

УДК 637.146.34

## СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДІЇ ПРИКЛІТИННИХ ПРОТЕЇНАЗ ЛАКТОКОКІВ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО КАЗЕЇНОВИХ ФРАКЦІЙ

А. В. Юкало<sup>1</sup>, О. Й. Цісарик<sup>2</sup>  
biotech@tu.edu.te.ua

<sup>1</sup>Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя,  
вул. Руська, 56, м. Тернопіль, 46001, Україна

<sup>2</sup>Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені  
С.З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

*Специфічність приклітинних протеїназ лактококів по відношенню до казеїнових фракцій відіграє важливу роль у формуванні показників якості ферментованих молочних продуктів, а також в утворенні природних біологічно активних пептидів казеїнового походження. Існуючі методи встановлення специфічності цих ензимів базуються на довготривалому вирощуванні лактококів у молочному середовищі або складному виділенні та ідентифікації приклітинних протеїназ. Метою нашої роботи було визначення специфічності приклітинних протеїназ лактококів з використанням, як субстрату, гомогенних казеїнових фракцій. Фракції  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїнів виділяли диференційним осадженням в ізоелектричній точці у присутності сечовини і препаративним електрофорезом у поліакриламідному гелі. Для визначення загальної протеолітичної активності та відбору протеїназо-позитивних штамів було проведено їх короткотермінове вирощування (12 годин) у стерильному знежиреному молоці при 30°C. У випадку розвитку протеїназо-позитивних штамів концентрація продуктів протеолізу через 12 годин культивування залишається незмінною або збільшується. Це залежить від активності та кількості приклітинної протеїнази. Також було проведено тестування штамів на здатність утворювати молочну кислоту та коагулювати казеїни молока. Ці характеристики є одними з найважливіших у молочнокислих бактерій і тісно пов'язані з протеолітичною активністю. Для проведення протеолізу використовували протеїназо-позитивні клітини лактококів, вирощені у молочному середовищі. Клітини відмивали від компонентів середовища і концентрували в умовах збереження їх приклітинних протеїназ. Специфічність приклітинних протеїназ лактококів встановлювали на основі електрофоретичного аналізу нерозщеплених казеїнових субстратів у лужній системі однорідного поліакриламідного гелю. В результаті проведеного аналізу було визначено тип приклітинних протеїназ чотирьох штамів *L. lactis ssp. lactis*. Запропонований метод дозволяє значно скоротити тривалість аналізу і встановити специфічність та тип приклітинної протеїнази лактококів.*

**Ключові слова:** ПРОТЕОЛІЗ, ПРИКЛІТИННІ ПРОТЕЇНАЗИ, СПЕЦИФІЧНІСТЬ, ЛАКТОКОКИ, КАЗЕЇНОВІ ФРАКЦІЇ.

## SPECIFICITY OF CELL-ENVELOP PROTEINASE OF LACTOCOCCI TOWARD THE CASEIN FRACTIONS

A. V. Iukalo<sup>1</sup>, O. I. Tsisaryk<sup>2</sup>  
biotech@tu.edu.te.ua

<sup>1</sup>Ternopil Ivan Puluj National Technical University, 56, Ruska Str., Ternopil, 46001, Ukraine

<sup>2</sup>Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after  
S.Z. Gzhyskij, 50, Pekarska Str., Lviv, 79010, Ukraine

