

Т.Н. Головач¹, Е.Н. Бирюк¹, Н.Н. Фурик¹, В.П. Курченко²

¹ Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

² Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПРИ СЕЛЕКЦИИ ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР ЛАКТОКОККОВ И ТЕРМОФИЛЬНОГО СТРЕПТОКОККА НА ОСНОВЕ ИХ ПРОТЕЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Введение. К промышленно ценным свойствам молочнокислых бактерий (МКБ) относят способность к кислото-, аромато- и газообразованию, ферментации белкового (протеолиз), углеводного и липидного компонентов молока. Вместе с тем, протеолиз считают наиболее важным биохимическим процессом при изготовлении ферментированных молочных продуктов [1]. Помимо специфических органолептических свойств, протеолитические системы пробиотических МКБ обуславливают образование биологически активных пептидов из казеина, что определяет получение продукта с функциональными свойствами [2].

Ряд современных работ посвящен изучению протеолитической активности (ПА) как различных штаммов МКБ, так и в составе симбиотических заквасок с использованием различных биохимических подходов: денатурирующего (при внесении додецилсульфата натрия, ДСН) электрофореза, иммунохимических методов, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В частности, работа Р. Kabadjova-Hristova et al. (2006) [3] содержит данные о протеолитической активности *Lactobacillus* spp., выделенных из природных кефирных заквасок. Количественную оценку ПА авторы осуществляли спектрофотометрическим методом; субстратную специфичность фермента к различным фракциям казеина определяли с

использованием ДСН-электрофореза. Так штамм *Lb. kefir* DR22х отобран в качестве продуцента фермента с субстратной специфичностью, характерной для протеаз PI-типа, которые предпочтительно гидролизуют β -казеин, тогда как α -казеин устойчив к расщеплению. В исследовании Bertrand-Harb et al. (2003) [4] оценивали содержание белков сывороточной фракции: β -лактоглобулина (β -лг) и α -лактальбумина (α -ла) – на начальных стадиях ферментации йогурта культурами *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (ST 143) и *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB 18 и LB-CH 2). Согласно радиальной иммунодиффузии концентрация сывороточных белков в течение ферментации йогурта не изменялась, что подтверждено результатами ДСН-электрофореза. В свою очередь, M. Pescuma et al. (2007) [5] в соответствии с данными ВЭЖХ и электрофоретического разделения показали способность *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454, *Lb. acidophilus* CRL 636 и *Str. thermophilus* CRL 804 гидролизовать β -лг и α -ла, однако процесс был значительно пролонгирован по сравнению с продолжительностью изготовления кисломолочных продуктов. В представленных работах [3–5] отражено комплексное применение различных методических подходов для анализа белкового состава молока, ферментированного различными микроорганизмами.

В целом, практическая направленность исследований на современном этапе определяется селекцией штаммов МКБ согласно уровню их протеолитической активности и субстратной специфичности микробных протеаз как основы направленного подбора в состав бактериальных заквасок и концентратов для изготовления ферментированных молочных продуктов.

Цель работы состояла в определении уровня протеолитической активности штаммов мезофильных лактококков и термофильного стрептококка и характеристике ферментированного белкового компонента молока.

