированного *Lb. helveticus* 382 LA-AV и *Lb. acidophilus* 2649 TL-O. Степень протеолиза (%) определяли как количество расщепленной фракции по отношению к общему содержанию белка, что отражено на рисунке 6А. Для удобства интерпретации дополнительно представлены данные об общем содержании низкомолекулярной фракции в ферментированном молоке (мг/мл) (рис. 6Б).

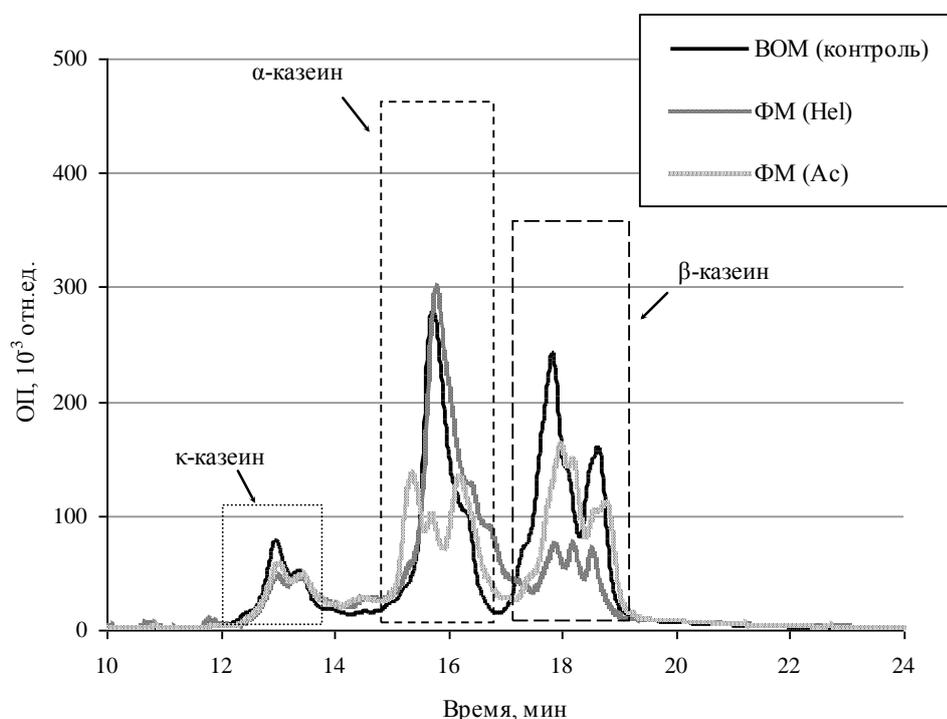


Рисунок 5 – ВЭЖХ-профили молока, ферментированного Hel и Ac

По результатам оценки степени гидролиза с применением различных подходов (ультрафильтрация, осаждение ТХУ и обратнофазной ВЭЖХ) количество расщепленной фракции после ферментации *Lb. helveticus* 382 LA-AV составляет 11,7–16,3 % (или 3,56–4,78 мг/мл), тогда как при внесении *Lb. acidophilus* 2649 TL-O – 9,6–13,7 % (или 2,92–4,03 мг/мл).

В целом, для каждого из примененных методов (ДСН-электрофорез, ВЭЖХ, осаждение ТХУ, ультрафильтрация)

незначительное превышение (<1,5 раза) доли гидролизованного белка показано для *Lb. helveticus* 382 LA-A. Вместе с тем, по результатам колориметрических исследований количество высвобождаемого тирозина возрастает в 1,75 раза.

