

**CASEIN FRACTIONS PROTEOLYSIS BY LACTOCOCCUS ENZYMES**

V. Yukalo, L. Storozh, G. Semenyshyn

Ternopil Ivan Puluj National Technical University

**Key words:**

*Proteolysis*  
*Casein fractions*  
*Lactococcus*  
*Electrophoresis*

**Article history:**

Received 02.09.2020  
Received in revised form  
15.09.2020  
Accepted 24.09.2020

**Corresponding author:**

V. Yukalo

**E-mail:**

biotech@tu.edu.te.ua

**ABSTRACT**

Enzymes of proteolytic systems of lactic acid bacteria play an important role in the milk proteins proteolysis processes. Moreover, the specificity of the proteolytic action of their cell-envelop proteinases is of great importance for the bioactive peptides formation. Most of the currently known methods used to characterize proteolysis allow to establish the total degree of proteolysis of all milk proteins. Existing methods for determining the sensitivity of individual protein fractions of milk to the action of proteolytic enzymes are often quite complex or time-consuming and cannot be used for mass studies of the specificity of proteolysis of individual protein fractions of milk. Especially this applies to studies of weak proteolytic systems of lactic acid bacterial strains. The aim of the study was to quantitatively characterize the specificity of the lactococcus proteolytic systems action in relation to the main fractions of milk casein complex proteins.

Nine strains of lactic acid lactococcus of the subspecies *Lcc. lactis* ssp. *lactis* (I<sub>7</sub>, I<sub>9</sub> and I<sub>10</sub>), *Lcc. lactis* ssp. *cremoris* (C<sub>4</sub>, C<sub>10</sub> and C<sub>11</sub>) and *Lcc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (D<sub>2</sub>, D<sub>5</sub> and D<sub>11</sub>) were used for the study. Native micellar casein was isolated as a substrate in the system “skim milk—acid polysaccharide—water”. The content of uncleaved casein fractions after the action of cell-envelop lactococcus proteinases was analyzed by express electrophoresis in a homogeneous polyacrylamide gel. According to the results of densitometry of the obtained electrophoregrams, the studied strains were divided into two groups. The first group includes strains I<sub>10</sub>, D<sub>5</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>10</sub>, which better cleave β-casein, which is characteristic for cell-envelop proteinases of the P<sub>I</sub> type. The remaining strains mainly cleave κ- and α<sub>S1</sub>-caseins, because they contain proteinase of the P<sub>III</sub> type. Thus, the use of quantitative express electrophoresis and micellar casein as a native casein substrate will allow to establish the specificity of cell-envelop proteinases of lactic acid lactococcus.

## ПРОТЕОЛІЗ КАЗЕЇНОВИХ ФРАКЦІЙ ЕНЗИМАМИ ЛАКТОКОКІВ

В. Г. Юкало, Л. А. Сторож, Г. М. Семенишин

*Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя*

*У процесах протеолізу білків молока важливу роль відіграють ензими протеолітичних систем молочнокислих бактерій. Причому для утворення біоактивних пептидів велике значення має специфічність протеолітичної дії їхніх приклітинних протеїназ. Більшість відомих на сьогодні методів, що використовуються для характеристики протеолізу, дають змогу встановити загальний ступінь протеолізу всіх білків молока. Існуючі методи визначення чутливості окремих білкових фракцій молока до дії протеолітичних ензимів часто є досить складними або довготривалими і не можуть бути використані для масових досліджень специфічності протеолізу окремих білкових фракцій молока. Особливо це стосується досліджень слабких протеолітичних систем штамів молочнокислих бактерій.*

*У статті кількісно охарактеризовано специфічність дії протеолітичних систем лактококів щодо основних фракцій білків казеїнового комплексу молока.*

*Для дослідження використано дев'ять штамів молочнокислих лактококів підвидів *Lcc. lactis ssp. lactis* ( $l_7$ ,  $l_9$  і  $l_{10}$ ), *Lcc. lactis ssp. cremoris* ( $c_4$ ,  $c_{10}$  і  $c_{11}$ ) і *Lcc. lactis ssp. lactis biovar diacetilactis* ( $d_2$ ,  $d_5$  і  $d_{11}$ ). Як субстрат виділено нативний міцелярний казеїн у системі «знежирене молоко-кислий полісахарид-вода». Вміст нерозщеплених казеїнових фракцій після дії приклітинних протеїназ лактококів проаналізовано експрес-електрофорезом в однорідному поліакриламідному гелі. За результатами денситометрії отриманих електрофореграм досліджувані штами розділено на дві групи. До першої групи віднесено штами  $l_{10}$ ,  $d_5$ ,  $c_4$ ,  $c_{10}$ , які краще розщеплюють  $\beta$ -казеїн, що характерно для приклітинних протеїназ типу  $P_I$ . Решта штамів переважно розщеплюють  $\kappa$ - і  $\alpha_{S1}$ -казеїни, оскільки в них наявна протеїназа типу  $P_{II}$ . Використання кількісного експрес-електрофорезу та міцелярного казеїну як нативного казеїнового субстрату дасть змогу встановити специфічність приклітинних протеїназ молочнокислих лактококів.*

