

УДК 637.14

В.П. Вистовская, В.М. Гордаченко, О.А. Беккер

Ферментативные гидролизаты белков молока

V.P. Vistovskaja, V.M. Gordachenko, O.A. Bekker

Enzymatic Hydrolysates Milk Proteins

Гидролизаты белкового сырья применяют с фармакологическими, питательными, медико-биологическими, косметическими, техническими и другими целями. Гидролиз проводят преимущественно ферментативным способом с использованием ферментов животного и растительного происхождения, а также микробными протеазами. Получение гидролизатов белков молока предполагает комплексное использование экзо- и эндопептидаз, что обеспечивает сокращение продолжительности протеолиза. Применение в качестве экзопептидазы микробной аминопептидазы сопровождается повышением содержания аминокислот, так необходимых для роста и развития бактерий. Особое значение имеет и протеолитическая активность молочнокислых бактерий различных групп, которая зависит от различных факторов.

Рассматривается зависимость активной и титруемой кислотностей культуральных сред от продолжительности культивирования с штаммами молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei ssp rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. Для изготовления гидролизатов использовали стерильное обезжиренное молоко, экзопептидазу и суточные культуры штаммов молочнокислых бактерий. Согласно экспериментальным данным представители группы мезофильных лактобацилл (*Lactobacillus casei ssp rhamnosus*) совместно с ферментами, обладающими экзопептидазной активностью, рекомендуются для получения белковых гидролизатов.

Ключевые слова: экзопептидаза, штаммы молочнокислых бактерий, ферментативные гидролизаты белков молока, активная и титруемая кислотности культуральных сред.

DOI 10.14258/izvasu(2014)3.1-01

Введение. Гидролизаты белкового сырья применяют с фармакологическими, питательными, медико-биологическими, косметическими, техническими и другими целями. Гидролиз проводят преимущественно ферментативным способом. Кислотный гидролиз хоть и является несравненно более дешевым и относительно простым способом, но связан с затруднениями в отношении контроля течения реакции [1; 2]. Ферментативный гидролиз (протеолиз) прово-

Protein hydrolysates raw materials used with pharmacological, nutritional, medical and biological, cosmetic, technical and other purposes. The hydrolysis is preferably carried out enzymatically using enzymes of animal and vegetable origin, as well as microbial proteases. Preparation of milk protein hydrolysates, for the comprehensive use of exo- and endopeptidases, which reduces the duration of proteolysis. Use as a microbial aminopeptidase exopeptidase accompanied by increased levels of amino acids, so necessary for the growth and development of bacteria. Of particular importance is the proteolytic activity and the lactic acid bacteria of different groups, which depends on various factors.

The dependence of active and titratable acidity of culture media on the length of cultivating lactic acid bacteria strains *Lactobacillus casei ssp rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. Hydrolysates used for the manufacture of sterile skim milk; exopeptidase and subsistence culture strains of lactic acid bacteria. According to experimental data, representatives of the group of mesophilic lactobacilli (*Lactobacillus casei ssp rhamnosus*) together with enzymes having exopeptidase activity are recommended for obtaining protein hydrolysates.

Key words: exopeptidase, strains of lactic bacteria, enzymatic hydrolysates milk proteins, active and titratable acidity of culture media.

дят ферментами животного происхождения (пищеварительными), растительными или микробными протеазами [2; 3].

Ферментативное расщепление белкового компонента, в частности казеиновой и сывороточной фракций молока, позволяет получать гидролизаты с повышенной питательной ценностью. Положительный физиологический эффект при потреблении гидролизированных белков молока достигается за счет луч-

шего усвоения короткоцепочечных пептидов в кишечном тракте по сравнению с нативными белками. Сложность получения гидролизатов связана с выбором высокоактивных ферментов для эффективного расщепления белков молока. Предложен способ получения гидролизатов белков молока для микробиологических сред, предполагающий комплексное использование экзо- и эндопептидаз, что обеспечивает сокращение продолжительности протеолиза с 42 до 2–3 ч. Известно, что бактерии нуждаются в источнике пептидов и аминокислот, которые образуются путем гидролиза казеина. Олигопептиды, полученные в результате действия протеаз, в том числе и связанных с клеточной стенкой, используются микроорганизмами в качестве субстрата для образования короткоцепочечных пептидов и аминокислот. Внесение в питательную среду экзопептидаз способствует увеличению свободных аминокислот, что является значительным преимуществом, которое используют бактерии для накопления своей биомассы.

