

УДК 577.155.1

В.Г. Юкало, д-р біол. наук
Л.А. Сторож
Тернопільський державний
технічний університет
ім. І. Пулюя

ПРОТЕОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ПРИКЛІТИННИХ І ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ ФЕРМЕНТІВ У ЛАКТОКОКІВ

Запропоновано новий підхід до визначення протеолітичної активності молочнокислих бактерій. Метод може бути корисним для селекції лактококів з різною протеолітичною активністю приклітинних і внутрішньоклітинних ферментів.

Ключові слова: лактококи, протеоліз, протеолітична активність, протеїнази, гіркі пептиди.

The new approach for investigation of the lactic acid bacteria proteolytic activity has been suggested. The method may be useful for selection of lactococci with different proteolytic activity of wall-bond and intracellular enzymes.

Key words: lactococci, proteolysis, proteolytic activity, proteinases, bitter peptides.

Клітини лактококів характеризуються складною протеолітичною системою, до якої входять протеїнази різної локалізації. Їх поділяють на приклітинні, мембранні і внутрішньоклітинні [6, 9]. Приклітинні протеази відносяться до протеїназ, а внутрішньоклітинні — представлені переважно пептидазами. В молочному середовищі каталітична дія всіх цих ферментів спрямована на розщеплення білків молока (в першу чергу казеїнів) до амінокислот, які в подальшому використовуються клітинами лактококів. Визначення протеолітичної активності лактококів ускладнюється тим, що внаслідок різної локалізації протеолітичних ферментів одна частина продуктів протеолізу потрапляє у живильне середовище, а інша знаходиться в клітинах і використовується ними для синтезу білків. Врахувати всі компоненти цих продуктів з метою визначення протеолітичної активності лактококів практично неможливо. Існуючі методи дозволяють оцінити продукти протеолізу, що залишаються в середовищі, а також частково пептиди і амінокислоти в клітинах. На практиці, зокрема при виробництві ферментованих молочних продуктів, важливе значення має як загальна активність протеолітичної системи лактококів, так і співвідношення активностей приклітинних і внутрішньоклітинних протеаз лактококів. Тому метою даної роботи є дослідження співвідношення активностей протеолітичних ферментів лактококів різної локалізації.

У роботі використовували штами лактококів підвиду *Lactococcus lactis subsp. lactis* (I₃, I₅, I₆, I₇, I₈, I₉, I₁₀, I₁₁, I₁₂, I₁₇, I₁₉), які культивуються на кафедрі харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя. Пересіви мікроорганізмів у знежирене стерилізоване молоко здійснювали через 20 днів. Зберігали лактококи при температурі 4°C. Протеолітичну активність лактококів визначали за методом М.В. Залашка [2]. Оптичну густину забарвлених продуктів протеолізу визначали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 650 нм. Значення оптичної густини перераховували на вміст тирозину і триптофану в мг % за калібрувальним графіком. У роботі показано середні результати 5-7 вимірювань. Концентрацію молочної кислоти визначали за методом [6] і виражали її у градусах Тернера (°Т) [1]. Загальну кількість життєздатних клітин лактококів визначали посівом у чашки Петрі з агаризованим гідролізованим молоком. Здатність штамів утворювати гір-

© В.Г. Юкало, Л.А. Сторож, 2011

Розділ 1. Актуальні проблеми ... досліджень харчових продуктів

кі пептиди з білків казеїнового комплексу встановлювали методом [3]. Попередньо культури вирощували в молоці із стерильним розчином сичужного ферменту і крейдою при 30°C протягом 7 днів.