**Ключові слова:** протеоліз, казеїнові фракції, лактококи, електрофорез.

**Постановка проблеми.** Від специфічності протеолізу білків молока, насамперед казеїнових фракцій, залежить формування багатьох показників харчової цінності молочних продуктів. Це стосується реологічних властивостей, процесів ензимної коагуляції молока, утворення компонентів запаху і смаку, утворення широкого спектра природних біологічно активних пептидів. Проте більшість існуючих методів, які використовуються для характеристики протеолізу, дають змогу встановити загальний ступінь протеолізу всіх білків молока. Існуючі методи визначення чутливості окремих білкових фракцій молока до дії протеолітичних ензимів часто є доволі складними або довготривалими. Такі методи не можуть бути використані для масових досліджень специфічності протеолізу білкових фракцій молока. Особливо це стосується досліджень відносно слабких протеолітичних систем різних штамів молочнокислих бактерій.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Відомо, що важливу роль у протеолізі білків молока відіграють три групи протеолітичних ензимів. Це насамперед природні протеази молока, протеази молокозгортальних препаратів та ензими протеолітичних систем молочнокислих бактерій.

Специфічність основних протеаз молока — плазміну і катепсину D добре вивчена. Зокрема, встановлено шляхи утворення  $\gamma$ -казеїнів, компонентів протеозопептонної фракції за участі плазміну [1]. Ензими молокозгортальних препаратів є більш активними протеолітами. Переважно для отримання згустків при виробництві різних видів сирів використовують хімозин, отриманий із сичугів тварин або шляхом рекомбінації. Специфічність дії цього ензиму щодо казеїнових фракцій детально досліджена [2]. Замінники хімозину мікробіологічного або рослинного походження характеризуються більш широкою специфічністю, але в останні роки для згортання молока вони використовуються менше. Іноді виникає проблема встановлення специфічності протеолізу для традиційних молокозгортальних препаратів. До них можна віднести «Глек», який виробляють в українських Карпатах і використовують для виробництва гуцульської бринзи і м'якого сиру «Будз» [3].

Протеолітичні ензими молочнокислих бактерій, які використовуються для виробництва молочних продуктів, загалом характеризуються низькою активністю порівняно з першими двома групами. Проте вони більш мінливі і потребують постійного контролю їх активності та специфічності протеолітичної дії. Сукупність протеаз молочнокислих бактерій об'єднують поняттям «протеолітична система». Вона складається з приклітинних протеїназ і мембранних та внутрішньоклітинних пептидаз. Для утворення біоактивних пептидів велике значення має специфічність протеолітичної дії приклітинних протеїназ. Склад і активність пептидаз важливі для процесів розщеплення гірких пептидів казеїнового походження [4].

Відомо декілька підходів до визначення специфічності дії протеолітичних систем щодо різних фракцій білків молока. Це довготривале інкубування бактерій у знежиреному стерилізованому молоці. При цьому можна отримати не зовсім об'єктивні дані у зв'язку з утворенням комплексів протеїнів сироватки молока і казеїнових міцел під час стерилізації [1]. Також використовують очищені фракції білків молока. Це може призвести до зміни умов протеолізу і втрати нативної структури та складу білків молока при виділенні [5].

Зважаючи на зазначене вище, перспективним може бути використання нативного міцелярного казеїну, а також кількісного електрофорезу [6]. Такий підхід, на нашу думку, дасть змогу оперативної й об'єктивної встановити специфічність протеолітичних систем щодо білкових фракцій молока.