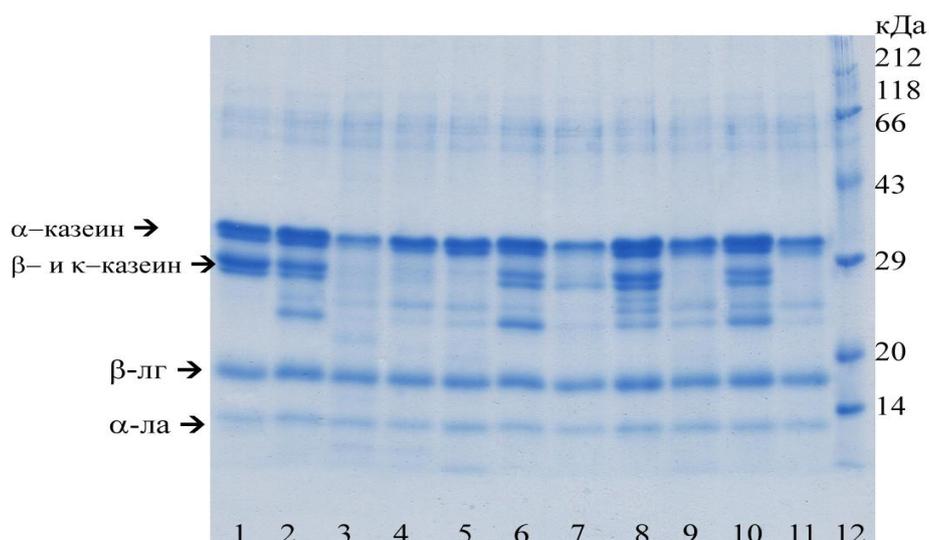
Материалы и методы исследования. В экспериментах использовали 14 штаммов молочнокислых бактерий, в частности: 12 штаммов мезофильных лактококков (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*) и 2 термофильного стрептококка (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), идентифицированных с использованием физиолого-биохимических и молекулярно-генетических методов. Для определения ПА получали бактериальную суспензию из ферментированного обезжиренного молока, проводили ферментативную реакцию, предполагающую инкубирование бактериальной суспензии и восстановленного обезжиренного молока в качестве субстрата (согласно модифицированной методике [3]).

Последующий анализ продуктов протеолиза осуществляли с применением колориметрического метода и электрофоретического разделения. Так анализ ДСН-электрофореграмм [6] позволил установить качественный (субстратную специфичность) и количественный состав ферментированных белков молока. Протеолитическая активность в данном случае определялась количеством белка (мг/мл), расщепленного бактериальной суспензией; убыль белкового субстрата рассчитывали согласно калибровочным графикам для α -, β - и κ -казеина. Вместе с тем, колориметрические исследования [7] были направлены на установление количества не осаждаемых трихлоруксусной кислотой (ТХУ) низкомолекулярных продуктов бактериального протеолиза. ПА определялась количеством тирозина (мг/мл), высвобождаемого в реакции гидролиза белков молока; содержание тирозина в ферментированном молоке определяется по калибровочному графику. Интересным представлялось сопоставление результатов разделения продуктов микробного протеолиза по молекулярной массе и количеству не осаждаемой ТХУ низкомолекулярной фракции, детектируемой колориметрически (λ_{620}). Экспериментально установлено, что

расщепление 1,0 мг/мл (белка) по данным ДСН-электрофореза условно соответствует 0,025 мг/мл (тирозина), регистрируемого колориметрическим методом.

Результаты и их обсуждение. По результатам экспериментальной работы определен белковый профиль 14 образцов ферментированного молока и уровень ПА соответствующих молочнокислых бактерий; охарактеризована специфичность действия бактериальных протеаз по отношению к белкам казеиновой фракции: α -, β - и κ -казеину (рис.1–3; табл. 1).

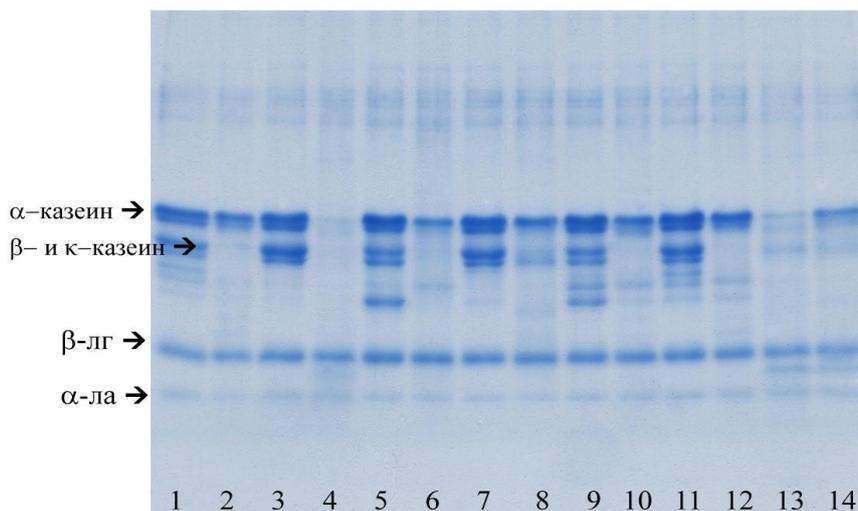
Согласно ДСН-электрофореграммам (рис.1 и 2) бактериальные протеазы в смеси белков молока преимущественно расщепляют β -казеин, тогда как сывороточные белки (β -лг и α -ла) практически не ферментируются.



