

УДК 663.15, 577.15

Ферментные препараты бактериальных протеаз для получения белковых гидролизатов без горечи

© 2020 Е.В. КОСТЫЛЕВА^{1*}, А.С. СЕРЕДА¹, И.А. ВЕЛИКОРЕЦКАЯ¹, Д.Т. МИНЕЕВА¹,
Н.В. ЦУРИКОВА¹, Е.А. РУБЦОВА²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии (ВНИИПБТ) — филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, 111033

² «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, 119071

*e-mail: ekostyleva@list.ru

Поступила в редакцию 25.03.2020 г.

После доработки 08.04.2020 г.

Принята к публикации 19.07.2020 г.

Проведен гидролиз казеина ферментными препаратами (ФП) бактериальных протеаз: Alcalase, Protamex, Neutrase, Протосубтилин. Обнаружена зависимость степени горечи полученных гидролизатов от снижения протеолитической активности препаратов в присутствии PMSF — ингибитора сериновых протеаз. Установлено, что применение ФП Neutrase обеспечивает получение гидролизатов без горечи, при этом в присутствии PMSF протеолитическая активность Neutrase снижается на 44%. Отечественный препарат Протосубтилин теряет 59% активности в присутствии PMSF и образует горькие гидролизаты. Наиболее сильной горечью характеризовались гидролизаты казеина, полученные с ФП Alcalase, активность которого полностью представлена действием сериновой протеазы. Из коллекции бактериальных продуцентов протеаз ВНИИПБТ выбран штамм *Bacillus subtilis* 359 с соотношением активности нейтральной и сериновой протеазы 52 и 48% соответственно. Из культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 359 получен сухой концентрированный препарат. Полученный препарат действовал аналогично Neutrase при ограниченном гидролизе казеина и обеспечивал отсутствие горечи в гидролизатах.

Ключевые слова: нейтральная протеаза, сериновая протеаза, горечь гидролизатов, *Bacillus subtilis*

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-42-48

К актуальным направлениям биотехнологии относится ферментативная обработка белоксодержащего сырья с получением белковых гидролизатов, которые характеризуются высокой питательной эффективностью и обладают рядом необходимых функциональных свойств для применения в пищевой промышленности в рационах для детей, спортсменов, пожилых людей, в производстве соусов, приправ, вкусовых добавок, супов, бульонов, напитков и др. [1]. Так, ферментативные гидролизаты белков молока часто используют в хлебопечении, производстве кондитерских изделий и спортивного питания на основе зернового сырья с целью улучшения функциональных и органолептических свойств,

коррекции аминокислотного состава, в частности увеличения содержания лизина [2–4]. Гидролизаты, обладающие функциональными свойствами: эмульгирующей, влагосвязывающей и водоудерживающей способностью, как правило, характеризуются невысокой степенью гидролиза — в пределах 10–15%. Их получают ограниченным протеолизом с использованием эндопротеаз [2, 5–7].

В большинстве процессов переработки растительного, животного и микробного белка в основном применяют бактериальные сериновые эндопротеазы, отличающиеся широкой субстратной специфичностью и способностью расщеплять трудногидролизуемые связи. Однако

Список сокращений: ФП — ферментные препараты; КЖ — культуральная жидкость; СГ — степень гидролиза; ПА — протеолитическая активность.

существенным недостатком сериновых протеаз при использовании в пищевой промышленности является органолептический параметр — сильная горечь образующихся пептидов даже при невысокой степени гидролиза [8]. Для получения гидролизатов с умеренной степенью гидролиза, требуемыми функциональными параметрами и удовлетворительными органолептическими характеристиками целесообразно применять препараты, содержащие нейтральную протеазу бактерий — бациллолизин [9]. Бациллолизин (КФ 3.4.24.28) — цинкзависимая металлопротеаза бактерий рода *Bacillus* с рН-оптимумом около 7 — широко используется в пищевой отрасли для снижения горечи гидролизатов, переработки рыбных отходов, модификации соевого и молочного белка, в пивоварении для устранения белковых помутнений и повышения экстрактивности суслу, а также в кормопроизводстве [9–11]. В сравнении с сериновыми протеазами бациллолизин высвобождает меньшее количество горьких пептидов [11, 12].