**Мета дослідження:** кількісно охарактеризувати специфічність дії протеолітичних систем лактококів щодо основних фракцій білків казеїнового комплексу молока.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили з використанням дев'яти штамів молочнокислих лактококів підвидів *Lec. lactis* ssp. *lactis* (l<sub>7</sub>, l<sub>9</sub> і l<sub>10</sub>), *Lec. lactis* ssp. *cremoris* (c<sub>4</sub>, c<sub>10</sub> і c<sub>11</sub>) і біовару *Lec. lactis* ssp. *lactis* *biovar* *diacetilactis* (d<sub>2</sub>, d<sub>5</sub> і d<sub>11</sub>), які зберігаються на кафедрі харчової біотехнології і хімії ТНТУ імені Івана Пулюя. Штами були отримані з Литовського харчового інституту (м. Каунас). Штами пересівали в знежирене стерилізоване молоко. Між пересівами зберігали

при 4°C. Титровану кислотність під час розвитку лактококів визначали загально-прийнятими методами і виражали в градусах Тернера (°Т). Протеолітичну активність лактококів визначали за модифікованим методом М. В. Залашка.

Загальний казеїн виділяли зі знежиреного молока осадженням в ізоелектричній точці (рН 4,6). Нативний міцелярний казеїн виділяли в системі «знежирене молоко-кислий полісахарид-вода» [7]. Вміст казеїнових фракцій аналізували експрес-електрофорезом в однорідному поліакриламідному гелі (ПАГ), як описано у [6]. Денситограми будували за методом [8].

Концентрацію казеїну визначали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі  $\lambda=280$  нм. При цьому використовували коефіцієнт поглинання  $D_{1\text{см}}^{1\%} - 8,2$ .

**Результати і обговорення.** У дослідженнях були використані протеїназо-позитивні штами лактококів. Відбір протеїназо-позитивних штамів проводили на основі їхнього росту у стерильному знежиреному молоці при 30°C протягом 12 годин. Потім в живильному середовищі визначали концентрацію пептидів і амінокислот після осадження протеїнів 10-процентною трихлороцтовою кислотою. До протеїназо-позитивних відносили штами, якщо концентрація пептидів і амінокислот збільшувалася порівняно з контролем. У випадку протеїназо-негативних штамів концентрація їх зменшувалася у зв'язку з використанням клітинами лактококів для росту.

Відібрані дев'ять штамів протеїназо-позитивних лактококів були протестовані на здатність утворювати молочну кислоту. Ця характеристика тісно пов'язана із протеолітичною активністю штамів. Всі штами можна віднести до хороших кислотоутворювачів (табл. 1).

*Таблиця 1. Кислотоутворювальна і протеолітична активність лактококів у процесі культивування в знежиреному молоці (M±m, n=3)*

Штами протеїназо-позитивних лактококів	Кислотоутворювальна (°Т) і протеолітична (мг%) активність штамів лактококів					
	24 години		48 годин		168 годин	
	°Т	мг%	°Т	мг%	°Т	мг%
<i>Lcc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>						
l <sub>7</sub>	92±5	0,3±0,02	102±6	7,5±0,5	111±6	11,2±0,7
l <sub>9</sub>	67±4	0,49±0,03	74±4	1,7±0,2	97±5	3,25±0,4
l <sub>10</sub>	64±4	0,55±0,03	83±4	1,2±0,1	112±6	2,1±0,2
<i>Lcc. lactis</i> biovar <i>diacetilactis</i>						
d <sub>2</sub>	56±3	0,27±0,02	77±4	1,9±0,2	98±5	3,1±0,3
d <sub>5</sub>	60±4	0,14±0,01	76±4	1,8±0,2	97±5	2,7±0,3
d <sub>11</sub>	83±5	1,3±0,1	90±5	1,6±0,2	104±6	4,1±0,4
<i>Lcc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>						
c <sub>4</sub>	62±4	2,5±0,3	85±4	2,7±0,3	95±5	3,5±0,3
c <sub>10</sub>	57±3	1,3±0,1	81±4	1,6±0,2	92±5	3,7±0,3
c <sub>11</sub>	96±5	3,9±0,4	107±6	4,5±0,4	110±6	9,0±0,6

Також у всіх штамів була визначена загальна протеолітична активність протягом 24, 48 і 168 год культивування в знежиреному молоці (табл. 1). За класифікацією М. В. Залашка два штами (l<sub>7</sub> і c<sub>11</sub>) можна віднести до сильних протеолітів, п'ять штамів (l<sub>9</sub>, d<sub>2</sub>, d<sub>11</sub>, c<sub>4</sub> і c<sub>10</sub>) — до середніх протеолітів і два — до слабких (l<sub>10</sub> і d<sub>5</sub>). Отримані результати також свідчать про те, що сильні протеоліти є також найсильнішими кислотоутворювачами (l<sub>7</sub> і c<sub>11</sub>), хоча прямого зв'язку між кислотоутворенням і загальною протеолітичною активністю немає. Так,

слабкий протеоліт (штам I<sub>10</sub>) показав найвищу кислотоутворювальну активність серед цих відібраних штамів. Літературні дані теж свідчать про відсутність прямої залежності між цими показниками [4].