1 – контроль, обезжиренное молоко (2,5 мг/мл), 2 – 2691 М-А (контроль), 3 – 2691 М-А (ФМ); 4 – 2694 М-А (ФМ); 5 – 2687 М-А (ФМ); 6 – 2697 М-AD (контроль), 7 – 2697 М-AD (ФМ); 8 – 2690 М-А (контроль), 9 – 2690 М-А (ФМ); 10 – 2692 М-А (контроль), 11 – 2692 М-А (ФМ); 12 – маркер.

Рисунок 1 – ДСН-электрофореграмма образцов обезжиренного молока, ферментированного *Lc. lactis* 2687 М-А, 2690 М-А, 2691 М-А, 2692 М-А и 2694 М-А, *Lc. diacetylactis* 2697 М-AD

Специфичность действия протеаз *Str. thermophilus* 2698 ST-AV и *Lc. lactis* 2693 M-A не установлена в связи с эффективным расщеплением всех белков казеиновой фракции (рис. 2: дорожки 4 и 13).



1 – 2689 M-A (контроль), 2 – 2689 M-A (ФМ); 3 – 2693 M-A (контроль), 4 – 2693 M-A (ФМ); 5 – 2696 M-AD (контроль), 6 – 2696 M-AD (ФМ); 7 – 2695 M-AD (контроль), 8 – 2695 M-AD (ФМ); 9 – 2685 M-A (контроль); 10 – 2685 M-A (ФМ); 11 – 2688 M-A (контроль); 12 – 2688 M-A (ФМ); 13 – 2698 ST-AV (ФМ); 14 – 2699 ST-AV.

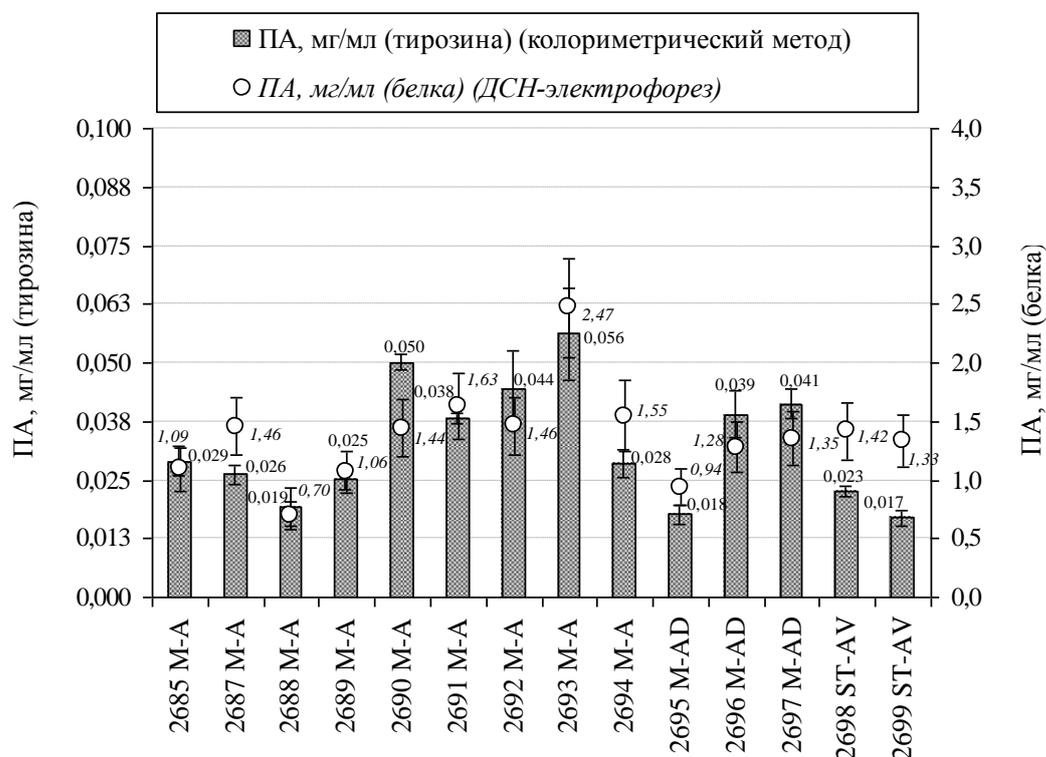
Рисунок 2 – ДСН-электрофореграмма образцов молока, ферментированного *Lc. lactis* 2685 M-A, 2688 M-A, 2689 M-A и 2693 M-A, *Lc. diacetylactis* 2695 M-AD и 2696 M-AD, *Str. thermophilus* 2698 ST-AV и 2699 ST-AV

