

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

¹ РУП «Институт мяско-молочной промышленности»,

² Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФЕРМЕНТАЦИИ БЕЛКОВ МОЛОКА (КАЗЕИНОВОЙ И СЫВОРОТОЧНОЙ ФРАКЦИЙ) МЕЗОФИЛЬНЫМИ И ТЕРМОФИЛЬНЫМИ ЛАКТОБАЦИЛЛАМИ

Введение

Изучение физиолого-биохимических и промышленно ценных свойств молочнокислых бактерий (МКБ), в частности *Lactobacillus* spp., является актуальным направлением исследований прикладной биотехнологии, что связано с широким применением микроорганизмов в различных отраслях пищевой промышленности, в частности, сыроделии [1], при изготовлении йогуртов [2], заквасок [3] и обработке мяса [4]. *Lactobacillus* spp., главным образом, используют в качестве заквасочных культур для получения ферментированных молочных продуктов. Кроме того, среди МКБ выявлены пробиотические микроорганизмы и продуценты биологически активных пептидов [5, 6].

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 (ПКС). Образовавшиеся олигопептиды поглощаются посредством специфического пептидного транспорта и в дальнейшем под действием различных внутриклеточных пептидаз расщепляются на короткоцепочечные пептиды и аминокислоты [7, 8]. Пептидный и аминокислотный состав гидролизованного белка молока определяет специфические органолептические свойства ферментированных продуктов.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в изучении свойств очищенных бактериальных протеаз, установлении механизмов их каталитического действия, особенностей расщепления отдельных белков казеиновой фракции и соответствующих пептидных карт [9–11]. В то же время представлены противоречивые данные о специфичности действия ПКС, выделенных из различных представителей рода *Lactobacillus*, на α -, β - и κ -казеины. Так в работе М.С. Broome & М.В. Hickey (1991) [12] для протеазы из *Lb. casei* показан гидролиз α -, β - и κ -казеинов; однако Н.М. Khalid & Е.Н. Marth (1990) не выявили расщепление β -казеина [13]. Напротив, М. Kojic et al. (1991) [14] подтвердили гидролиз исключительно β -казеина. При изучении протеазы из *Lb. plantarum* установлено сходство с ферментом из *Lb. casei* [15–17], хотя еще существуют разногласия о специфичности действия протеаз [18, 19]. Для *Lb. helveticus* в результате

активности специфической ПКС показано образование низкомолекулярных пептидов из α - и β -казеина [20].

В связи с этим 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), что предполагает использование бактериальных клеток (в частности, бактериальной суспензии).

Практическая значимость данных об уровне протеолитической активности термофильных и мезофильных бактерий рода *Lactobacillus*, 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.

Цель работы – установление особенностей расщепления белков молока (казеиновой и сывороточной фракций) протеолитическими системами мезофильных и термофильных лактобацилл и определение уровня их протеолитической активности.

Материалы и методы исследования

Для получения образцов ферментированных молочных белков применяли молоко обезжиренное сухое (СОМ) 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 ≥ 70 %), β -казеин (м.д. белка 98 %) и κ -казеин (м.д. белка ≥ 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.

Определение протеолитической активности молочнокислых бактерий (согласно модифицированной методике [21]). Готовили 10% раствор СОМ (восстановленное сухое обезжиренное молоко, 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 ВОМ в течение 18 ч при оптимальной температуре (таблица 1) и оценивали 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 получение бактериальной суспензии образцы ферментированного ВОМ смешивали с фосфатно-цитратным буфером (рН 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 измеряли ОП₆₀₀ бактериальной суспензии. С целью приготовления реакционной смеси 0,5 мл бактериальной суспензии смешивали с 0,5 мл фосфатно-цитратного буфера рН 5,5 и рН 6,5. В качестве субстрата использовали 0,5% раствор 0,5% раствор белков молока (СОМ производства Fluka, Швейцария) в фосфатно-цитратном буфере (рН 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% трихлоруксусной кислоты (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.