В исследованиях по гидролизу белоксодержащего сырья, включающих оценку органолептических, биоактивных и функциональных свойств получаемых гидролизатов, наиболее часто используют такие коммерческие ферментные препараты (ФП) бактериальных протеаз, как Alcalase (Novozymes A/S, Дания), основным компонентом которого является сериновая протеаза субтилизины *Bacillus licheniformis*; Protamex (Novozymes A/S, Дания), представляющий собой смесь субтилизины *B. licheniformis* и бациллолизина *Bacillus* sp.; Neutrase (Novozymes A/S, Дания), содержащий бациллолизин *B. amylolyquefaciens* [9, 12–14]. В некоторых экспериментах по получению белковых гидролизатов пищевого назначения использовали единственный отечественный препарат бактериальных протеаз — Протосубтилилин (ООО ПО «Сиббиофарм», Россия). Этот препарат производят на основе культуральной жидкости (КЖ) *Bacillus subtilis*. Протосубтилилин содержит комплекс нейтральных и щелочных протеаз и предназначен для кормопроизводства [15, 16].

Из литературы известно, что от компонентного состава протеолитических ФП зависят характеристики получаемых гидролизатов, в том числе их органолептические свойства [8, 12, 13]. Мы провели исследования по влиянию состава протеолитических ФП на горечь получаемых с их помощью гидролизатов казеина с целью выбора штамма-продуцента протеаз, перспективного для производства на его основе ФП для пищевой промышленности, обеспечивающих получение гидролизатов белка без горечи.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы. В работе использовали реактивы фирм «Реахим» (Россия), Bio-Rad (США) и Amresco (США). Для определения молекулярной массы в качестве белков-маркеров использовали набор Unsteined Protein Molecular Weight Marker, MW Range 14,4–116 kDa (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве субстрата при определении протеолитической активности использовали казеин фирмы Sigma (США), при получении гидролизатов казеина — сухой технический казеин (ГОСТ 17626-81 с массовой долей белка 90% в пересчете на сухое вещество), в качестве ингибитора сериновых протеаз использовали фенолметилсульфонилфторид (PMSF, Sigma).

Ферментные препараты и их характеристика. В работе использовали коммерческие ФП: Alcalase, Protamex, Neutrase (Novozymes A/S) и Протосубтилилин (ООО ПО «Сиббиофарм»), — а также лабораторный образец концентрированного ФП, полученного в результате распылительной сушки супернатанта КЖ штамма *B. subtilis* 359.

Протеолитическую активность ФП и содержащихся в КЖ ферментов определяли по универсальной методике, разработанной Sigma-Aldrich [17], при 30 °С и рН 7,2, используя в качестве субстрата казеин. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализировало отщепление 1 мкмоль тирозина за 1 мин в условиях опыта. Содержание белка в ФП определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Специфический ингибитор сериновых протеаз PMSF вносили в раствор фермента до получения конечной концентрации PMSF в реакционной смеси 10 мМ и инкубировали 10 мин при комнатной температуре.

Штаммы микроорганизмов. Штаммы *B. subtilis* из коллекции ВНИИПБТ культивировали глубинно при 35 °С в течение 72 ч в колбах объемом 750 мл с 50 мл ферментационной среды следующего состава (% масс.): разжиженный α-амилазой картофельный крахмал — 7, соевая мука — 4, кукурузный экстракт — 1, дрожжевой экстракт — 0,3, цинк сернокислый 7-водный — 0,01, натрий хлористый безводный — 0,033, сульфат аммония — 0,6, натрий фосфорнокислый однозамещенный — 1,25, натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный — 0,36. Посев в колбы проводили микробиологической петлей посевным материалом, полученным на скошенном пептонном агаре (3% пептона, 0,5% NaCl, 2% агар-агар) в течение 5 сут при 35 °С и хранившимся

в течение 3 недель при 4 °С. После ферментации биомассу продуцентов отделяли центрифугированием при 10 750 g в течение 5 мин. Супернатант культуральной жидкости использовали для определения протеолитической активности.

Получение лабораторного образца ферментного препарата. Штамм *B. subtilis* 359 культивировали глубинно в условиях, указанных выше. По окончании культивирования выросшую в колбах КЖ объединяли так, чтобы общий объем составил 1,8 л. Биомассу отделяли центрифугированием на центрифуге Beckman Coulter J6-MI (Beckman, США) при 4 600 об/мин в течение 40 мин. Супернатант КЖ высушивали с помощью лабораторной распылительной сушилки Mini Spray Dryer B-290 (Buchi Labortechnik AG, Швейцария).