У роботі для детальнішого вивчення протеолітичних властивостей лактококів були використані окремі штами підвиду *Lactococcus lactis subsp. lactis* з різним рівнем протеолітичної активності. Протеолітичну активність визначали через кожні 12 годин протягом десяти діб при культивуванні трьох штамів (1₇, 1₁₂, 1₁₉), які можна віднести до сильних протеолітів, та двох штамів (1₉, 1₁₀), які можна віднести до слабких протеолітів відповідно до класифікації М.В. Залашка [2]. Результати визначень показані на рис. 1. Залежно від зміни протеолітичної активності можна виділити декілька періодів у процесі розвитку лактококів. Перший період (0-48 годин) характеризується різким збільшенням продуктів протеолізу в середовищі. Після цього настає коротка стабілізація протеолітичної активності (48-72 години). Для обох слабких протеолітів цей період затягується до 96 годин. Далі

спостерігається друге збільшення протеолітичної активності (72-168 годин). Після семи діб інкубування настає четвертий період, під час якого протеолітична активність зростає дуже повільно. Деяко іншим є характер залежності активності кислотоутворення від тривалості культивування досліджуваних штамів (рис.2). Різкі зміни у швидкості кислотоутворення відсутні до моменту досягнення максимальної концентрації молочної кислоти в середовищі.

Для пояснення отриманих результатів на різних етапах культивування кожного із штамів визначали кількість життєздатних клітин (рис.3). Виявилось, що на початку інкубування наростання протеолітичної активності корелює з кількістю життєздатних клітин лактококів. На час закінчення зростання концентрації молочної кислоти в середовищі спостерігається максимальна кількість клітин для всіх п'яти штамів. Друге підвищення протеолітичної активності виявляється при зменшенні в середовищі кількості життєздатних клітин. Їх кількість зменшується до десятків тисяч в 1 мл внаслідок інтенсивного відмирання. Така динаміка росту лактококів по-різно-

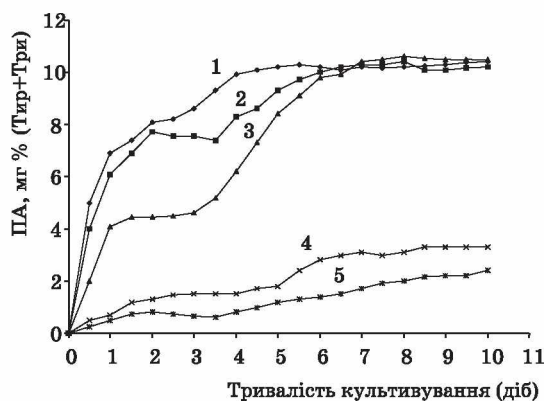


Рис.1. Залежність протеолітичної активності штамів *Lac. lactis subsp. lactis* від тривалості культивування: 1 — штам 1₁₂, 2 — штам 1₇, 3 — штам 1₁₉, 4 — штам 1₉, 5 — штам 1₁₀

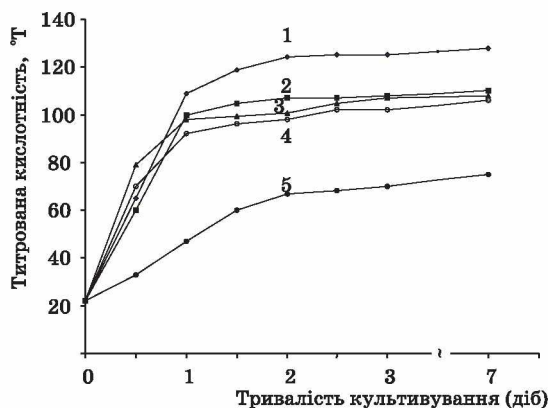


Рис. 2. Зміна титрованої кислотності у живильному середовищі при культивуванні лактококів *Lac. lactis subsp. lactis*: 1 — штам 1₁₉, 2 — штам 1₁₂, 3 — штам 1₇, 4 — штам 1₁₀, 5 — штам 1₉

му відображається на процесах протеолізу білків середовища та продукуванні молочної кислоти. Очевидно, це можна пояснити різною локалізацією ферментів, які каталізують вказані процеси. Причому, ферменти, які відповідають за утворення молочної кислоти, містяться всередині клітин лактококів, а протеолітичні ферменти лактококів поділяють на позаклітинні (приклітинні і мембранні) та внутрішньоклітинні [6]. Зважаючи на це динаміку зміни протеолітичної активності можна пояснити так. Перше зростання протеолітичної активності лактококів обумовлене дією приклітинних і мембранних протеаз. Друге зростання пов'язане із дією внутрішньоклітинних ферментів і виходом продуктів протеолізу з клітин у середовище внаслідок їх відмирання і лізису, що узгоджується з літературними даними [8].

