

УДК 637.141.8

Богдан ГОЛУБ**ПРОТЕОЛІЗ У ПРОБІОТИЧНИХ
НАПОЯХ, ФЕРМЕНТОВАНИХ
БІФІДОБАКТЕРІЯМИ**

Розглянуто особливості формування складу високомолекулярних азотистих сполук у ферментованих біфідобактеріями молочних напоях. Наведено результати порівняльного оцінювання протеолітичних властивостей різних штамів пробіотичних біфідобактерій і лактобактерій.

Ключові слова: пробіотики, біфідобактерії, ферментування, молочні напої, азотисті сполуки, казеїн, пептиди, протеоліз.

Голуб Б. Протеолиз в пробиотических напитках, ферментированных бифидобактериями. Рассмотрены особенности формирования состава высокомолекулярных азотистых соединений в ферментированных бифидобактериями молочных напитках. Приведены результаты сравнительного оценивания протеолитических свойств разных штаммов пробиотических бифидобактерий и лактобактерий.

Ключевые слова: пробиотики, бифидобактерии, ферментирование, молочные напитки, азотистые соединения, казеин, пептиды, протеолиз.

Постановка проблеми. Ферментовані молочні напої – один із найдавніших продуктів профілактичного харчування людини – містять пробіотичні мікроорганізми, вітаміни, амінокислоти, інші корисні речовини й продукти протеолізу казеїну та решти білків молока під впливом молочнокислих бактерій.

У коров'ячому молоці визначено понад 200 білків і пептидів, які поділяють на п'ять великих груп – казеїни, сироваткові білки, білки жирових глобул, ферменти та інші білки. Вони проявляють різну фізіологічну активність в організмі людини та вносять вагомий внесок у формування біологічної цінності молока [1].

Молочні казеїни є основною групою білків молока. За результатами останніх генетичних і молекулярних досліджень чітко ідентифіковано α_{S1} -, α_{S2} -, β -, κ -казеїни, які відрізняються за своїми фізико-хімічними властивостями. Деякі дослідники виділяють γ -казеїн, але більшість їх доводить, що це продукт протеолізу β -казеїну [1].

Саме казеїни зумовлюють накопичення значної кількості кальцію в молоці. Фосфосерин і фосфотреонін у складі казеїнів зв'язують кальцій та утворюють оболонку навколо фосфату кальцію, який накопичується в молоці в кількості, що перевищує його межу розчинності. Продукти протеолізу казеїнів мають відмінну від негідролізованих

© Богдан Голуб, 2013

молекул біологічну цінність. Їм притаманна антигіпертонічна, антиоксидантна, імуномодельовальна активність. Цей перелік властивостей молочних пептидів не є вичерпним і постійно поповнюється. При цьому перетравлюваність молочного білка та засвоюваність амінокислот організмом людини після ферментації значним чином не змінюється, залишаючись відповідно на рівні 94–95 % та в межах 92–97 % [2].

Ще одним важливим аспектом корисного фізіологічного ефекту процесу утворення бактеріями поліпептидів із білків молока є зниження алергенних властивостей останнього. Як відомо, справжня харчова алергія пов'язана зі споживанням деяких білковмісних продуктів, зокрема й коров'ячого молока.

Білки тваринного походження, які зумовлюють алергенні властивості певних продуктів, відносять до трьох груп – *тропоміозини* (в м'ясі ракоподібних і двостулкових молюсків), *парвальбуміни* (в м'ясі риби) та *казеїни* (в коров'ячому молоці). Із менш розповсюджених білків у молоці присутні також α -лактальбумін і β -лактоглобулін. Алергенність молочних білків дещо зменшується при термічній обробці молока, а більше – в процесі протеолізу.

Казеїну належить ключова роль у забезпеченні азотного балансу бактерій, які використовуються при ферментації молока. До 90 % потреб в азотистих сполуках молочнокислих і біфідобактерій під час виробництва кисломолочних продуктів і сиру забезпечується пептидами та амінокислотами, отриманими протеолізом казеїну як екзоферментами (поза межами клітин), так і ендоферментами (всередині клітин). При цьому дезамінування чи переамінування амінокислот відбувається виключно всередині клітини.

Переважає більшість низькомолекулярних сполук утворюється під час ферментації молока протягом внутрішньоклітинних перетворень, тобто вони вивільнюються лише після лізису клітин, що безпосередньо впливає на посилення смакоароматичних властивостей готового продукту на етапі дозрівання.