*The specificity of cell-envelop proteinases of lactococci toward the casein fractions plays an important role in formation the parameters of quality of fermented dairy products, as well as in the creation of natural origin bioactive casein peptides. Existing methods of establishing the specificity of these enzymes are based on long-term cultivation of lactococci in milk or complex obtaining and identification of cell-envelop proteases. The aim of our study was to determine the specificity of the proteinase of lactococci using a homogeneous casein fractions as substrate. Casein fractions ( $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins) were isolated using differential precipitation in isoelectric point in the presence of urea and preparative electrophoresis in polyacrylamide*

gel. To determine the total proteolytic activity and selection of proteinase-positive strains was held their short-term cultivation (12 hours) in sterile skim milk at 30°C. In case of development of proteinase-positive strains the concentration of proteolysis product after 12 hours of cultivation remains the same or increases. It depends on the activity and amount of the cell-envelop proteinase. It was also tested the ability of strains to form lactic acid and coagulate casein milk. These characteristics are the most important in lactic acid bacteria and are closely related to proteolytic activity. For the proteolysis protease-positive strains of lactococci, which were grown in the milk culture medium, were used. Cells were washed from the components of the culture medium and concentrated in condition while preserving their cell-envelop proteases. The specificity of cell-envelop proteases was established on the basis of electrophoretic analysis of undigestive casein substrates in alkaline system of homogeneous polyacrylamide gel. As a result of analysis of cell-envelop proteases types of four strains was defined. The proposed method can significantly reduce the time of the analysis and to identify the type and specificity of cell-envelop proteases of lactococci.

**Key words:** PROTEOLYSIS, CELL-ENVELOP PROTEASES, SPECIFICITY, LACTOCOCCI, CASEIN FRACTIONS

## СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ПРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ ЛАКТОКОККОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К КАЗЕИНОВЫМ ФРАКЦИЯМ

А.В. Юкало<sup>1</sup>, О.Й. Цисарык<sup>2</sup>  
biotech@tu.edu.te.ua

<sup>1</sup>Тернопольский национальный технический университет имени Ивана Пулюя, ул. Руська, 56, г. Тернополь, 46001, Украина

<sup>2</sup>Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого, ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

Специфичность приклеточных протеиназ лактококков по отношению к казеиновым фракциям играет важную роль в формировании показателей качества ферментированных молочных продуктов, а также в образовании природных биологически активных пептидов казеинового происхождения. Существующие методы определения специфичности этих энзимов базируются на длительном выращивании лактококков в молочной среде или сложном выделении и идентификации приклеточных протеиназ. Целью нашей работы было определение специфичности приклеточных протеиназ лактококков с использованием в качестве субстратов гомогенных казеиновых фракций. Фракции  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеина выделяли дифференциальным осаждением в изоэлектрической точке в присутствии мочевины и препаративным электрофорезом в полиакриламидном геле. Для определения общей протеолитической активности и отбора протеиназо-положительных штаммов было проведено их краткосрочное выращивание (12 часов) в стерильном обезжиренном молоке при 30°C. В случае развития протеиназо-положительных штаммов концентрация продуктов протеолиза через 12 часов культивирования остается неизменной или увеличивается. Это зависит от активности и количества приклеточной протеиназы. Также было проведено тестирование штаммов на способность образовывать молочную кислоту и коагулировать казеины молока. Эти характеристики являются одними из важнейших в молочнокислых бактерий и тесно связанные с протеолитической активностью. Для проведения протеолиза использовали протеиназо-положительные клетки лактококков, которые выращивали в молочной среде. Клетки отмывали от компонентов среды и концентрировали в условиях сохранения их приклеточных протеиназ. Специфичность приклеточных протеиназ лактококков устанавливали на основании электрофоретического анализа нерасщепленных казеиновых субстратов в щелочной системе однородного полиакриламидного геля. В результате проведенного анализа было определено тип приклеточных протеиназ четырех штаммов *L. lactis* ssp. *lactis*. Предложенный метод позволяет значительно сократить продолжительность анализа и установить специфичность и тип приклеточной протеиназы лактококков.