Таблица 1. Перечень лактобацилл, используемых в эксперименте

Паспортный номер	Видовая принадлежность	Оптимальные условия культивирования	
		рН	Т, °С
Термофильные лактобациллы			
1186 LA-AVF	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5,5±0,2	37±1
2649 TL-O	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5,5±0,2	37±1
2650 TL-O	<i>Lactobacillus fermentum</i>	5,5±0,2	37±1
2652 TL-O	<i>Lactobacillus fermentum</i>	5,5±0,2	37±1
2637 TL-O	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	5,5±0,2	37±1
2643 TL-O	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	5,5±0,2	37±1
1191 TL-A	<i>Lactobacillus helveticus</i>	5,5±0,2	37±1
382 LA-AV	<i>Lactobacillus helveticus</i>	5,5±0,2	37±1
Мезофильные лактобациллы			
1196 ML-OFR	<i>Lactobacillus casei</i>	5,5±0,2	34±1
1189 ML	<i>Lactobacillus casei</i>	5,5±0,2	34±1
1157 ML-AF	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5,5±0,2	34±1
1180 ML-OF	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5,5±0,2	34±1

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) [22] согласно описанию [21]. 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 (P. Kabadjova-Hristova et al., 2006), предполагающей использование ДСН-электрофоретического анализа в полиакриламидном геле [23].

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 [23].

Анализ электрофореграмм проводили с помощью системы геле-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 $ОП_{600}=1,0$. Расщепленный белок рассчитывали согласно калибровочным графикам для α -, β - и κ -казеина.

Результаты и их обсуждение

Изучены особенности ферментации белков молока (казеиновой и сывороточной фракций) мезофильными и термофильными лактобациллами. В качестве объекта исследований использовали молочнокислые бактерии, перечень которых представлен в таблице 1. Протеолитическую активность анализировали при рН 5,5 и рН 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 рН 6,6–6,8 (таблица 1), тогда как при ферментации молока значение активной кислотности понижается до $рН \leq 5,5$.

Так как синтез протеаз имеет индуцибельный характер [9–11], МКБ культивировали в пастеризованном обезжиренном молоке в течение 18 ч при оптимальной температуре (таблица 1) и оценивали полученный сгусток (1-я перевивка); далее ферментированным ВОМ инокулировали очередную порцию пастеризованного молока, выдерживали в течение 24 ч, фиксировали значение рН образовавшегося сгустка и его консистенцию (2-я перевивка); образцы хранили при 8°C.

Из ферментированного обезжиренного молока получали бактериальную суспензию. Реакционную смесь, содержащую бактериальную суспензию и белковый субстрат (ВОМ), инкубировали при оптимальной температуре (таблица 1) в течение 24 ч в фосфатно-цитратном буфере (рН 5,5 и рН 6,5); после протеолиза образцы анализировали с использованием ДСН-электрофореза в 12% ПААГ и методом M. Kunitz.