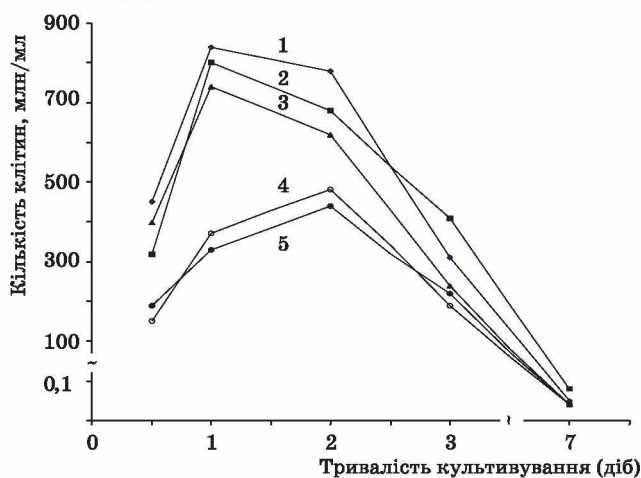


Рис. 3. Залежність кількості клітин лактококів *Lac. lactis subsp. lactis* від тривалості культивування:
 1 — штам l_{19} , 2 — штам l_{12} , 3 — штам l_7 ,
 4 — штам l_{10} , 5 — штам l_9

Відомо, що при виробництві ферментованих молочних продуктів під час вибору лактококів до складу стартових культур враховують їх загальну протеолітичну активність [5]. Висока загальна протеолітична активність лактококів є найважливішою умовою інтенсивного росту лактококів, а також високого рівня кислотоутворення. Разом з тим, іншою важливою характеристикою їх протеолітичних систем є співвідношення активностей позаклітинних і внутрішньоклітинних протеаз. Було показано, що приклітинні протеїнази розщеплюють білки казеїнового комплексу (у першу чергу це стосується β -казеїну) з утворенням гірких пептидів [4], що є небажаним у виробництві окремих ферментованих молочних продуктів. Утворені гіркі пептиди можуть розщеплюватися до амінокислот внутрішньоклітинними протеазами. Штами лактококів з високою активністю внутрішньоклітинних протеаз забезпечують деградацію гірких пептидів, внаслідок чого знижується рівень гіркого смаку і покращується якість продукту. На відміну від них, лактококи з високою активністю приклітинних протеїназ можуть звільняти більше біологічно активних пептидів з білків казеїнового комплексу молока [7, 10].

У ряді робіт при оцінці співвідношення активності протеолітичних ферментів різної локалізації здійснювали фракціонування клітин лактококів, виділення окремих ферментів, визначення їх активності. Цей процес трудомісткий,

Розділ 1. Актуальні проблеми ... досліджень харчових продуктів

довготривалий і не може бути застосований у випадку тестування великої кількості штамів при відборі їх для внесення у закваски. В зв'язку з цим нами запропоновано проводити оцінку локалізації ферментів лактококів за співвідношенням загальних протеолітичних активностей, визначених на другу ($ПА_2$) і сьому ($ПА_7$) добу їх культивування:

$$K_{II} = \frac{ПА_7}{ПА_2}$$

де K_{II} — умовний критерій протеолітичної активності.

Значення $ПА_2$ відображає переважно активність позаклітинних протеаз лактококів, а $ПА_7$ — внутрішньоклітинних. Необхідно зазначити, що умовний критерій протеолітичної активності не характеризує загальну протеолітичну активність, а лише співвідношення активностей внутрішньоклітинних і приклітинних протеаз. При цьому значення K_{II} може співпадати або бути близьким для активних і слабких протеолітів, тому при відборі штамів лактококів необхідно враховувати дані про загальну протеолітичну активність їх протеаз.

Нами були визначені K_{II} для відібраних одинадцяти штамів лактококів, а також їхня здатність утворювати гірки на смак пептиди при розщепленні казеїнових фракцій. Результати наведені у таблиці.