**Ключевые слова:** ПРОТЕОЛИЗ, ПРИКЛЕТОЧНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ, СПЕЦИФИЧНОСТЬ, ЛАКТОКОККИ, КАЗЕИНОВЫЕ ФРАКЦИИ

Лактококи є ауксотрофами по ряду амінокислот (до 12 амінокислот). Для

свого розвитку у молоці протеїназо-негативні лактококи використовують вільні

амінокислоти і природні пептиди молока. Протеїназо-позитивні лактококи, крім цього, здатні гідролізувати протеїни молока. У першу чергу це стосується казеїнів, які є більш доступні до дії протеолітичних ензимів [1]. Протеїнове живлення лактококів забезпечує протеолітична система, яка складається з трьох частин:

1) протеїнази (розміщені на поверхні клітин протеїназо-позитивних штамів);

2) пептидази (розміщені на клітинних мембранах і в клітинах лактококів);

3) транспортна система, яка забезпечує перенос амінокислот і коротких пептидів через клітинну мембрану [2].

Протеїнази лактококів, які розщеплюють казеїни, є мономерними сериновими протеазами. Вони зв'язані за участі іонів кальцію з клітинною стінкою бактерій і називаються PrtP. Встановлено, що первинна структура PrtP на 98% ідентична у різних лактококів. За специфічністю гідролізу казеїнових фракцій приклітинні протеїнази лактококів розділили на два типи —  $P_I$  і  $P_{III}$ . Протеїназа  $P_I$  здатна розщеплювати переважно  $\beta$ -казеїн. Щодо фракцій  $\alpha_{S1}$ - і к-казеїнів, її активність значно нижча. Протеїназа  $P_{III}$  активно гідролізує  $\alpha_{S1}$ - і к-казеїни, а також у меншій мірі  $\beta$ -казеїн [3]. Порівняння послідовностей амінокислотних залишків, які відповідають у протеїназ  $P_I$  і  $P_{III}$  за зв'язування субстрату, показало, що їх специфічність зумовлена мінорними генетичними варіаціями структурного гену PrtP. Первинна структура каталітичного домену є консервативною.

Визначення специфічності протеолізу казеїнових фракцій штамми лактококів має важливе значення у зв'язку з можливістю утворення біологічно активних пептидів. Причому, показано, що кожна казеїнова фракція є джерелом різних біологічно активних пептидів [4]. Також з розщеплення окремих казеїнових фракцій пов'язано утворення певних смакових пептидів, які впливають на органолептичні властивості ферментованих молочних продуктів [5].

У зв'язку із зазначеним вище, метою роботи є визначення специфічності дії

приклітинних протеїназ лактококів з використанням як субстратів гомогенних казеїнових фракцій.

## Матеріали і методи

У роботі було використано п'ять штамів мезофільних молочнокислих лактококів, які належать до підвиду *Lactococcus lactis ssp. lactis*. Штами були отримані з лабораторії мікробіології Литовського харчового інституту (м. Каунас) та кафедри технології молока і молочних продуктів Могильовського державного університету продовольства (Білорусь). При пересіванні штамів як поживне середовище використовували свіже знежирене стерилізоване молоко. Лактококи зберігали при 4°C. Титровану кислотність і тривалість коагуляції казеїну під час розвитку лактококів визначали загальноприйнятими методами. Протеолітичну активність лактококів визначати за модифікованим методом М. В. Залашка.

Загальний казеїн виділяли зі свіжого знежиреного молока триразовим ізоелектричним осадженням. Фракції  $\alpha_{S1}$ - і  $\beta$ -казеїнів виділяли диференційним осадженням у присутності сечовини і доочищували іонообмінною хроматографією на колонці з DEAE-toyopearl-650M (Sigma-Aldrich) [6]. Гомогенний к-казеїн отримували препаративним електрофорезом в анодній системі поліакриламідного гелю (ПААГ) [7]. Казеїнові фракції та продукти їх протеолізу аналізували методом електрофорезу в апараті Стадієра. При цьому використовували лужну буферну систему гелю (pH 7,9), що містила 25 мМ тріс, 27 мМ діетилбарбітурат, 3 мМ ЕДТА і 4,5 М сечовину [8]. Електрофореграми фіксували і проявляли загальноприйнятими методами. Для приготування електрофоретичних буферів і гелів використовували реактиви фірми «Reanal» (Угорщина).