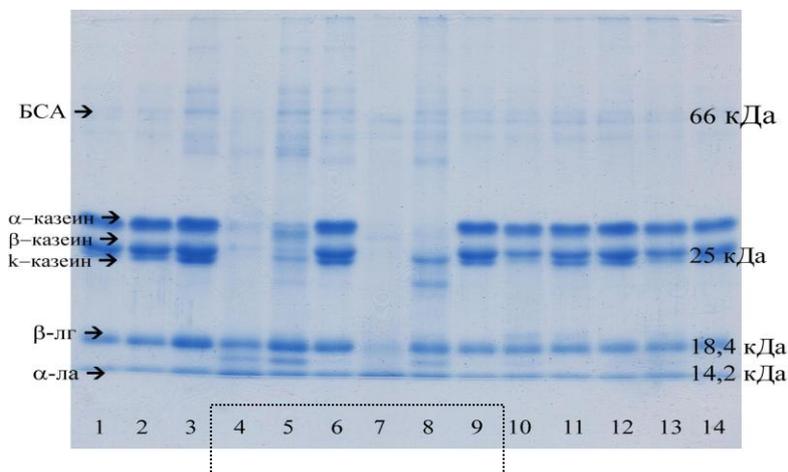
Получены экспериментальные данные об особенностях гидролиза белков молока протеолитическими системами термофильных МКБ: *Lb. acidophilus* 1186 LA-AVF, *Lb. acidophilus* 2649 TL-O, *Lb. fermentum* 2650 TL-O, *Lb. fermentum* 2652 TL-O. Для *Lb. acidophilus* 1186 LA-AVF показано образование плотных сгустков при сваживании обезжиренного молока, тогда как для *Lb. acidophilus* 2649 TL-O установлена менее плотная консистенция. В то же время оба штамма *Lb. fermentum* обладали низкой сквашивающей активностью при 1-й перевивке; после 2-й перевивки МКБ практически не развивались в пастеризованном ВОМ.

На рисунке 1 представлена ДСН-электрофореграмма образцов ферментированного обезжиренного молока. 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 1, дорожки 3–8, в рамке). Не установлена способность расщеплять белки молочной сыворотки при ферментации штаммами *Lb. fermentum* (рисунок 1, дорожки 9–14).

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 1, дорожки 3–8). Для *Lb. fermentum* 2650 TL-O и 2652 TL-O большой уровень ПА установлен при pH 5,5 (рисунок 1, дорожки 9–14).

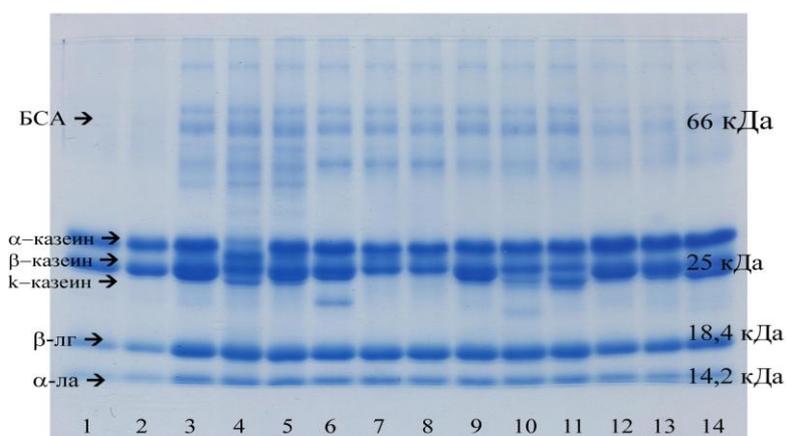
Определена протеолитическая активность термофильных лактобацилл *Lb. helveticus* 1191 TL-A и 382 LA-AV, *Lb. rhamnosus* 2637 TL-O и 2643 TL-O. Образование плотных сгустков при сквашивании ВОМ (1–2-я перевивки) показано для штаммов *Lb. helveticus*, слабо структурированных – для *Lb. rhamnosus*. Для штаммов *Lb. helveticus* 1191 TL-A и *Lb. rhamnosus* 2637 TL-O возрастание ПА выявлено при pH 5,5; β -лактоглобулин оказался устойчив к протеолизу. Продукты ферментации обезжиренного молока указанными штаммами отражены на рисунке 2.

Изучены особенности ферментации белков молока представителями группы мезофильных лактобацилл: *Lb. casei* 1196 ML-OFR и 1189 ML, *Lb. plantarum* 1157 ML-AF и 1180 ML-OF. Для всех исследуемых штаммов характерно образование плотных сгустков после 1-й перевивки; после 2-й – лишь для штаммов *Lb. casei*.