Гидролиз технического казеина ферментными препаратами проводили при 50 °С в термостатируемом шейкере с перемешиванием при 1 100 об/мин. Реакционная смесь содержала субстрат в концентрации 100 г/л, pH 6,2, и ФП в расчете 1 ед. протеолитической активности (ПА)/г субстрата. Гидролиз казеина с использованием коммерческих ФП проводили в течение 2 ч. При сравнении лабораторного образца ФП с Neutrase гидролиз проводили в течение 30 мин, 1 и 2 ч. Ферменты инактивировали инкубацией реакционной смеси при 90 °С в течение 10 мин. Гидролизаты центрифугировали при 10 750 g в течение 5 мин. В полученных супернатантах определяли концентрацию общего растворимого белка методом Лоури. При определении содержания низкомолекулярных пептидов из супернатанта удаляли белковую фракцию с молекулярной массой выше 10 кДа, используя для этого 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, осадок отделяли центрифугированием и в полученном растворе определяли концентрацию белка по методу Лоури [18]. Степень гидролиза (СГ) казеина (в %) определяли по формуле:

$$СГ = [(ОРБ \text{ опыта} - ОРБ \text{ контроля}) / ОБ] \cdot 100,$$

где ОРБ опыта - общий растворимый белок в супернатанте после центрифугирования реакционной смеси, ОРБ контроля — общий растворимый белок в контрольных пробах (без ферментативной обработки), ОБ — общий белок в реакционной смеси (определяли по методу Кьельдаля [19]).

Степень горечи гидролизатов казеина определяли органолептически.

Результаты получены не менее чем в трех повторах.

Электрофорез белков. Разделение белков ФП проводили в 12%-ном полиакриламидном

геле (ПААГ), приготовленном на буфере, содержащем 25 мМ трис-глицин, pH 8,3, и 0,1% SDS, в системе Mini Protein Cell system (Bio-Rad). Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим G-250 (Amresco). Сериновые протеазы предварительно ингибировали 10 мМ раствором PMSF.

Масс-спектрометрический анализ. Полосу геля с исследуемым белком вырезали из ПААГ, белок обрабатывали трипсином, гидролизат анализировали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Обработку полученных данных проводили с использованием программы Bruker Data Analysis (Bruker Corporation, США). Поиск исследуемого белка по масс-спектрам в базах данных NCBI и SWISS-PROT осуществляли по программе Peptide Mass Fingerprint (Matrix Science Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гидролиз казеина с использованием коммерческих препаратов бактериальных протеаз

По данным ряда авторов, гидролизаты, получаемые с использованием ФП Alcalase, т.е. сериновой протеазы, характеризуются наибольшей степенью горечи в сравнении с гидролизатами, получаемыми с помощью других видов протеаз [13, 20]. Мы предположили, что степень горечи гидролизатов, получаемых с применением препаратов бактериальных протеаз, может коррелировать с содержанием в этих препаратах сериновой протеазы. В связи с этим на первом этапе исследований мы определили влияние содержания сериновых протеаз в различных коммерческих ФП на органолептические свойства и степень гидролиза казеина (табл. 1). Так как специфическим свойством сериновых протеаз является полная, необратимая потеря активности в присутствии ингибитора PMSF [21, 22], в качестве показателя содержания в препаратах сериновых протеаз мы рассматривали остаточную протеолитическую активность ФП в присутствии 10 мМ PMSF, определяемую как отношение протеолитической активности в присутствии PMSF к протеолитической активности ФП без ингибиторов.

Как видно из результатов, приведенных в табл. 1, наиболее горьким был гидролизат, полученный с использованием препарата Alcalase, активность которого практически на 100% представлена действием сериновой протеазы. Горькие гидролизаты были получены и при использовании Protamex, активность сериновой протеазы в котором составляет 67% от общей протеолитической активности. Наименьшей горечью

Остаточная протеолитическая активность коммерческих ферментных препаратов в присутствии PMSF и характеристика полученных гидролизатов казеина

Residual proteolytic activity of commercial enzyme preparations in the presence of PMSF, and characterization of casein hydrolysates obtained

ФП	Остаточная ПА в присутствии PMSF, %	Гидролизат казеина			Органолептический анализ
		Степень гидролиза, %	Концентрация низкомолекулярной фракции (< 10 кДа)		
			мг/мл гидролизата	% к общему белку	
Alcalase	< 1	12,1±0,7	5,5±0,2	6,1±0,3	очень горький
Protamex	33,0±1,6	16,1±0,9	7,4±0,3	8,2±0,4	горький
Протосубтилин	41,0±1,7	15,8±0,8	7,0±0,3	7,8±0,4	горький
Neutrase	56,0±2,0	15,8±0,8	7,3±0,3	8,0±0,4	негорький

Примечание: ПА – протеолитическая активность. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение по результатам 3 независимых экспериментов.