Концентрацію казеїнових фракцій визначали на спектрофотометрі СФ-46 ( $\lambda=280$  нм). Для перерахунку використовували коефіцієнти поглинання ( $D_{1cm}^{1\%}$ ): 10,0 — для  $\alpha_{S1}$ -казеїну; 4,6 — для  $\beta$ -казеїну; 9,6 — для к-казеїну і 8,2 — для загального казеїну.

### Результати й обговорення

Для визначення загальної протеолітичної активності та відбору протеїназо-позитивних штамів було проведено їх короткотермінове вирощування (12 год) у стерильному знежиреному молоці при 30 °С. При цьому відбувається два паралельні процеси, пов'язані з протеолізом:

1) використання для живлення клітин лактококів амінокислот і коротких пептидів молока;

2) розщеплення казеїнів молока приклітинною протеїназою протеїназо-позитивних штамів.

У випадку розвитку протеїназо-позитивних штамів концентрація продуктів протеолізу через 12 годин культивування залишається незмінною або збільшується. Це залежить від активності та кількості приклітинної протеїнази [1]. Якщо штам відноситься до протеїназо-негативних — концентрація амінокислот і пептидів, що

не осаджуються 10% трихлороцтовою кислотою, зменшується.

Результати визначення концентрації продуктів протеолізу виражали у мг % тирозину і триптофану після осадження білків. Також було проведено тестування штамів на здатність утворювати молочну кислоту та коагулювати казеїни молока. Ці характеристики є одними з найважливіших у молочнокислих бактерій і тісно пов'язані з протеолітичною активністю. Результати наведені в Таблиці 1.

Із п'яти штамів лактококів лише один ( $l_5$ ) показав від'ємні значення протеолітичної активності. Тобто клітини цього штаму активно засвоюють амінокислоти і пептиди молока, але не здатні розщеплювати білки через відсутність приклітинної протеїнази. Для цього штаму також характерні найменші значення кислотоутворюючої активності і найнижча здатність коагулювати казеїни. Всі інші штами можна віднести до протеїназо-позитивних. Вони були відібрані для подальших досліджень.

Таблиця 1

### Характеристика біологічних властивостей штамів *Lactococcus lactis ssp. lactis*

Штам <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	Титрована кислотність (°Т) через 24 години інкубації**	Тривалість кислотної коагуляції казеїну (години)*	Загальна протеолітична активність (мг% тир+трип)**	Наявність (+) або відсутність (-) приклітинної протеїнази
$l_5$	55±5,2	22,1	-0,08±0,056	—
$l_{10}$	69±4,6	17,2	0,4±0,19	+
$l_{14}$	94±7,6	11,0	1,1±0,19	+
$l_{16}$	75±6,7	16,2	1,3±0,22	+
$l_{17}$	103±9,9	10,0	1,6±0,23	+

Примітка: \* — середнє значення з трьох вимірювань, \*\* —  $P < 0,05$

У перших спробах встановити специфічність приклітинних протеїназ лактококів було проведено електрофоретичний аналіз білкових фракцій після культивування лактококів у знежиреному стерилізованому молоці. Проте, навіть після довготривалого культивування (до 10 днів) не вдалось надійно встановити різницю у розщепленні окремих фракцій. Це пов'язано, в першу чергу, з великою кількістю білкових фракцій і високомолекулярних продуктів їх

протеолізу, які володіють подібними значеннями електрофоретичної рухливості і накладаються на електрофореграмах. Також попередня стерилізація знежиреного молока, яка необхідна для довготривалого культивування лактококів, призводить до взаємодії білків сироватки молока і казеїнів, що спричиняє утворення складних білкових агрегатів [9]. Це впливає на специфіку протеолізу і ускладнює ідентифікацію електрофоретичних фракцій. Ще одним

важливим фактором є відносно низька активність приклітинних протеїназ під час розвитку лактококів у знежирному молоці [1]. Коагуляція казеїнів не дає можливості відділити клітини лактококів від згустку і в результаті в проби для електрофоретичного аналізу також попадають компоненти клітин. При використанні розчинів загального казеїну кількість білкових фракцій в середовищі значно зменшується, але лактококи в такому середовищі ростуть дуже повільно і, відповідно, ступінь протеолізу є надто низьким для встановлення специфічності.