1 – контроль BOM, pH 5,5; 2 – контроль BOM, pH 6,5;
 3 – *Lb. acidophilus* 1186 LA-AVF (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при pH 5,5, 5 – при pH 6,5; 6 – *Lb. acidophilus* 2649 TL-O (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза при pH 5,5; 8 – при pH 6,5; 9 – *Lb. fermentum* 2650 TL-O (контроль, суспензия), 10 – продукты протеолиза при pH 5,5, 11 – при pH 6,5; 12 – *Lb. fermentum* 2652 TL-O (контроль, суспензия), 13 – продукты протеолиза при pH 5,5, 14 – при pH 6,5

Рис. 1. ДСН-электрофореграмма (12% ПААГ) образцов BOM, ферментированного *Lb. acidophilus* 1186 LA-AVF и 2649 TL-O, *Lb. fermentum* 2650 TL-O и 2652 TL-O

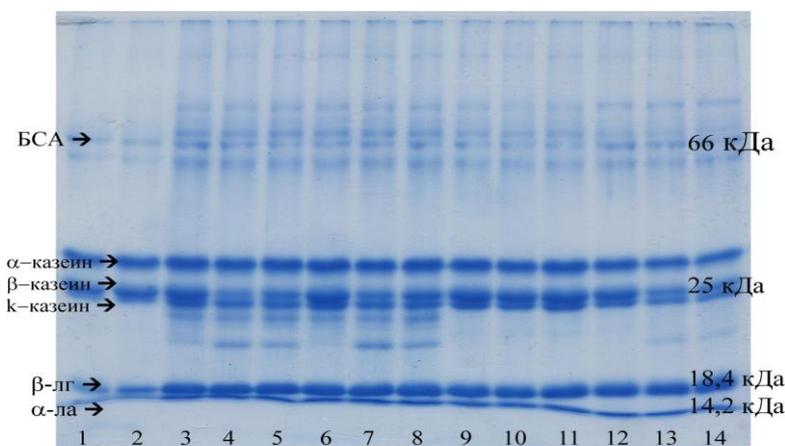


1 – контроль BOM, pH 5,5; 2 – контроль BOM, pH 6,5;
 3 – *Lb. helveticus* 1191 TL-A (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при pH 5,5, 5 – при pH 6,5; 6 – *Lb. helveticus* 382 LA-AV (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза при pH 5,5; 8 – при pH 6,5; 9 – *Lb. rhamnosus* 2637 TL-O (контроль, суспензия), 10 – продукты протеолиза при pH 5,5, 11 – при pH 6,5; 12 – *Lb. rhamnosus* 2643 TL-O (контроль, суспензия), 13 – продукты протеолиза при pH 5,5, 14 – при pH 6,5

Рис. 2. ДСН-электрофореграмма (12% ПААГ) образцов BOM, ферментированного *Lb. helveticus* 1191 TL-A и 382 LA-AV, *Lb. rhamnosus* 2637 TL-O и 2643 TL-O

Белковый и пептидный профиль ВОМ, ферментированного штаммами *Lb. casei* и *Lb. plantarum*, представлен на рисунке 3. Для перечисленных выше МКБ выявлено предпочтительное расщепление β -казеина; β -лактоглобулин и κ -казеин не подвергались протеолизу бактериальными эндопептидазами. Предпочтительным для расщепления белков молока протеазами *Lb. casei* 1196 ML-OFR и 1189 ML, *Lb. plantarum* 1157 ML-AF является pH 5,5 (рисунок 3, дорожки 3–11). В то же время для *Lb. plantarum* 1180 ML-OF при pH 5,5 и 6,5 различия в количестве гидролизованных субстратов не установлены (рисунок 3, дорожки 12–14).