характеризовался гидролизат, полученный при обработке казеина Neutrase, однако протеолитическая активность этого ФП снижалась на 44% в присутствии PMSF. Степень гидролиза казеина и концентрация в гидролизатах низкомолекулярных пептидов при использовании препаратов, содержащих нейтральную протеазу, заметно превышали аналогичные показатели гидролизатов полученных с помощью ФП Alcalase, активность которого полностью обусловлена действием сериновой протеазы. В отечественном препарате Протосубтилин 59% протеолитической активности обусловлено действием сериновой протеазы; при этом полученные гидролизаты по степени гидролиза и выходу низкомолекулярных пептидов были сравнимы с гидролизатами казеина, полученными при обработке препаратом Neutrase, но отличались от последнего наличием горечи.

Так как горечь полученных гидролизатов казеина наиболее очевидно отрицательно коррелировала с остаточной протеолитической активностью ФП в присутствии ингибитора сериновых протеаз, на следующем этапе исследований выбор штамма-производителя протеаз из коллекции ВНИИПБТ проводили, ориентируясь на этот показатель.

Выбор штамма *Bacillus subtilis* – производителя протеаз

Шесть штаммов *B. subtilis* из коллекции ВНИИПБТ культивировали глубинно в течение 72 ч при 35 °С на среде, содержащей кукурузный крахмал, соевую муку, дрожжевой экстракт, соли. В супернатантах КЖ определяли общую протеолитическую активность и остаточную в присутствии PMSF (рис. 1).

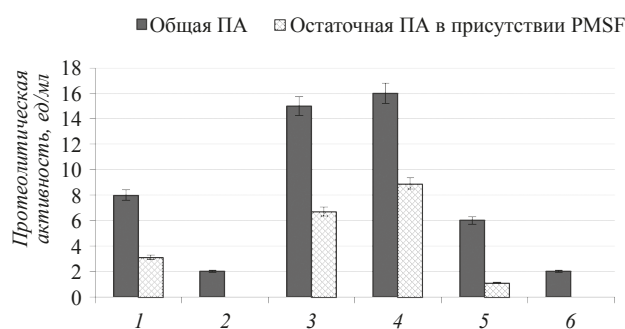


Рис. 1. Протеолитическая активность штаммов *B. subtilis* в отсутствие и в присутствии PMSF. Представлен анализ следующих штаммов *B. subtilis*: № 327 (1), 103 № 353 (2), 1РС № 357 (3), 18 № 359 (4), 3084 № 364 (5) и 3053 № 365 (6).

Fig. 1. The proteolytic activity of *B. subtilis* strains in the absence and presence of PMSF. The following *B. subtilis* strains were analyzed: N 327 (1), 103 N 353 (2), 1PC N 357 (3), 18 N 359 (4), 3084 N 364 (5), 3053 N 365 (6).

Наличие не ингибируемой PMSF протеолитической активности обнаружили для штаммов *B. subtilis* № 327, 1РС № 357, 18 № 359 и 3084 № 364. Наиболее продуктивными по общей протеолитической активности и содержанию устойчивой к PMSF протеазы оказались штаммы *B. subtilis* 1РС № 357 и 18 № 359. На электрофореграмме образцов КЖ (рис. 2), проявляющих протеолитическую активность в присутствии PMSF, заметна полоса на уровне около 40 кДа, предположительно соответствующая бациллолизину. Также присутствуют полосы в диапазоне 55–60 кДа, предположительно соответствующие α-амилазе, и около 30 кДа, что может указывать на присутствие сериновой протеазы. Полоса, предположительно

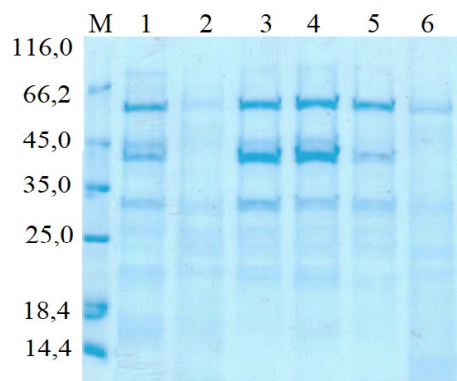


Рис. 2. Электрофоретический анализ супернатантов культуральной жидкости штаммов *B. subtilis*: № 327 (1), 103 № 353 (2), 1РС № 357 (3), 18 № 359 (4), 3084 № 364 (5) и 3053 № 365 (6).