Олігопептиди, утворювані молочнокислими бактеріями, характеризуються високою біологічною активністю: *Lactobacillus helveticus* subsp. *bulgaricus* утворює поліпептиди з антиоксидантною активністю, *L. delbrueckii* при розкладанні χ -казеїну – з імуностимулювальною дією. Поліпептиди-антиоксиданти характеризуються меншою за бутилокситолуол антиоксидантною активністю щодо дифенілпікрілгідразилу, але водночас у природних системах активніше сприяють збереженню каротиноїдів. Більшість цих поліпептидів характеризуються також ангіотензин-перетворювальною активністю – сприяють нормалізації кров'яного тиску в судинах організму. Найпоширенішими продуцентами поліпептидів із фізіологічною активністю є штами молочнокислих бактерій: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus jensenii*, *L. acidophilus* (антиоксидантна активність); *L. helveticus*, *Entero-*

coccus faecalis, *Streptococcus thermophilus*, *L. animalis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* (ангіотензин-перетворювальна активність); *L. helveticus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (імуномодельовальна активність).

Протеолітичні властивості у біфідобактерій виражені значно слабше за представників групи молочнокислих бактерій. Протеолітичні ферменти біфідобактерій, використовуваних як закваски, проявляють переважно амінопептидну активність по поліпептидних зв'язках лейцину, валіну та цистеїну, тоді як більшість молочнокислих бактерій характеризується досить активним α -хімотрипсином (табл. 1) [3].

Таблиця 1

Ферментативна активність промислових штамів заквасок біфідобактерій*

Фермент	<i>B. lactis</i> BB-12	<i>B. longum</i> BB-46	<i>B. bifidum</i> C-1	<i>B. bifidum</i> C-2	<i>B. lactis</i> C-3	<i>B. breve</i> C-4
Трипсин	1	1	1	2	1	1
α -хімотрипсин	1	1	1	2	1	1
Естераза (C-4)	3	3	3	3	3	3
Естераза ліпаза (C-8)	3	2	1	3	3	3
Ліпаза (C14)	2	1	1	1	3	1
Лужна фосфатаза	3	4	4	4	4	5
Лейцин амінопетидаза	5	5	3	4	4	5
Валін амінопептидаза	5	5	1	5	5	2
Цистин амінопептидаза	4	4	1	4	4	2
α -галактозідаза	5	3	1	2	3	3
β -галактозідаза	4	5	2	5	5	5
β -глюкуронозідаза	1	1	1	2	1	1
α -глюкозідаза	4	4	1	2	5	4
β -глюкозідаза	4	1	1	1	5	1
N-ацетил- β -глюкозамінідаза	4	1	1	1	5	1

* Оцінка активності ферменту за тест-набором API ZYM: 1–4 – помірна, 5 – висока.

Одними з найактивніших протеолітичних штамів серед пробіотичних промислових заквасок є *B. lactis* BB-12, *B. bifidum* C-2 та *B. lactis* C-3. Перший широко використовується вітчизняними виробниками ферментованих біфідовмісних молочних продуктів, що пов'язано з його технологічними властивостями. Крім того, *B. animalis lactis*, до яких відноситься цей штам, характеризуються досить вираженою стресостійкістю до кисню [4].

Матеріали та методи. Розроблені авторами [5] ферментовані біфідобактеріями пробіотичні молочні напої, для ферментації яких використовується двокомпонентна закваска – *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 (виробництва *Chr. Hansen*, Данія; рекомендована для виробництва кисломолочних продуктів) і *Bifidobacterium longum* VKPM-1514 (виробництва Інституту продовольства Української академії аграрних наук (ІІ УААН); рекомендована для виготовлення функціональних молочних продуктів).

Мета – порівняння протеолітичних властивостей зазначених біфідобактерій і лактобацил *Lactobacillus plantarum* 2037, застосовуваних для ферментації молока.

Культивування бактерій проведено відповідно до Методичних вказівок "Визначення кількості біфідобактерій у кисломолочних продуктах" [6] та чинного стандарту [7]. Контролем слугувало молоко коров'яче питне стерилізоване з вмістом жиру 2.5 % (виробник завод "Галактон").