Для усунення вказаних недоліків нами було використано гомогенні фракції казеїнів, виділені диференційним осадженням і препаративним електрофорезом. Також для проведення протеолізу використовували концентрат клітин лактококів, які вирощували у знежиреному молоці в присутності стабілізатора і відмивали від компонентів середовища. При цьому приклітинні протеїнази залишалися зв'язаними з клітинами. Деталі отримання концентрату клітин лактококів описані раніше [10]. До 0,5 % розчину казеїнових фракцій додавали концентрат клітин лактококів і витримували 3 години при 30°C. Після інкубації клітини лактококів відцентрифугували (12000g, 15хв). Значення рН супернатанту доводили до 4,6 для осадження нерозщеплених казеїнових фракцій. Далі осад розчиняли у рівному об'ємі буферу для взірців і вносили по 10 мкл в комірки пластинок поліакриламідного гелю. Результати електрофорезу казеїнових фракцій після протеолізу різними штамми лактококів показані на рисунках 1, 2, 3.

Отримані результати свідчать, що штамми  $l_{10}$  і  $l_{17}$  у значній мірі розщеплюють  $\beta$ -казеїн. Очевидно, що вони володіють приклітинними протеїназами Р<sub>I</sub>-типу. Два інші штамми ( $l_{14}$  і  $l_{16}$ ) більш активно розщеплюють  $\alpha_{s1}$ - і  $\kappa$ -казеїни, тобто для них характерна активність Р<sub>III</sub>-типу.

## Висновки

Проведення протеолізу казеїнових фракцій на рівні клітин лактококів дозво-

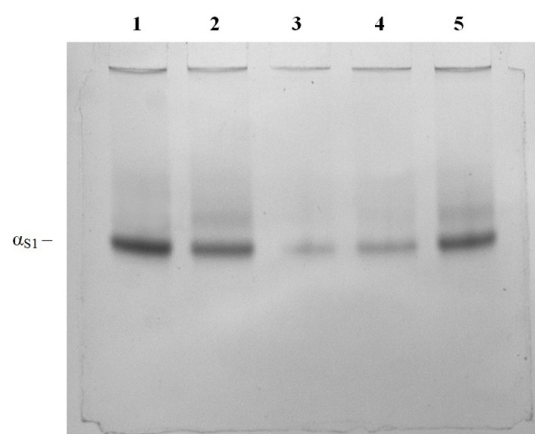


Рис. 1. Електрофореграма  $\alpha_{s1}$ -казеїну — 1;  $\alpha_{s1}$ -казеїну після інкубації зі штамми  $l_{10}$  — 2,  $l_{14}$  — 3,  $l_{16}$  — 4 і  $l_{17}$  — 5

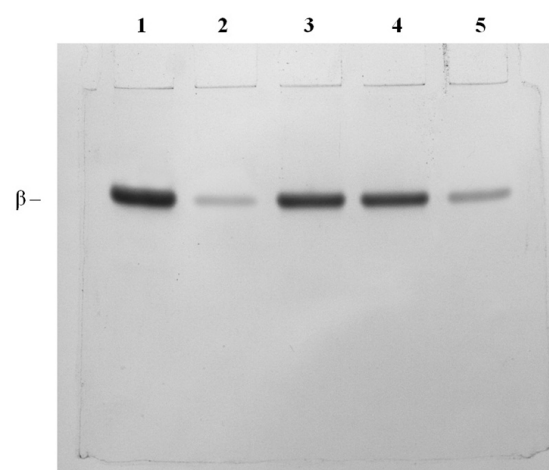


Рис. 2. Електрофореграма  $\beta$ -казеїну — 1;  $\beta$ -казеїну після інкубації зі штамми  $l_{10}$  — 2,  $l_{14}$  — 3,  $l_{16}$  — 4 і  $l_{17}$  — 5