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



1 – контроль ВОМ, pH 5,5; 2 – контроль ВОМ, pH 6,5;
 3 – *Lb. casei* 1196 ML-OFR (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при pH 5,5,
 5 – при pH 6,5; 6 – *Lb. casei* 1189 ML (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза
 при pH 5,5; 8 – при pH 6,5; 9 – *Lb. plantarum* 1157 ML-AF (контроль, суспензия), 10 –
 продукты протеолиза при pH 5,5, 11 – при pH 6,5; 12 – *Lb. plantarum* 1180 ML-OF
 (контроль, суспензия), 13 – продукты протеолиза при pH 5,5, 14 – при pH 6,5

Рис. 3. ДСН-электрофореграмма (12% ПААГ) образцов ВОМ, ферментированного *Lb. casei* 1196 ML-OFR и 1189 ML, *Lb. plantarum* 1157 ML-AF и 1180 ML-OF

Штаммы *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus* и *Lb. fermentum* отнесены к различным группам на основании значений протеолитической активности, что указывает на ее вариабельность среди исследованных МКБ. Высокий уровень ПА (> 2 мг/мл или >2000 ЕА/мл) при pH реакционной смеси 5,5 и 6,5 установлен для *Lb. acidophilus* 1186 LA-AVF и 2649 TL-О; так максимальное количество расщепленного казеина показано при pH 5,5 – 2,8–3,3 мг/мл (или $(4,4–5,9) \times 10^3$ ЕА/мл). Низкий уровень ПА характерен для представителей *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* и *Lb. casei* (<1,0 мг/мл или <1000 ЕА/мл). В целом, штаммы исследованных мезофильных

лактобацилл отнесены к группе с низкой протеолитической активностью, тогда как для термофильных лактобацилл выявлен широкий разброс значений ПА (таблица 2).

Таблица 2. Характеристика *Lactobacillus* spp. согласно уровню протеолитической активности, оптимума pH, субстратной специфичности

Группы МКБ		Перечень МКБ
Уровень протеолитической активности, ПА	низкий 0–1,0 мг/мл 0–1000 ЕА/мл	<i>Lb. rhamnosus</i> 2643 TL-O и 2637 TL-O, <i>Lb. plantarum</i> 1157 ML-AF и 1180 ML-OF, <i>Lb. casei</i> 1189 ML и 1196 ML-OFR, <i>Lb. helveticus</i> 382 LA-AV ⁽²⁾ и 1191 TL-A ⁽³⁾
	средний 1,0–2,0 мг/мл 1000–2000 ЕА/мл	<i>Lb. fermentum</i> 2652 TL-O ^(1, 5)
	высокий >2,0 мг/мл >2000 ЕА/мл	<i>Lb. acidophilus</i> 1186 LA-AVF ⁽⁴⁾ и 2649 TL-O ⁽⁴⁾
Предпочтительное значение pH	pH 5,5	<i>Lb. fermentum</i> 2650 TL-O ⁽⁷⁾ и 2652 TL-O, <i>Lb. helveticus</i> 1191 TL-A, <i>Lb. casei</i> 1196 ML-OFR и 1189 ML, <i>Lb. plantarum</i> 1157 ML-AF ⁽⁷⁾ , <i>Lb. rhamnosus</i> 2637 TL-O ⁽⁷⁾
	pH 6,5	–
	не влияет	<i>Lb. rhamnosus</i> 2643 TL-O, <i>Lb. helveticus</i> 382 LA-AV, <i>Lb. acidophilus</i> 2649 TL-O ⁽⁸⁾ и 1186 LA-AVF ⁽⁸⁾ , <i>Lb. plantarum</i> 1180 ML-OF ⁽⁸⁾
Предпочтительное расщепление субстрата в смеси казеинов	α-казеин	–
	β-казеин	<i>Lb. helveticus</i> 1191 TL-A и 382 TL-A, <i>Lb. fermentum</i> 2650 TL-O и 2652 TL-O ⁽⁹⁾ , <i>Lb. rhamnosus</i> 2637 TL-O, <i>Lb. casei</i> 1196 ML-OFR и 1189 ML, <i>Lb. plantarum</i> 1157 ML-AF ⁽⁹⁾ и 1180 ML-OF
	специфичность не выявлена	<i>Lb. acidophilus</i> 2649 TL-O и 1186 LA-AVF, <i>Lb. rhamnosus</i> 2643 TL-O