Fig. 2. Electrophoregrams of culture liquid supernatants of *B. subtilis* strains: N 327 (1), 103 N 353 (2), 1PC N 357 (3), 18 N 359 (4), 3084 N 364 (5), 3053 N 365 (6).

соответствующая бациллолизину, наиболее выражена на электрофореграммах КЖ штаммов *B. subtilis* 1РС № 357 и 18 № 359, обладающих также наиболее высокой активностью протеаз, устойчивых к действию PMSF.

На основании общей протеолитической активности и остаточной в присутствии PMSF для дальнейших исследований был выбран штамм *B. subtilis* 18 № 359 (рабочее название *B. subtilis* 359) с общей протеолитической активностью в КЖ на уровне 16 ± 1 ед/мл и содержанием нейтральных протеаз 52%, что наиболее близко к показателям препарата Neutrase, применение которого позволяет получить гидролизат казеина без горечи.

Из КЖ штамма *B. subtilis* 359 методом распылительной сушки был получен сухой концентрированный ФП с общей протеолитической активностью 217 ± 10 ед/г, остаточной активностью в присутствии PMSF 112 ± 7 ед/г и содержанием растворимого белка 67 ± 3 мг/г.

Основные компоненты ферментного препарата на основе *B. subtilis* 359

По результатам электрофореза в ПААГ-SDS, приведенным на рис. 3, в ФП Neutrase обнаружены две мажорные и три минорные полосы, а в препарате на основе *B. subtilis* 359 — три мажорные и две более слабые полосы. По данным масс-спектрометрии основные полосы в ФП Neutrase соответствуют бациллолизину (38,8 кДа) и α -амилазе *B. amyloliquefaciens* (58 кДа), а минорные — α -амилазе (35,5 кДа) и бациллолизину (26,1 и 28,2 кДа). В препарате на основе *B. subtilis* 359 мажорные

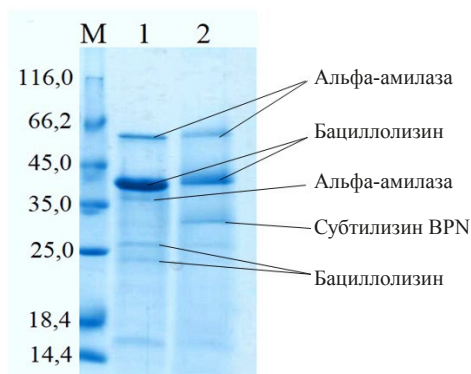


Рис. 3. Электрофоретический анализ в 12%-ном SDS-ПААГ коммерческого препарата Neutrase (1) и препарата на основе КЖ *B. subtilis* 359 (2).

Fig. 3. Electrophoregrams of the enzyme preparations: Neutrase (1) and *B. subtilis* 359 culture liquid (2).

полосы соответствуют бациллолизину *B. amyloliquefaciens* (38,8 кДа), α -амилазе *B. amyloliquefaciens* (58 кДа), субтилизину BPN' (30,5 кДа), а минорные полосы, как и в ФП Neutrase, — фрагментам бациллолизина.

Таким образом, анализ компонентного состава двух ФП показал, что препарат на основе *B. subtilis* 359 аналогичен Neutrase по содержанию основных компонентов: бациллолизина и α -амилазы, — но отличается присутствием сериновой протеазы — субтилизина BPN'.

Гидролиз казеина препаратом на основе *B. subtilis* 359

Проведен сравнительный анализ гидролиза казеина новым препаратом на основе КЖ штамма *B. subtilis* 359 и ФП Neutrase. Установлено, что по степени гидролиза субстрата, накоплению пептидов с молекулярной массой менее 10 кДа и характеру изменения этих показателей в процессе гидролиза, препарат на основе *B. subtilis* 359, в целом, аналогичен Neutrase (рис. 4). Через 2 ч степень гидролиза казеина коммерческим препаратом Neutrase составила 15,9%, а ФП на основе *B. subtilis* 359 — 16,3%. В полученных гидролизатах горечь отсутствовала. Присутствие субтилизина BPN' в препарате на основе *B. subtilis* 359 не повлияло на органолептические характеристики полученного продукта.