Для встановлення специфічності дії приклітинних протеїназ штамів лактококів було вибрано як субстрат нативний міцелярний казеїн, отриманий зі свіжого знежиреного молока при розшаруванні системи «білок-кислий полісахарид-вода», як описано у [7]. Цей казеїн характеризується природним співвідношенням основних казеїнових фракцій, а також просторовою будовою казеїнових міцел, яка близька до нативних міцел у молоці.

Для проведення аналізу вмісту нерозщеплених казеїнових фракцій після дії приклітинних протеїназ лактококів було вибрано експрес-електрофорез у пластинках ПАГ. Цей метод дає змогу надійно кількісно ідентифікувати основні казеїнові фракції ( $\alpha_{S1}$ -CN,  $\alpha_{S2}$ -CN,  $\beta$ -CN і  $\kappa$ -CN), які відрізняються первинною структурою [6]. Саме первинна структура казеїнових фракцій є визначальною для утворення певних БАП, а також компонентів запаху і смаку [1]. Денситограма електрофореграми міцелярного казеїну, отриманої за допомогою експрес-електрофорезу, показана на рис.

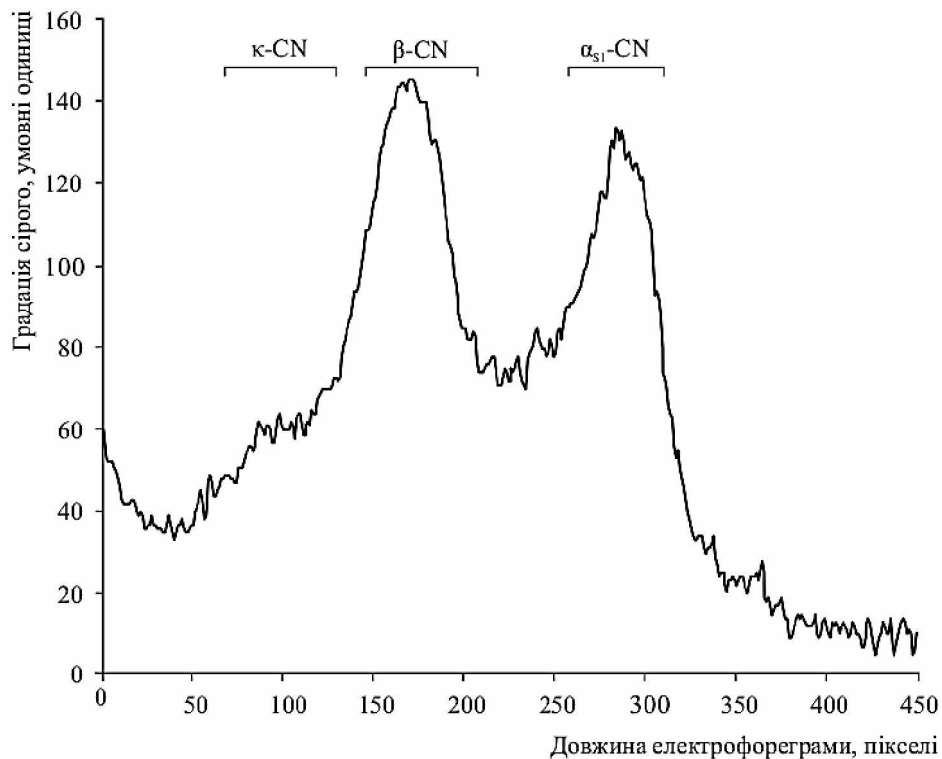


Рис. Денситограма загального казеїну, отримана експрес-електрофорезом в однорідній системі ПАГ

Протеоліз 2-процентного субстрату проводили при 30°C протягом трьох годин концентратом клітин лактококів кожного штаму, як описано раніше [9]. Вирощені таким чином клітини зберігають природний склад протеолітичних

систем і, насамперед, приклітинних протеїназ. Після інкубації клітини відділяли центрифугуванням. Потім ізоелектрично осаджували нерозщеплений казеїн і осад аналізували експрес-електрофорезом. Результати кількісної обробки денситограм представлені в табл. 2.