Примечание

По данным *спектрофотометрических исследований* штамм отнесен к группе с низким ⁽¹⁾, промежуточным (≈ 1000 ЕА/мл) ⁽²⁾, низким (pH 5,5)/ средним (pH 6,5) ⁽³⁾, промежуточным (≈ 2000 ЕА/мл, pH 5,5)/ высоким (pH 6,5) ⁽⁴⁾ уровнем ПА; по результатам *ДСН-электрофореза* уровень ПА при pH 6,5 и 5,5 низкий и промежуточный (≈ 1 мг/мл) соответственно ⁽⁵⁾, при pH 6,5 и 5,5 промежуточный (≈ 1 мг/мл) и высокий соответственно ⁽⁶⁾. Согласно *методу М. Kunitz* pH не влияет на уровень ПА ⁽⁷⁾, оптимальным является pH 5,5 ⁽⁸⁾. При pH 6,5 специфичность действия протеаз в смеси казеинов не установлена ⁽⁹⁾.

В соответствии с данными электрофоретических и спектрофотометрических исследований *Lb. fermentum* 2652 TL-O, *Lb. helveticus* 1191 TL-A, *Lb. casei* 1196 ML-OFR и 1189 ML проявляют большую ПА при значении pH реакционной смеси 5,5; для *Lb. rhamnosus* 2643 TL-O, *Lb. helveticus* 382 LA-AV не остановлено влияние pH на количество гидролизованного казеина (таблица 2).

В отличие от данных ДСН-электрофореза, отклонения в уровне ПА при pH 5,5/6,5 в ЕА/мл (метод М. Kunitz, 1946) не выявлены для штаммов

Lb. fermentum 2650 TL-O, *Lb. plantarum* 1157 ML-AF и *Lb. rhamnosus* 2637 TL-O (таблица 2).

Согласно количественному анализу ДСН-электрофореграмм изменение активной кислотности среды не приводит к достоверным различиям ПА при ферментации ВОМ *Lb. acidophilus* 1186 LA-AVF и 2649 TL-O, *Lb. plantarum* 1180 ML-OF, однако спектрофотометрические исследования указывают на преимущественный протеолиз при pH 5,5.

Выявленные отличия в уровне ПА и при различных показателях pH (в частности, у штаммов *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* и *Lb. rhamnosus* 2637 TL-O), обусловлены, во-первых, образованием промежуточных продуктов протеолиза, отделяемых от исходных белков электрофоретически, но осаждаемых трихлоруксусной кислотой, и во-вторых, возможным поглощением низкомолекулярной гидролизованной фракции бактериальными клетками, что приводит к заниженным значениям ПА при использовании спектрофотометрического метода.

Установлена различная субстратная специфичность при изучении продуктов ферментации обезжиренного молока мезофильными и термофильными лактобациллами. Для штаммов *Lb. casei*, *Lb. helveticus*, а также *Lb. fermentum* 2650 TL-O, *Lb. plantarum* 1180 ML-OF и *Lb. rhamnosus* 2637 TL-O показано преимущественное расщепление β -казеина в смеси белков казеиновой фракции при pH 5,5 и 6,5. Специфичность действия протеолитических систем *Lb. acidophilus* 2649 TL-O и 1186 LA-AVF (в образцах ферментированного обезжиренного молока обнаруживаются следовые количества как α -, так и β -казеина), *Lb. fermentum* 2652 TL-O и *Lb. plantarum* 1157 ML-AF (при pH 6,5), *Lb. rhamnosus* 2643 TL-O на белки казеиновой фракции не установлена. В целом, протеолитические ферменты 7 из 12 изученных штаммов при pH реакционной смеси 5,5 и 6,5 используют в качестве предпочтительного источника пептидов и аминокислот β -казеин. Гидролиз основного белка молочной сыворотки (β -лактоглобулина) установлен только для высокоактивных штаммов *Lb. acidophilus*.