Протеолиз является важным биохимическим процессом при получении различных ферментированных продуктов. Изучение физиолого-биохимических и промышленно-ценных свойств молочнокислых бактерий (в частности *Lactobacillus* ssp., *Lactococcus* ssp., *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) является актуальным направлением исследований прикладной биотехнологии, что связано с широким применением микроорганизмов в различных отраслях пищевой промышленности, например, в сыроделии, при изготовлении йогуртов и заквасок [4].

Методы исследования. Для изготовления гидролизатов использовали стерильное обезжиренное молоко, экзопептидазу (аминопептидазу Accellerzyme NP 50000 (выпускаемую DSM, The Netherlands), полученную из штамма *Bacillus amyloliguetacicus*), и суточные культуры штаммов молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* (*Lb. rhannosus*), *Lactobacillus helveticus* (*Lb. helveticus*), *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (*Str. thermophilus*).

В ходе эксперимента исследовали питательные среды:

- образец № 1 изготовлен на основе стерильного обезжиренного молока (COM) с внесением одного штамма молочнокислых бактерий (0,5%);
- образец № 2 представлен COM с экзопептидазой (0,02%);
- образец № 3 — COM при совместном действии экзопептидазы (0,02%) и штамма (0,5%).

Контролем служило COM.

Полученные образцы культивировали при 37 ± 1 °C в течение 24 часов. В процессе культивирования определяли титруемую и активную кислотности через 0,5; 1; 2; 3; 4 и 24 часа, а также фиксировали время формирования сгустка.

Титруемую кислотность образцов определяли титриметрическим методом, основанным на нейтрализации кислот, содержащихся в продукте, раствором гидроксида натрия в присутствии индикатора фенолфталеина (ГОСТ 3624-92).

Активную кислотность в образцах определяли рН-метром/ионометром, который предварительно калибровали по двум точкам с использованием буферных растворов с рН 4,01 и 6,86.

Результаты и обсуждение. Оптимальными для роста мезофильных лактобацилл *Lb. rhannosus* является рН 5,4–5,9. В течение первых часов культивирования во всех трех образцах изменение активной кислотности было незначительным и оставалось на уровне рН 6. После 24 часов культивирования белковые гидролизаты, соответствующие образцам № 1 и № 3, характеризовались значениями активной кислотности 4,46 и 4,17 соответственно (рис. 1). Прирост на 6,5% ед. рН в образце № 3 свидетельствовал о лучших условиях культивирования для *Lb. rhannosus*.

По литературным данным, у видов р. *Lactobacillus* обнаружены ферменты с эндо- и экзопептидазной активностью с внеклеточной, клеточносвязанной, внутриклеточной локализацией. Очевидно, это обуславливает способность штаммов *Lb. casei* активно развиваться на средах с различной степенью протеолиза белков молока [5].

Изменение титруемой кислотности также характерно для образцов № 1 и № 3, причем прирост титруемой кислотности при совместном действии экзопептидазы и ферментных систем штамма составил 47,4% (рис. 2). Формирование первого плотного сгустка фиксировали у образца № 3 после 4 часов культивирования.

Анализ изменения биохимических параметров гидролизатов белкового компонента COM штаммами термофильных лактобацилл *Lb. helveticus* и термофильных молочнокислых стрептококков *Str. thermophilus* показал, что наибольший прирост значений титруемой кислотности (41% в сравнении с образцом № 1) характерен для образца № 3 при совместном действии экзопептидазы и штамма *Str. thermophilus* (рис. 3).