**Таблиця 2. Ступінь розщеплення казеїнових фракцій за результатами денситометрії електрофореграм розчину казеїну після культивування з клітинами лактококів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

Штами протеїназо-позитивних лактококів	Кількість нерозщеплених казеїнових фракцій, %		
	$\alpha_{S1}$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN
<i>Lcc. lactis ssp. lactis</i>			
l <sub>7</sub>	71±4	92±3	57±5
l <sub>9</sub>	75±3	95±2	49±5
l <sub>10</sub>	93±2	66±4	79±3
<i>Lcc. lactis biovar diacetylactis</i>			
d <sub>2</sub>	91±3	71±4	83±3
d <sub>5</sub>	77±3	93±2	49±6
d <sub>11</sub>	75±4	90±2	55±5
<i>Lcc. lactis ssp. cremoris</i>			
c <sub>4</sub>	89±3	68±5	89±3
c <sub>10</sub>	94±2	70±4	86±3
c <sub>11</sub>	79±4	93±2	59±5

Отримані результати дають змогу умовно розділити всі штами лактококів на дві групи. У першу групу входять штами, які більшою мірою розщеплюють  $\beta$ -казеїн — l<sub>10</sub>, d<sub>5</sub>, c<sub>4</sub>, c<sub>10</sub>. Така специфічність характерна для приклітинних протеїназ типу P<sub>I</sub> [4]. Протеїнази інших штамів переважно розщеплюють  $\kappa$ - і  $\alpha_{S1}$ -казеїни. У цих штамів наявна протеїназа типу P<sub>III</sub>. Необхідно також зазначити, що у всіх випадках найчутливішою фракцією до дії приклітинних протеїназ є  $\kappa$ -казеїн. Можливо, це пов'язано з тим, що відповідно до більшості моделей казеїнових міцел він розміщений на їхній поверхні [1].

### **Висновок**

Використання кількісного експрес-електрофорезу та міцелярного казеїну як нативного казеїнового субстрату дає змогу встановити специфічність приклітинних протеїназ молочнокислих лактококів. Це було підтверджено на дев'яти штаммах двох підвидів (*Lcc. lactis ssp. lactis* і *Lcc. lactis ssp. cremoris*) та одного біовару (*Lcc. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*).

### **Література**

1. Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. Dairy Chemistry and Biochemistry (Second Edition). New York: Springer, 2015. 585 p. doi: 10.1007/978-3-319-14892-2.
2. Бородай С. В., Бондарчук З. В. Дія ензимних молокозсідальних препаратів на протеїновий комплекс молока. *Biotechnologia Acta*. 2010. Т. 3, № 4. С. 29—36.
3. Iukalo A. V. Milk-coagulation and proteolytic activity of «Glek» carpathian enzyme preparation. *Biotechnologia Acta*. 2015. Vol. 8, № 2. P. 91—95. doi: 10.15407/biotech8.02.091.
4. Yukalo V. G., Krupa O. M. The proteolytic systems of lactic acid microorganisms: a review. *Ukrainian Food Journal*. 2017. Vol. 6., Is. 3. P. 417—432. doi: 10.24263/2304-974X-2017-6-3-3.

5. Юкало А. В., Цісарик О. Й. Специфічність дії приклітинних протеїназ лактококів по відношенню до казеїнових фракцій. *Біологія тварин*. 2015. Т. 17, № 3. С. 139—144.
6. Iukalo A. V. Identification of protein fractions of milk cows casein complex. *Ukr. Biochem. J.* 2015. Vol. 87, № 4. P. 87—91. doi: 10.15407/ubj87.04.087.
7. Юкало В. Г., Сторож Л. А., Барська Н. М. Характеристика міцел казеїну, виділених у системі «вода-білки-кислий полісахарид». *Наукові праці НУХТ*. 2008. № 24. С. 63—65.
8. Юкало В. Г., Яворський Б. І., Сторож Л. А., Соловдзінська І. Є. Кількісний електрофоретичний аналіз білків казеїнового комплексу. *Біологія тварин*. 2007. Т. 9, № 1—2. С. 295—298.
9. Yukalo V. G. Casokinines creation during model proteolysis of  $\alpha_{S1}$ -casein by protease positive strains of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska*. 2004. V. 16. P. 70—73.