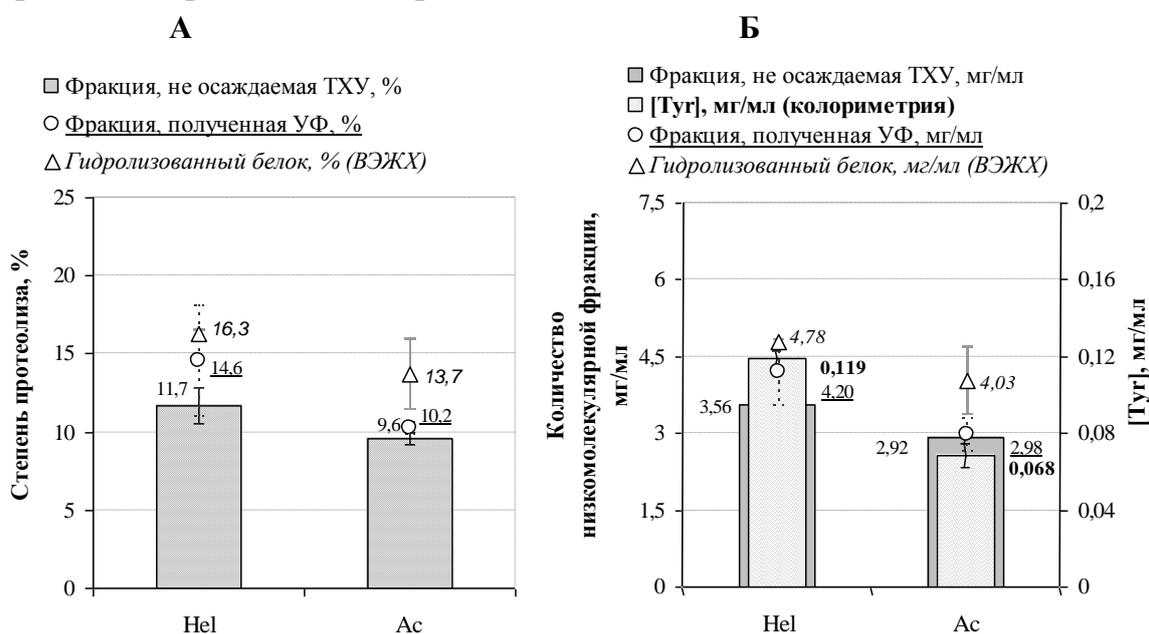


Рисунок 6 – Оценка степени протеолиза (А) и количества низкомолекулярной фракции (Б) молока, ферментированного Hel и Ac согласно определению общего азота в супернатанте после осаждения ТХУ, ультрафильтрате, данным ВЭЖХ (А и Б) и колориметрических исследований (Б)

Заключение. Протеолитическая система молочнокислой бактерии *Lb. helveticus* 382 LA-AV преимущественно расщепляет β -казеин, тогда как эндопептидазы *Lb. acidophilus* 2649 TL-O гидролизуют α -, β - и к-казеин. При совместной ферментации обезжиренного молока указанными лактобациллами увеличивается количество гидролизованного α - и к-казеина, что определяется сочетанием действия микробных протеолитических систем с различной субстратной специфичностью.

Уровень ПА изученных пробиотических бактерий возрастает в последовательности *Lb. acidophilus* 2649 TL-O \rightarrow *Lb. helveticus* 382 LA-AV \rightarrow комбинация и составляет 0,47–1,12 мг / мл (белка), или 0,013–0,040 мг/мл (Тур), что указывает на синергический эффект микроорганизмов при расщеплении казеиновой фракции.

При получении ферментированного молока (в технологическом процессе изготовления кисломолочных продуктов) с применением термофильных лактобацилл *Lb. helveticus* 382 LA-AV и *Lb. acidophilus* 2649 TL-O не установлены существенные различия в количестве гидролизованной фракции. Напротив, особое значение представляют

специфические белково-пептидные профили, полученные при гидролизе казеина протеолитическими системами с различной субстратной специфичностью, а также способность ацидофильной палочки расщеплять преобладающий белок сывороточной фракции (β -лактоглобулин). Применение простых в исполнении и доступных методов, предполагающих определение содержания общего азота в ультрафильтрате и низкомолекулярной фракции (после осаждения ТХУ), целесообразно для оценки суммарного количества расщепленного белка в ферментированном молоке. Вместе с тем, использование относительно трудоемких и более затратных ВЭЖХ и ДСН-электорофореза позволяет установить количество гидролизованного белкового компонента и охарактеризовать специфические белково-пептидные профили.

Дальнейшие исследования предполагается направить на целевой поиск биологически активных пептидов в образцах ферментированного молока, полученного с применением различных пробиотических микроорганизмов и их комбинаций.

Литература

1. 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.
2. Hurley, W.L. Milk protein / W.L. Hurley // *InThech: Croatia*, 2012. – Vol. 1. – P. 3–82.
3. Guedon, E. 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.
4. Den Hengst, C.D. 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.
5. Savijoki, K. Proteolytic systems of lactis acid bacteria / K. Savijoki, H. Ingmer, P. Armament // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 71. – P. 394–406.
6. 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.
7. *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.

**SUBSTRATE SPECIFICITY AND ENZYMATIC ACTIVITY LEVEL
IN THE CLEAVAGE OF MILK PROTEIN FRACTIONS WITH
PROBIOTIC MICROORGANISMS**

Summary

Experimental data on proteolytic activity level of probiotic microorganisms (*Lactobacillus helveticus* 382 LA-AV and *Lb. acidophilus* 2649 TL-O) and their combinations, substrate specificity of bacterial peptidases relative to casein and whey fractions are presented. It became the base for targeting selection of microorganisms for starter cultures and concentrates to get fermented products with preferred depth of milk protein cleavage by specified protein-peptide profile.