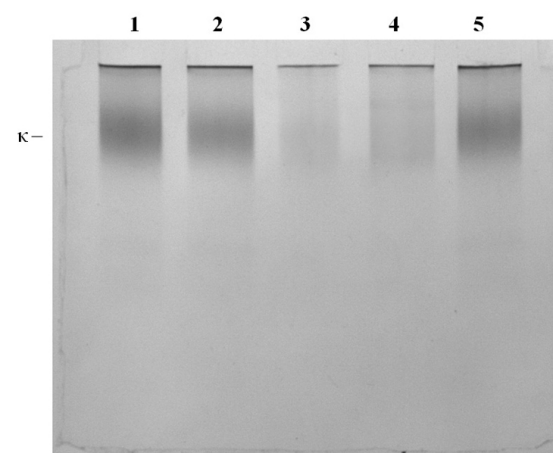


Рис. 3. Електрофореграма  $\kappa$ -казеїну-1;  $\kappa$ -казеїну після інкубації зі штамми  $l_{10}$  — 2,  $l_{14}$  — 3,  $l_{16}$  — 4 і  $l_{17}$  — 5

ляє встановити специфічність їхніх приклітинних протеїназ. Для підвищення інтенсивності та скорочення тривалості протеолізу доцільно використовувати концентрат клітин лактококів, вирощених в умовах збереження приклітинних протеїназ. Використання як субстратів гомогенних казеїнових фракцій дозволяє з допомогою електрофорезу надійно визначити тип приклітинної протеїнази.

**Перспективи подальших досліджень.**

В подальших дослідженнях доцільно підтвердити отримані дані щодо приналежності приклітинних протеїназ до P<sub>I</sub> або P<sub>III</sub> типу паралельним аналізом низькомолекулярних продуктів протеолізу казеїнових фракцій.

1. Kunji E., Mierau I., Hagting A., Poolman B. and Konings W. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1996, v. 70, P. 187–221.

2. Law J., Haandrikman A. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy Journal*. 1997, v.7, P. 1–11.

3. Visser S., Roblen A.J.P., Slangen C.J. Specificity of a cell-envelope located proteinase (P<sub>III</sub>-type) from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM1 and its action on bovine  $\beta$ -casein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, v. 35, P. 477–483.

4. Hartmann R. and Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007, v. 18, P. 163–169.

5. Exterkate F. The Lactococcal Cell Envelop Proteinases: Differences, Calcium-binding Effects and Role in Cheese Ripening. *Int. Dairy Journal*. 1995, v. 5, P. 995–1018.

6. Yukalo V.G. Obtaining of Casein Protein Complex from Cow Milk. *Nutracos*. 2005, № 5, P. 17–19.

7. Iukalo A.V. New Approach for Isolation of Individual Caseins from Cow Milk by the Preparative Electrophoresis. *Advanc. in Biol. Chem.* 2014, 4(6), P. 382–387.

8. Yukalo A.V., Yukalo V.G., Shynkaryk M.M. Electrophoresis separation of the milk protein. Proceeding of the International Conference on Bio and Food Electrotechnologies. Compiègne (France), 2009, P. 227–231.

9. Hurley W.L. Milk protein. Croatia: In Tech, 2012, 340 p.

10. Yukalo V.G. Casokinins creation during model proteolysis of  $\alpha_{S1}$ -casein by protease positive strains of *Lactococcus lactis ssp. cremoris*. *Annales Universitatis Marie Curie-Sklodowska* 2004. v. XVII. P. 205–207.