Склад продуктів протеолізу визначено після осадження та підготовки згустку електрофоретичним методом на поліакриламідному гелі [6; 8]. Під час електрофорезу поліпептиди молока та ферментованих продуктів вдалось розділити на дві фракції поліпептидів 67 кДа та 97 кДа, α -казеїн, β -казеїн, χ -казеїн, β -глобулін, α -альбумін.

Результати досліджень. Молочнокислі та біфідобактерії мають редукований набір ферментів для синтезу амінокислот, основним джерелом яких виступають білки субстрату. Протеази в них містяться у зв'язаному стані у верхніх шарах клітинної оболонки. Наявність і функціональна активність цих ферментів є генотипними ознаками. В умовах температурного стресу ці ферменти також виконують роль адаптогенів, гідролізуючи залишки інактивованих білків. Нині відомо, що існує група молочнокислих бактерій, яким не притаманна активність екзопротеїназ. Серед них відсутні промислово важливі види для виробництва ферментованих молочних продуктів [9]. Проте, ураховуючи інтенсивний пошук нових штамів для розширення асортименту ферментованих молочних продуктів, перспективним є комбінування бактерій із відсутніми та вираженими протеолітичними властивостями.

На першому етапі ферментування молочної основи відбувається протеоліз казеїну під впливом екзопротеїназ до олігопептидів (4–8 залишків амінокислот), трипептидів, дипептидів та окремих амінокислот, для яких має місце механізм транспорту в клітину бактерій, тобто розклад до амінокислот може відбуватись як всередині, так і зовні клітини. Однак перетворення амінокислот відбувається лише всередині клітини. При цьому первинні метаболіти (олігопептиди) утворюються під час експоненціального росту протягом перших 3–4 год заквашування молока, а вторинні (ароматні сполуки та клітинні білки) наприкінці його та на стадії стаціонарного росту. Відповідно кількість високомолекулярних азотистих сполук у готових ферментованих напоях знижується [9].

Отримано значення досить високої протеолітичної активності дослідних штамів біфідобактерій (табл. 2).

У всіх зразках відбувся перерозподіл фракцій поліпептидних сполук у бік зменшення питомої частки α -казеїну. Різні штами проявляли різну протеолітичну активність щодо фракцій поліпептидів.

Таблиця 2

**Вміст фракцій високо- та низькомолекулярних білків
у ферментованому пробіотичному напої, % до білкового азоту**

Зразок	Смуги							
	67 кДа	97 кДа	α - казеїн	β - казеїн	χ - казеїн	β -гло- булін	α -аль- бумін	інші фракції
Контроль	0.000	3.211	49.037	15.550	4.725	4.954	1.055	21.568
<i>Lb. plantarum</i> 2037	4.679	3.165	42.936	18.624	3.945	7.982	2.431	16.238
<i>B. longum</i> VKPM-1514	3.303	3.165	41.055	20.321	9.954	9.587	2.064	10.551
<i>B. lactis</i> BB-12	2.385	1.835	30.826	24.541	6.560	8.165	1.193	24.495
<i>B. longum</i> VKPM-1514 та <i>B. lactis</i> (BB-12)	2.385	2.982	44.817	19.312	10.046	12.523	2.431	5.504

Фракціонування продуктів протеолізу свідчить про якість згустку ферментованого молочного продукту. Найактивніше гідролізується α -казеїн. Порівняння протеолітичної активності штамів біфідобактерій показує підвищену протеолітичну активність *B. lactis* BB-12 щодо цієї фракції. Внаслідок цього підвищується вміст інших низькомолекулярних фракцій поліпептидів, що в свою чергу позитивно впливає на харчову цінність отриманих ферментованих продуктів.

Як відомо, χ -казеїн найкраще за інші фракції казеїну полімеризується й зумовлює утворення однорідного ніжного згустку. Продукти протеолізу *Lb. plantarum* 2037 характеризується найменшим вмістом цієї фракції. Натомість у складі продуктів протеолізу біфідобактерій масова частка цієї фракції втричі вища, а сумісне культивування *B. lactis* BB-12 та *B. longum* VKPM-1514 позитивно впливає на її вміст. Це сприяє поліпшенню консистенції ферментованих молочних продуктів на їх основі, що підтверджують і наші попередні дослідження [5]. На оптимізацію співвідношення фракцій казеїну, з точки зору формування консистенції, більше впливає *B. longum* VKPM-1514. Це означає вагомий технологічний вплив цієї культури при ферментації молока. Водночас *B. longum* VKPM-1514 характеризується високою резистентністю до кисню та інтенсивнішим кислотоутворенням, що забезпечує швидку коагуляцію молочного білка. Однак консистенція утвореного згустку неоднорідна, ламка, що й зумовлює необхідність комбінування у заквасці декількох культур біфідобактерій.