Таким образом, ферментный препарат, полученный на основе штамма *B. subtilis* 359 из коллекции ВНИИПБТ, по основным параметрам соответствует импортному коммерческому препарату Neutrase — обеспечивает аналогичную степень гидролиза казеина и получение гидролизатов без

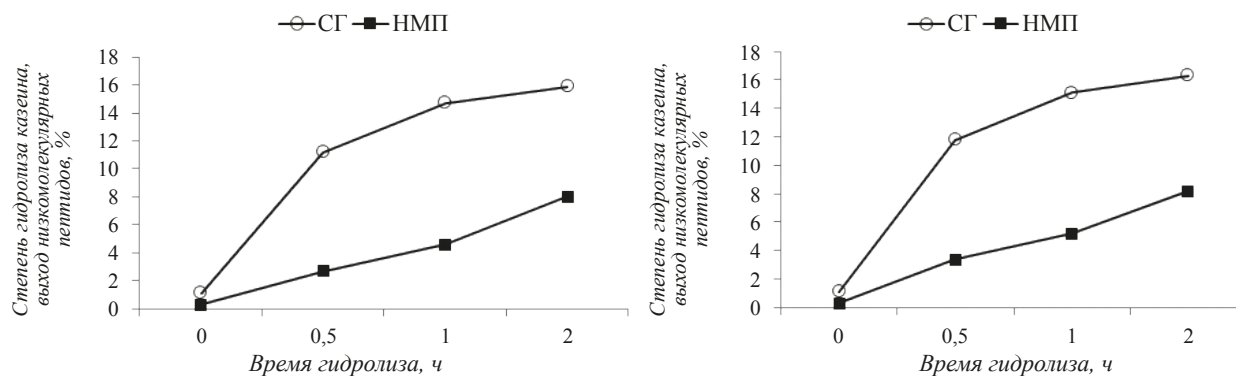


Рис. 4. Степень гидролиза (СГ) казеина и выход низкомолекулярных пептидов (НМП) при использовании препарата Neutrased (a) и ФП на основе *B. subtilis* 359 (b).

Fig. 4. The degree of the casein hydrolysis (DH) and yield of low-molecular weight peptides using Neutrased (a) and the *B. subtilis* 359 enzyme preparation (b).

горечи, что свидетельствует о целесообразности производства этого ФП и перспективности его применения в процессах получения белковых гидролизатов для пищевой промышленности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Научно-исследовательская работа по подготовке рукописи проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019–2021 годы (тема № 0529-2019-0066).

ЛИТЕРАТУРА

1. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. Свойства и применение белковых гидролизатов. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2000, 36(5), 525–534.
2. Crowley P., O'Brien C., Slattery H., Chapman D., Arendt E., Stanton C. Functional properties of casein hydrolysates in bakery applications. *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, 215, 131–137. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0510-5>
3. Slattery H., Fitzgerald R. Functional properties and bitterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a *Bacillus* proteinase. *J. Food Sci.*, 1998, 63, 418–422. doi: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb15755.x
4. El-Salam M.H. Abd, El-Shibiny S. Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2017, 57(6), 1119–1132. doi: 10.1080/10408398.2014.899200
5. Bao Z., Zhao Y., Wang X., Chi Y. Effects of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties of egg yolk hydrolysate with alcalase. *J. Food Sci. Technol.*, 2017, 54, 669–678. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2504-0>
6. Singh, A.M.; Dalgleish, D.G. The emulsifying properties of hydrolyzates of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81, 918–924.
7. Ven C., Gruppen H., Bont D., Voragen A. Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 5005–5012. doi: 10.1021/jf010144c
8. Курбанова М.Г. Ферментативный гидролиз белков молока с использованием различных протеаз. *Вестник КрасГАУ*, 2010(1), 157–160.
9. Ou J., Zhu M. An overview of current and novel approaches for microbial neutral protease improvement. *Int. J. Modern Biol. Med.*, 2012, 2 (1), 1–31.
10. Wang H., Yang L., Ping Y., Bai Y., Luo H., Huang H., Yao B. Engineering of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with high neutral protease producing capacity and optimization of its fermentation conditions. *PLoS One*, 2016, 11(1), e0146373. doi: 10.1371/journal.pone.0146373
11. Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M. Microbial proteases applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2019, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
12. Schlegel K., Sontheimer K., Hickisch A., Wani A.A., Eisner P., Schweiggert Weisz U. Enzymatic hydrolysis of lupin protein isolates — changes in the molecular weight distribution, technofunctional characteristics, and sensory attributes. *Food Sci. Nutr.*, 2019, 7, 2747–2759. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1139>
13. Seo W.H., Lee H.G., Baek H.H. Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis. *J. Food Sci.*, 2008, 73, 41–46. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00610.x
14. Ferri M., Graen-Heedfeld J., Bretz K., Guillon F., Michelini E., Calabretta M.M., et al. Peptide fractions obtained from rice by-products by means of an environment-friendly process show *in vitro* health-related bioactivities. *PLoS One*, 2017, 12(1), e0170954. doi:10.1371/journal.pone.0170954