Вывод

Изучены особенности протеолиза казеиновой и сывороточной фракций обезжиренного молока протеолитическими системами мезофильных и термофильных лактобацилл (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*; *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. helveticus*; 12 штаммов).

Привлечение альтернативных методов анализа продуктов бактериального протеолиза: ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле и спектрофотометрического метода – позволило 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).

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 аминокислотным составом).

Литература

1 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.

2 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.

3 Spicher, G. Proteolytic activity of sourdough bacteria / G. Spicher, W. Nierle // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1988. – Vol. 28. – P. 487–492.

4 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.

5 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.

6 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.

7 The proteolytic systems of lactic acid bacteria / E.R.S. Kunji [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1996. – Vol. 70. – P. 187–221.

8 Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria / J.E. Christensen [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1999. – Vol. 76. – P. 217–246.

9 Kok, J. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria / J. Kok // *FEMS Microbiology Reviews.* – 1990. – Vol. 87. – P. 15-42.

10 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.

11 Savijoki, K. Proteolytic systems of lactic acid bacteria / K. Savijoki, H. Ingmer, P. Armament // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2006. – Vol. 71. – P. 394–406.

12 Broome, M.C. Proteinase activity of non-starter lactobacilli / M.C. Broome, M.W. Hickey // *Aust. J. Dairy Technol.* – 1991. – P. 11–18.

13 Khalid, N.M. Lactobacilli – their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review / N.M. Khalid, E.H. Marth // J. Dairy Sci. – 1990. – Vol. 73. – P. 2669–2684.

14 Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14 / M. Kojic [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – Vol. 57. – P. 1753–1757.

15 Hegazi, F.Z. Factors affecting the caseinolytic activity of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* / F.Z. Hegazi, I.G. Abo-Elnaga // Nahrung. – 1987. – Vol. 31. – P. 199–206.

16 Hegazi, F.Z. Proteolytic activity of crude cell-free extract of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* / F.Z. Hegazi, I.G. Abo-Elnaga // Nahrung. – 1987. – Vol. 31. – P. 225–232.

17 Cell-wall-associated proteinases in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* / M. El Soda [et al.] // J. Food Protect. – 1986. – Vol. 49. – P. 361–365

18 Broome, M.C. Proteinase activity of non-starter lactobacilli / M.C. Broome, M.W. Hickey // Aust. J. Dairy Technol. – 1991. – P. 11–18.

19 Khalid, N.M. Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* / N.M. Khalid, E.H. Marth // J. Dairy Sci. – 1990. – Vol. 73. – P. 3068–3076.

20 Zevaco, C. Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus* / C. Zevaco, J.-C. Gripon // Lait. – 1988. – Vol. 68. – P. 393–408.

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

22 Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties / M. Kunitz // J. Gen. Physiol. - 1946. – Vol. 30. – P. 291–310.

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

T.N. Halavach ¹, N.K. Zhabanos ¹, N.N. Furik ¹, V.P. Kurchenko ²

¹RUE «Institute of Meat and Dairy Industry»,

²Belarusian State University, Minsk, Belarus

FEATURES OF MILK PROTEIN FERMENTATION (CASEIN AND WHEY FRACTIONS) WITH MESOPHILIC AND THERMOPHILIC LACTOBACILLI

Summary

Experimental data on the hydrolysis characteristics of casein and whey protein fractions during skim milk fermentation with mesophilic and thermophilic lactobacilli, effect of medium acidity on the cleavage of substrates has been obtained. The proteolytic activity of *Lactobacillus* spp. (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*; *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. helveticus*; 12 strains) has been established on the basis of spectrophotometric studies and SDS-electrophoretic separation of samples with fermented skimmed milk.