Ферментування молока штамом *Lb. plantarum* сприяє інтенсивному гідролізу β -глобуліну, який характеризується певною алергенністю для організму людини. Окреме ферментування молока дослідними штамми біфідобактерій показує подібні результати. Інший потенційний алерген, α -альбумін, найінтенсивніше гідролізується *B. lactis* BB-12.

Найвищої інтенсивності протеоліз зазначених білків відбувається через 24 год інкубування. Під час ферментації молока при виготовленні пробіотичних молочних напоїв тривалість технологічного процесу менша. Це підтверджує доцільність споживання пробіотичних напоїв безперервно або тривалий час, оскільки основні протеолітичні процеси здійснюватимуться не в напоях, а під впливом бактерій в кишечнику людини.

Слід також відзначити, що активність протеолітичних ферментів біфідобактерій індукується молочним білком. Дослідження показують підвищену активність протеолітичних ферментів на тих поживних середовищах, де джерелом азоту виступає молочний білок. Найвищу індукуючу активність проявляють сироваткові білки та їх гідролізати. Така ж тенденція спостерігається й щодо галактозидаз біфідобактерій.

Висновки. Виявлено достатньо високу здатність штамів біфідобактерій *B. lactis* BB-12 та *B. longum* VKPM-1514 до протеолізу поліпептидів молока. Локалізація пептидаз у клітинній стінці для біфідобактерій не характерна. Це підтверджується експериментальними даними щодо динаміки протеолізу під час інкубації – найвища активність проявляється після 24-годинного інкубування. Доведено, що окреме культивування дослідних штамів біфідобактерій сприяє зниженню вмісту потенційно алергенних білків коров'ячого молока. Натомість сумісне їх культивування поліпшує консистенцію згустку за рахунок підвищення масової частки χ -казеїну серед продуктів протеолізу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Encyclopedia of Dairy Sciences* / [ed. by Hubert Roginski et al.]. — New York : Academic Press, 2002. — 2500 p.
2. *The assessment of amino acid digestibility in foods for humans and including a collation of published ileal amino acid digestibility data for human foods* // Report of a Sub-Committee of the 2011 FAO Consultation on "Protein Quality Evaluation in Human Nutrition". — Way of access : <http://www.fao.org/ag/humannutrition/36216-04a2f02ec02eafd4f457dd2c9851b4c45.pdf>.
3. *Martinez-Villaluenga C.* Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic / Cristina Martinez-Villaluenga, Rosario Gomez // *International Dairy Journal*. — 2007. — N 2. — P. 116—122.
4. *Tmanova L.* Identification and differentiation of bifidobacteria obtained from Ukraine / L. Tmanova, A. Onyenwoke, R. Roberts // *Journal of Dairy Science*. — 2012. — N 1. — P. 91—97.
5. *Голуб Б.* Формування реологічних властивостей синбіотичних молочних напоїв під впливом пробіотичних заквасок різного складу / Б. Голуб, С. Даниленко, Г. Рудавська // *Міжнар. наук.-практ. журн. "Товари і ринки"*. — 2010. — № 2. — С. 55—60.
6. МК 10.10.2.2.-119–2005 Визначення кількості біфідобактерій у кисло-молочних продуктах : метод. вказівки // Санітарний лікар України. —

2005. — № 1—4. — Режим доступу : http://uazakon.com/documents/date_8w/pg_iacjwb.htm.
7. Культури молочнокислих заквасок. Визначання видового складу (IDF 149A:1997, IDT) : ДСТУ IDF 149A:2003. — [Чинний від 2003—08—01]. — К. : Держспоживстандарт України, 2003. — 18 с.
 8. Крусъ Г. Н. Методы исследования молока и молочных продуктов / Г. Н. Крусъ, В. М. Шалыгина, З. В. Волокитина. — М. : Колос. — 2000. — 367 с.
 9. Savijoki K. Proteolytic systems of lactic acid bacteria / Kirsi Savijoki, Hanne Ingmer, Pekka Varmanen // Applied microbiology and biotechnology. — 2006. — N 4. — P. 394—406.