Кроме того, на ДСН-электрофореграммах, выявлено образование аналогичных промежуточных продуктов гидролиза белков казеиновой фракции с молекулярной массой (mr) 29 кДа $>mr > 20$ кДа. Полученные пептидные профили указывают на сходство сайтов протелиза при воздействии ферментов изучаемых лактококков на казеин.

На рисунке 3 отражена высокая сходимость результатов, полученных колориметрическим и электрофоретическим методами.

Для 10 из 12 штаммов мезофильных лактококков показано соответствие расщепленного казеина количеству тирозина, высвобождаемому в результате гидролиза основного белка молока.

Вместе с тем, для обоих штаммов *Str. thermophilus* характерно превышение доли гидролизованного казеина над количеством выявляемого тирозина. Заниженные количества определяемого тирозина могут быть обусловлены образованием олигопептидов, осаждаемых ТХУ, тогда как убыль субстрата учитывается при обсчете электрофореграмм. Возможным представляется поглощение пептидов бактериальной клеткой или, напротив, накопление продуктов протеолиза во внешней среде. Спектр проведенных исследований не позволяет обсудить особенности транспорта продуктов гидролиза в бактериальную клетку. В связи с этим для наиболее полного представления об особенностях расщепления белков молока микробными протезами и уровне ПА необходим комплексный анализ с использованием колориметрического и электрофоретического методов.



Lc. (l) – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; Lc. (d) – *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*;
St. – *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophiles*

Рисунок 3 – Характеристика уровня ПА различных представителей МКБ согласно данным ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле и колориметрическим исследованиям

Таблица 1 – Распределение *Lactococcus* spp. и *Str. thermophilus* по группам согласно уровню протеолитической активности и субстратной специфичности

Группы МКБ		Перечень МКБ
Уровень ПА	низкий 0–1,0 мг/мл (белка) 0–0,025 мг/мл (тирозина)	<i>Lc. lactis</i> 2688 M-A <i>Lc. diacetylactis</i> 2695 M-AD ⁽¹⁾
	средний 1,0–2,0 мг/мл (белка) 0,025–0,050 мг/мл (тирозина)	<i>Lc. lactis</i> 2687 M-A ⁽²⁾ , 2690 M-A ⁽³⁾ , 2691 M-A, 2692 M-A и 2694 M-A; <i>Lc. diacetylactis</i> 2696 M-AD и 2697 M-AD; <i>Str. thermophilus</i> 2698 ST-AV ⁽¹⁾ и 2699 ST-AV ⁽¹⁾
	высокий >2,0 мг/мл (белка) >0,050 мг/мл (тирозина)	<i>Lc. lactis</i> 2693 M-A
Предпоч- тительное расщепление субстрата в смеси казеинов	α-казеин	–
	β-казеин	<i>Lc. lactis</i> 2685 M-A, 2687 M-A, 2688 M-A, 2689 M-A, 2690 M-A, 2691 M-A, 2692 M-A и 2694 M-A; <i>Lc. diacetylactis</i> 2695 M-AD, 2696 M-AD и 2697 M-AD; <i>Str. thermophilus</i> 2698 ST-AV ⁽¹⁾
	специфичность не выявлена	<i>Lc. lactis</i> 2693 M-A, <i>Str. thermophilus</i> 2699 ST-AV