15. Zinchenko D.V., Muranova T.A., Melanyina L.A., Belova N.A., Miroshnikov A.I. Soy and rapeseed protein hydrolysis by the enzyme preparation protosubtilin. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2018, 54, 294–300. <https://doi.org/10.1134/S000368381803016X>
16. Головач Т.Н., Курченко В.П., Сурвило Л.И. Антигенные свойства нативных и термообработанных сывороточных белков и их частичных ферментативных гидролизатов. *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*, 2011, 6(1), 209–223. <http://elib.bsu.by/handle/123456789/16360>
17. Cupp-Enyard C. Sigma's non-specific protease activity assay — casein as a substrate. *J. Vis. Exp.*, 2008, 19, 899. doi: 10.3791/899
18. Малахова М.Я., Соломенников А.В., Беляков Н.А., Владыка А.С. Определение МСМ в сыворотке крови осаждением белков ТХУ и ультрафильтрацией. *Лабораторное дело*, 1987, № 3, 224–226.
19. ГОСТ 23327-98. Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка. М.: Стандартинформ, 2009, 18 с.
20. Fan W., Tan X., Xu X., Li G., Wang Z., Du M. Relationship between enzyme, peptides, amino acids, ion composition, and bitterness of the hydrolysates of Alaska pollock frame. *J. Food Biochem.*, 2019, 43,e12801. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12801>
21. Kumar C.G., Takagi H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.*, 1999, 17(7), 561–594. doi: 10.1016/s0734-9750(99)00027-0
22. Mienda B., Yahya A., Galadima I., Shamsir S. An overview of microbial proteases for industrial applications. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 2014, 5, 388–396.

Bacterial Protease Enzyme Preparations for the Production of Non-Bitter Protein Hydrolysates

E.V. KOSTYLEVA^{1*}, A.S. SEREDA¹, I.A. VELIKORETSKAYA¹, D.T. MINEEVA¹, N.V. TSURIKOVA¹, and E.A. RUBTSOVA²

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology (VNIIPBT), Moscow, 111033 Russia

² Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: ekostyleva@list.ru

Received March 25, 2020

Revised April 8, 2020

Accepted July 19, 2020

Abstract—Casein hydrolysates were obtained using enzyme preparations (EPs) of bacterial proteases, Alcalase, Protamex, Neutrase, and Protosubtilin. The dependence of the hydrolysate bitterness on the decrease of the EP proteolytic activity in the presence of PMSF, an inhibitor of serine proteases, was observed. It was found that the use of Neutrase provided non-bitter hydrolysates, while the proteolytic activity of Neutrase decreased by 44% in the presence of PMSF. A domestic EP of Protosubtilin lost 59% activity in the presence of PMSF and formed bitter hydrolysates. Casein hydrolysates obtained using Alcalase were characterized by the most severe bitterness, probably due to the fact that almost all proteolytic activity in this preparation is represented by a serine protease. The *Bacillus subtilis* 359 strain with a ratio of neutral and serine protease activities of 52 to 48% was selected from the VNIIPBT Collection of Bacterial Producers of Proteases. The concentrated preparation was obtained from the culture liquid of *B. subtilis* 359 strain by spray-drying. The preparation obtained hydrolyzed casein similarly to Neutrase and ensured the absence of bitterness in hydrolysates.

Key words: neutral protease, serine protease, bitterness of hydrolysates, *Bacillus subtilis*

Funding—This work was financially supported by a Grant of the Basic Research Program of the Russian Academy of Sciences for 2019–2021 (Project no. 0529-2019-0066).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-42-48