Таблиця. Залежність здатності лактококів утворювати гірки на смак пептиди з казеїну від співвідношення їх протеолітичних активностей ($ПА_7/ПА_2$)

Штами лактококів	Протеолітична активність мг% тирозину і триптофану		Критерій відбору K_{II}	Гіркота середовища на смак* (бали)
	через 2 доби	через 7 діб		
l_3	-0,50	0,25	1,7	0,5
l_5	0,29	0,50	1,7	0,5
l_6	0,37	1,80	4,9	0
l_7	7,80	10,30	1,3	1,0
l_8	1,20	1,90	1,6	1,0
l_9	1,40	2,75	2,0	0
l_{10}	0,80	1,80	2,3	0
l_{11}	0,87	1,70	2,0	<0,5
l_{12}	8,00	10,20	1,3	0
l_{17}	5,00	12,90	2,6	0
l_{19}	4,80	10,60	2,2	0

Примітка. 2,0 бали — сильна гіркота; 1,5 бала — середня гіркота; 1,0 бала — слабка гіркота; 0,5 бала — дуже слабка гіркота; 0 балів — відсутність гіркоти.

Для вказаних штамів значення умовного критерію протеолітичної активності знаходиться в межах від -0,5 до 4,9. Як правило, чим більше значення K_{II} , тим менше утворюється гірких пептидів у культуральному середовищі. При значеннях $K_{II} > 2$ спостерігається відсутність гіркоти в середовищі. Це може бути викликне меншим утворенням їх під час протеолізу казеїнів приклітинними протеїназами або розщепленням гірких пептидів внутрішньоклітинними протеолітичними ферментами лактококів.

Висновки. На основі дослідження динаміки зміни протеолітичної активності лактококів на різних етапах їх культивування в молочному середовищі запропоно-

Розділ 1. Актуальні проблеми ... досліджень харчових продуктів

вано умовний критерій, який дозволяє оцінити співвідношення активностей протеолітичних ферментів різної локалізації. Такий критерій можна використовувати при підборі штамів лактококів для внесення до складу бактеріальних заквасок з метою запобігання утворенню гірких на смак пептидів при виробництві ферментованих молочних продуктів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Банникова Л.А. Микробиологические основы молочного производства / Л.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина. — М.: Агропромиздат, 1987. — 400 с.
2. Залашко М.В. Исследование протеолитической активности молочнокислых бактерий / М.В. Залашко, Н.В. Образцова, Е.И. Савченко // Физиология и биохимия микроорганизмов. — Минск: Наука и техника, 1970. — С. 121–128.
3. Мюнх Г.Д. Микробиология продуктов животного происхождения: Пер. с нем. / Г.Д. Мюнх, Х. Заупе, М. Шрайтер. — М.: Агропромиздат, 1985. — 592 с.
4. Farkye N.Y. Proteolysis and flavor development in cheddar cheese made exclusive with single strain proteinase-positive or proteinase-negative starters / N.Y. Farkye, P.F. Fox, G.F. Fitzgerald // Journal of Dairy Science. — 1990. — Vol. 73, № 4. — P. 874–880.
5. Fox P.F. Proteolysis in cheese during ripening / P.F. Fox, P.L.H. Mc Sweeney // Food Rev. Int. — 1996. — Vol. 12. — P. 457–509.
6. Law B.A. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria / B.A. Law, A. Handrikman // Int. Dairy J. — 1997. — Vol. 7, № 1. — P. 1–11.
7. Meisel H. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties / H. Meisel, W. Bochemmann // Antonie van Leeuwenhoek. — 1999. — Vol. 76. — P 207–215.
8. Ohmiya K. Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part XI / K. Ohmiya, Y. Sato // Agric. Biol. Chem. — 1970. — Vol. 34, № 10. — P. 1463–1469.
9. Thomas T.D. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures / T.D. Thomas, G. Pritchard // FEMS Microbiology Reviews. — 1987. — Vol. 46, № 3. — P. 245–268.
10. Yukalo V.G. The obtaining of bioactive peptide material from product of proteolysis α_s - and β -casein / V.G. Yukalo, B.L. Luhovyv // Journal of Peptide Science. — 2002. — Vol. 8. — P. 185.

Надійшла до редколегії . .2011 р.