Примечание. ⁽¹⁾ – По данным колориметрических исследований штамм отнесен к группе с низким, ⁽²⁾ – промежуточным (низким/ средним, ≈0,025 мг/мл (тирозина)), ⁽³⁾ – промежуточным (средним/ высоким, ≈0,050 мг/мл (тирозина)) уровнем ПА

По результатам количественного анализа расщепленной казеиновой фракции 4 из 12 изученных штаммов мезофильных лактококков отнесены к группе с низким и промежуточным уровнем ПА (≈0,025 мг/мл (тирозина) или ≈1,0 мг/мл (белка)); вместе с тем, в группу со средним уровнем ПА включены 7 штаммов. Максимальное количество гидролизованного субстрата (главным образом, α-казеина) выявлено в образце молока, ферментированного высокоактивными протеазами *Lc. lactis* 2693 M-A.

Вывод. При изучении субстратной специфичности протеолитических систем *Lactococcus* spp. (11 из 12 штаммов) и

Str. thermophilus 2698 ST-AV установлено, что в смеси казеинов (α -, β - и κ -фракция) ферментированного молока наблюдается преимущественное расщепление β -казеина. Наряду с этим, специфичность действия протеаз *Str. thermophilus* 2698 ST-AV и *Lc. lactis* 2693 M-A не установлена в связи с эффективным расщеплением всех белков казеиновой фракции. Протеолитические ферменты изученных мезофильных лактококков и термофильного стрептококка не используют сывороточные белки в качестве субстрата. Для большинства *Lactococcus* spp. (11 из 12 штаммов) уровень ПА не превышает 2,0 мг/мл гидролизованного белка (или 0,050 мг/мл тирозина), что обусловлено, главным образом, низкой эффективностью гидролиза α -казеина.

Представленная сравнительная характеристика экспериментальных данных, полученных с применением альтернативных методов: ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле и колориметрических исследований – обеспечивает наиболее полное представление об особенностях расщепления поликомпонентной белковой составляющей молока и уровне ПА микроорганизмов.

Системный подход при определении состава бактериальных заквасок и концентратов с учетом протеолитической активности микроорганизмов предполагает разделение МКБ на группы в соответствии с уровнем ПА и субстратной специфичностью.

Литература

1. Savijoki, K. Proteolytic systems of lactic acid bacteria / K. Savijoki, H. Ingmer, P. Armament // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 71. – P. 394–406.
2. Ebringer, L. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products – Review / L. Ebringer, M. Ferenčík, J. Krajčovič // Folia Microbiol. – 2008. – Vol. 53, № 5. – P. 378–394.

3. Evidence for proteolytic activity of lactobacilli isolated from kefir grains // P. Kabadjova-Hristova [et al.] // Biotechnol. Equip. – 2006. – Vol. 20. – P. 89–94.

4. Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yogurt fermentation / C. Bertrand-Harb [et al.] // Int. Dairy J. – 2003. – Vol. 13. – P. 39–45.

5. Hydrolysis of whey proteins by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium / M. Pescuma [et al.] // J. Appl. Microbiol. - 2007. – Vol. 103. – P. 1738–1746.

6. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. – М.: Наука; 1981. – С. 56–65.

7. Исследование пищеварительного аппарата у человека / А.М. Уголев [и др.] – Л: Наука, 1969. – 216 с.

T.N. Halavach, A.N. Biruk, N.N. Furik, V.P. Kurchenko

BIOCHEMICAL APPROACHES FOR SELECTION OF STARTER CULTURES OF LACTOCOCCI AND THERMOPHILIC STREPTOCOCCI BASED ON THEIR PROTEOLYTIC ACTIVITY

Summary

Substrate properties of casein and whey protein fractions from skim milk during the protein reduction with proteolytic systems of mesophilic lactococci and thermophilic streptococci have been investigated. The level of proteolytic activity of *Lactococcus* spp. and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (14 strains) has been established on the basis of colorimetric studies and SDS-electrophoretic separation of products obtained by bacterial proteolysis.