Изменение показателей титруемой кислотности наблюдали после 2 часов культивирования в образцах № 1 и № 3. После 3 часов инкубации при 37 °C фиксировали появление вязкого сгустка.

По литературным данным, у штаммов *Str. thermophilus* обнаружены внутриклеточные аргининаминопептидазы, лейцинаминопептидазы, глицилпролиндипептидазы и лейцил-лейциндипептидазы, ассоциированные с клеточной стенкой, а также локализованные в мембранной и цитоплазматической клеточной фракциях. Т.Н. Головач указывает также на предпочтительное поглощение *Str. thermophilus*

свободных аминокислот и короткоцепочечных пептидов, количество которых должно быть значительно

выше в образце №3, за счет действия амнопептидазы, отщепляющей аминокислоты с N-конца [5].

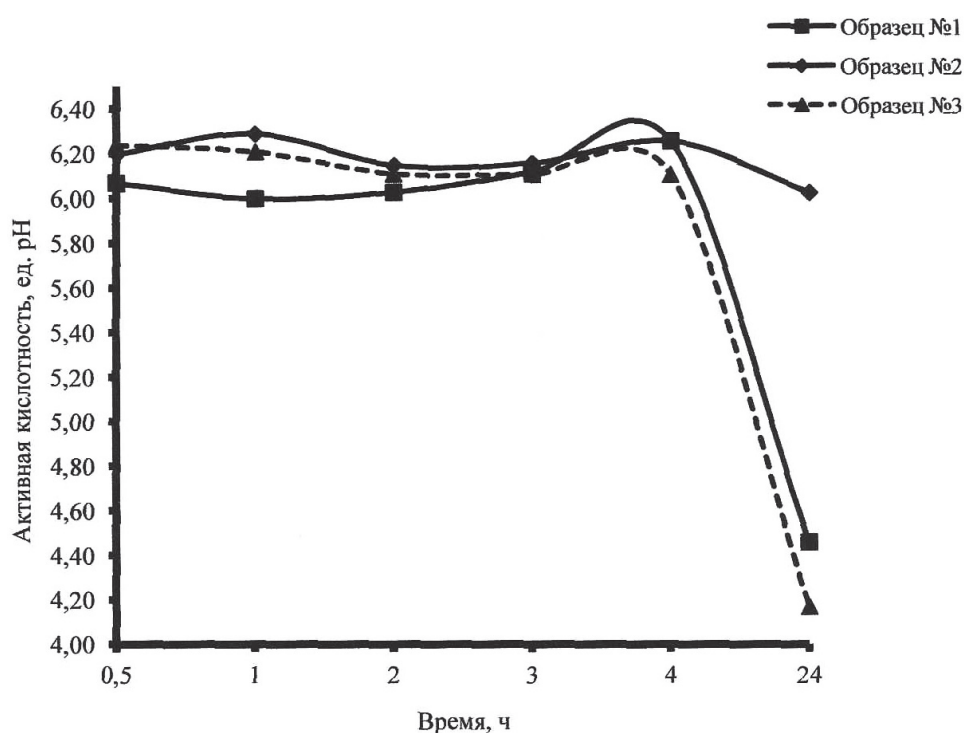


Рис. 1. Зависимость pH культуральной среды от продолжительности ферментирования (с *Lb. rhamnosus*)