Стаття надійшла до редакції 15.10.2013.

Golub B. Proteolysis in the probiotic drinks fermented with bifidus bacteria.

Background. The biggest part of the functional food market is occupied with fermented probiotic dairy drinks. These products are versatile. But its nutrition value depends on many factors. So, last explorations showed the useful influence of the protein hydrolysates, which are produced by probiotic bacteria, over the human organism. Hydrolyzed and unhydrolyzed casein molecules have a different biological value. Peptides from casein have the antihypertensive, antioxidant, immunomodulatory effects.

Lactic acid bacteria proteolysis products have a high biological value. It was traditionally considered that bifidus bacteria have the less-expressed proteolytic activity. We have established the aim to investigate and to compare the proteolytic activity of probiotic starter strains of bifidobacteria and lactobacillus, which are used in dairy production.

Material and methods. It was selected the starters with wide industry spreading in Ukraine (*Bifidobacterium animalis ssp. lactis BB-12*) and starters from main food sectoral research of the Institute of food (*Bifidobacterium longum VKPM-1514*, *Lactobacillus plantarum 2037*). The contents of proteolytic substances were investigated by electrophoresis with PAAG.

Results. It was shown the high proteolytic activity of bifidobacteria. Also it was investigated the differences between casein hydrolyse products with lactobacillus and bifidobacteria. On these results basis it was described perspectives of starters combination for probiotic dairy drinks features improving.

Conclusion. The high proteolytic activity of bifidobacteria was confirmed. It was shown that separated fermentation by *B. lactis BB-12* та *B. longum VKPM-1514* strains decreased allergenicity of cow milk proteins. But combined fermentation conduced to improving of rheology of casein gel by χ -casein retention.

Key words: probiotic, bifidobacteria, fermentation, dairy drinks, nitrogenous compounds, casein, peptides, proteolysis.

REFERENCES

1. *Encyclopedia of Dairy Sciences* / [ed. by Hubert Roginski et al.]. — New York : Academic Press, 2002. — 2500 p.
2. *The assessment of amino acid digestibility in foods for humans and including a collation of published ileal amino acid digestibility data for human foods* // Report of a Sub-Committee of the 2011 FAO Consultation on "Protein Quality Evaluation in Human Nutrition". — Way of access : <http://www.fao.org/ag/humannutrition/36216-04a2f02ec02eafd4f457dd2c9851b4c45.pdf>.

3. *Martinez-Villaluenga C.* Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic / Cristina Martinez-Villaluenga, Rosario Gomez // *International Dairy Journal*. — 2007. — N 2. — P. 116—122.
4. *Tmanova L.* Identification and differentiation of bifidobacteria obtained from Ukraine / L. Tmanova, A. Onyenwoke, R. Roberts // *Journal of Dairy Science*. — 2012. — N 1. — P. 91—97.
5. *Golub B.* Formuvannja reologichnyh vlastyvostej synbiotychnyh molochnyh napoi'v pid vplyvom probiotychnyh zakvasok riznogo skladu / B. Golub, S. Danylenko, G. Rudavs'ka // *Mizhnar. nauk.-prakt. zhurn. "Tovary i rynky"*. — 2010. — № 2. — S. 55—60.
6. MVK 10.10.2.2.-119-2005 Vyznachennja kil'kosti bifidobakterij u kyslomolochnyh produktah : metod. vkazivky // *Sanitarnyj likar Ukrai'ny*. — 2005. — № 1—4. — Rezhym dostupu : http://uazakon.com/documents/date_8w/pg_iacjwb.htm.
7. Kul'tury molochnokyslyh zakvasok. Vyznachannja vydovogo skladu (IDF 149A:1997, IDT) : DSTU IDF 149A:2003. — [Chynnyj vid 2003—08—01]. — K. : Derzhspozhyvstandart Ukrai'ny, 2003. — 18 s.
8. *Krus' G. N.* Metody issledovanija moloka i molochnyh produktov / G. N. Krus', V. M. Shalygina, Z. V. Volokitina. — M. : Kolos. — 2000. — 367 s.
9. *Savijoki K.* Proteolytic systems of lactic acid bacteria / Kirsi Savijoki, Hanne Ingmer, Pekka Varmanen // *Applied microbiology and biotechnology*. — 2006. — N 4. — P. 394—406.