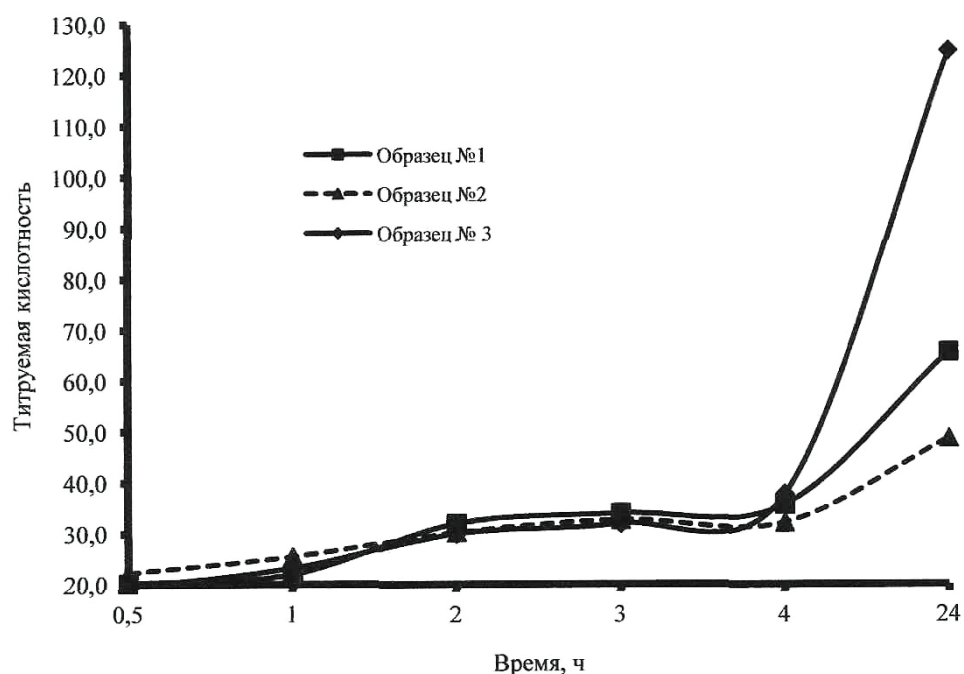


Рис. 2. Зависимость титруемой кислотности культуральной среды от продолжительности ферментирования (с *Lb. rhamnosus*)

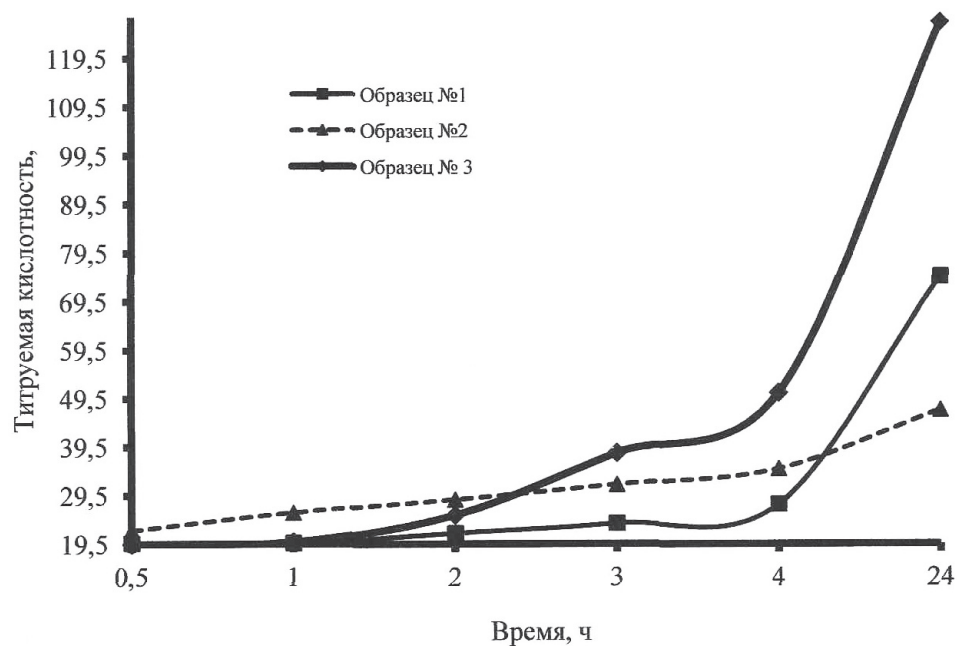


Рис. 3. Зависимость титруемой кислотности культуральной среды от продолжительности ферментирования (с *Str. thermophilus*)

Вклад экзопептидазы в изменение титруемой и активной кислотностей при совместном действии с *Lb. helveticus* незначителен. Хотя повышение уров-

ня кислотности (снижение pH) происходило достаточно быстро после 3 часов совместного действия аминок- пептидазы и ферментных систем *Lb. helveticus* (рис. 4).

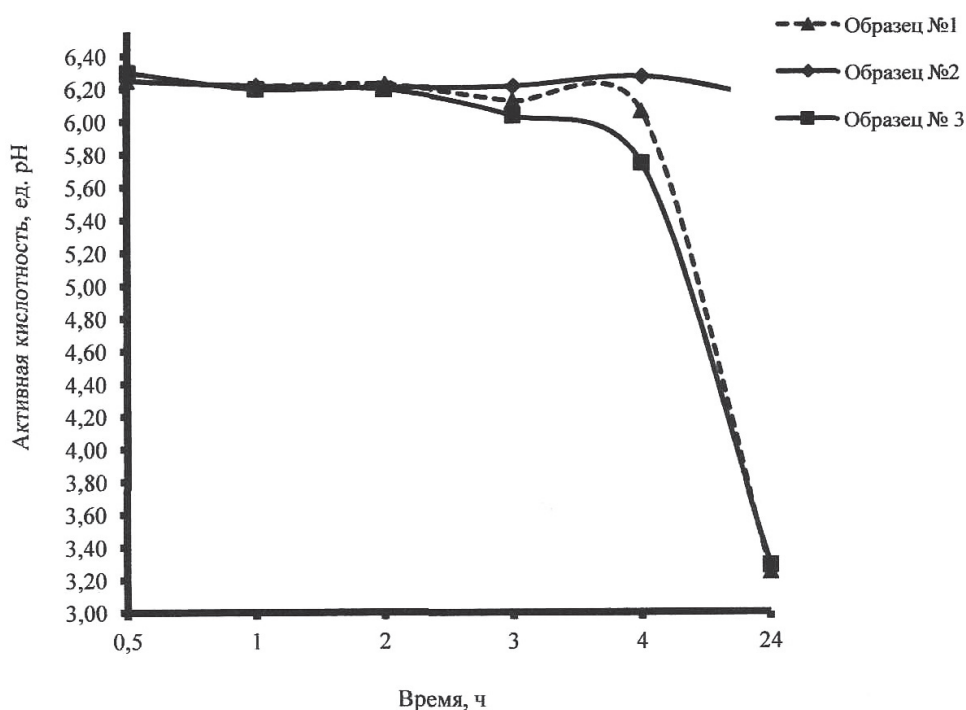


Рис. 4. Зависимость активной кислотности культуральной среды от продолжительности ферментирования (с *Lb. helveticus*)

Выводы. Согласно экспериментальным данным представители группы мезофильных лактобацилл (*Lactobacillus casei* ssp *rhamnosus*) совместно с ферментами, обладающими экзопептидазной активностью, рекомендуются для получения белковых гидролизатов.

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией микробиологии ГНУ

СибНИИС А.Н. Иркитовой за предоставленные штаммы молочнокислых бактерий, заведующей лабораторией биохимических исследований А.Н. Белову за предоставленный образец аминопептидазы, а также О.К. Таварткиладзе за помощь при получении стерильных микробиологических сред.

Библиографический список

1. Курбанова М.Г., Разумникова И.С., Просеков А.Ю. Белковые гидролизаты с биологически активными пептидами // Молочная промышленность. — 2010. — № 9.
2. Козлова О.В., Разумникова И.С., Бабич О.О., Просеков А.Ю. Биологические активные пептиды из белков молока // Молочная промышленность. — 2010. — № 9.
3. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты: получение, состав, применение : дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2000.

4. Головач Т.Н., Курченко В.П. Гидролиз белков молока ферментативными препаратами и протеолитическими системами молочнокислых бактерий // Труды БГУ. — 2012. — Т. 7, ч. 1.
5. Головач Т.Н. Культивирование молочнокислых бактерий в питательных средах на основе гидролизатов белков молока // Труды БГУ. — 2010. — Т. 5, ч. 1.