



УДК 577.122.2

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Рытченкова О.В., Красноштанова А.А.

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва,
e-mail: jkz-kz@mail.ru*

Исследована возможность переработки фракции сывороточных белков в белковые гидролизаты. Методом ультрафильтрации получен концентрат сывороточных белков. Подобраны оптимальные условия проведения процесса ферментативного гидролиза полученного концентрата при использовании препаратов трипсина, химотрипсина, химопсина и панкреатина. При гидролизе химопсином и панкреатином получены белковые гидролизаты, содержащие не менее 17% аминного азота от общего содержания белковых веществ.

Ключевые слова: молочная сыворотка, сывороточные белки, ферментативный гидролиз, белковый гидролизат

OPTIMISATION OF OBTAINING OF WHEY PROTEIN ENZYMATIC HYDROLYSATES WITH USING PROTEOLYTIC ENZYMES

Rytchenkova O.V., Krasnoshtanova A.A.

Mendeleev's Russian Chemico-Technological University, Moscow, e-mail: jkz-kz@mail.ru

Possibility of processing of whey protein fraction is investigated with obtaining of protein hydrolysates. Whey protein concentrate is obtained by means of a ultrafiltration method. Optimal conditions of enzymatic hydrolysis of given concentrate with using trypsin, chymotrypsin, chymopsin and pancreatin are chosen. Protein hydrolysates using chymopsin and pancreatin were contained of not less 17% amine nitrogen of general protein amount.

Keywords: whey, whey proteins, enzymatic hydrolysis, protein hydrolysate

Белки, содержащиеся в молочной сыворотке и концентратах сывороточных белков, обладают ценными биологическими свойствами. Наибольшее практическое значение имеют β -лактоглобулин и α -лактоальбумин, доля которых в сывороточных белках составляет 70-80%. Аминокислотный состав этих белков наиболее близок к аминокислотному составу мышечной ткани человека, а по содержанию незаменимых аминокислот (лизина, триптофана, метионина, треонина) и аминокислот с разветвленной цепью (валина, лейцина и изолейцина) они превосходят все остальные белки животного и растительного происхождения [4].

Из литературных данных известно, что сывороточный белок β -лактоглобулин, содержащийся в коровьем молоке, обладает ярко выраженными антигенными свойствами. В целях снижения антигенных свойств молочное сырье можно подвергнуть тепловой обработке. Однако длительное нагревание уменьшает питательную ценность молока и может привести к снижению растворимости и слабой перевариваемости продукта. Наиболее эффективным способом уменьшения аллергенности белков молочной сыворотки считают проведение гидролиза, в результате которого образуются белковые гидролизаты – продукты с высоким содержанием свободных аминокислот и низкомолекулярных полипептидов [3].

Гидролиз сывороточных белков может быть осуществлен при действии химиче-

ских агентов (щелочь, кислота) или ферментных препаратов. Однако наибольший интерес вызывает именно ферментативный гидролиз, позволяющий получить гидролизаты с заданными свойствами. Преимуществом ферментативного гидролиза сывороточных белков является высокая скорость при относительно мягких условиях: атмосферном давлении и температуре не выше 70°C (как правило, 37–50°C). Поэтому в результате ферментативного гидролиза практически не происходит разрушения аминокислот и снижения биологической ценности конечного продукта. Особенностью действия протеолитических ферментов является их специфичность по отношению к типу пептидной связи, что позволяет получать гидролизаты с различной степенью гидролиза белка [1, 2]. В зависимости от содержания аминокислот, молекулярной массы полипептидной фракции, наличия ди-, три- и олигопептидов может быть определена область наиболее эффективного использования гидролизатов. Гидролизаты сывороточных белков добавляют в кондитерскую и хлебобулочную продукцию, продукты мясного производства; они входят в состав напитков для спортсменов и заменителей женского молока благодаря высокой пищевой ценности, отсутствию горького вкуса и низким антигенным свойствам [5].

Целью данной работы являлось исследование процесса ферментативного гидролиза белков молочной сыворотки различ-



ными протеолитическими препаратами и выбор оптимальных условий для получения ферментативных гидролизатов с высоким содержанием низкомолекулярных пептидов и аминокислот.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований являлась фракция сывороточных белков, полученная после выделения из молочной сыворотки минорных компонентов лактоферрина, лактопероксидазы и иммуноглобулинов. Ее основные характеристики следующие: плотность—1005 г/л, содержание сухих веществ – 5,1%, из них белков – 7,1 г/л, углеводов – 35,9 г/л. Ультрафильтрацию проводили в лабораторной ультрафильтрационной ячейке с использованием полисульфонатных мембран.

В качестве ферментных препаратов были использованы трипсин (4040 ± 120 ед/г), химотрипсин (4960 ± 150 ед/г), химопсин (5250 ± 160 ед/г) производства «Самсон-Мед» (Россия) и панкреатин медицинский (5310 ± 160 ед/г) производства Rapheas (Италия). Общую протеолитическую активность ферментов определяли модифицированным методом Ансона с использованием в качестве субстрата казеината натрия. При построении калибровочного графика использовали стандартные растворы тирозина.

Концентрацию белковых веществ определяли методом Лоури. Для построения калибровочной кривой использовали стандартные растворы казеина. Содержание низкомолекулярных пептидов определяли модифицированным методом Лоури с предварительным осаждением белков и высокомолекулярных пептидов трихлоруксусной кислотой.

Содержание аминного азота в растворе определяли методом формольного титрования.

Определение молекулярной массы белка определяли методом гель-хроматографии с использованием колонки, заполненной полимерным гелем Молселект

G-75 (рабочий диапазон 3000–70000 Дальтон). Для построения калибровочного графика использовали стандартные растворы белков в концентрации 1 мг/мл. В собранных фракциях определяли содержание белковых веществ по поглощению при длине волны 280 нм.

Результаты исследования и их обсуждение

Согласно гель-хроматографии фракция главных сывороточных белков содержит белки с молекулярными массами 65–70 кДа (7,2%), 35–40 кДа (59,7%) и 14–18 кДа (33,1%), что соответствует бычьему сывороточному альбумину, димеру β -лактоглобулина и α -лактоальбумину.

С целью получения очищенных ферментативных гидролизатов первоначально проводили концентрирование сывороточных белков методом ультрафильтрации и отмычку от низкомолекулярных веществ методом диафильтрации. Для данного процесса были использованы мембраны УПМ-10, УПМ-20, УПМ-50, УПМ-100. Для количественной характеристики процесса ультрафильтрации и выбора оптимальной мембраны рассчитывали значения производительности G и интегральной селективности ϕ для каждой использованной мембраны. При увеличении кратности концентрирования резко падает производительность всех мембран и происходит замедление процесса, поэтому ограничили проведением 5-кратного концентрирования. В результате данного процесса получили концентрат сывороточных белков и пермеат, обогащенный низкомолекулярными компонентами исследуемой фракции (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика эффективности использования мембранных элементов

Мембрана	G , л/м ² ·ч	ϕ , %	Содержание белковых веществ, г/л		Молекулярно-массовое распределение белковых веществ в пермеате, %	
			Концентрат	Пермеат	$M = 18-20$ кДа	$M < 5$ кДа
УПМ-10	2,2	93,1	32,73	0,69	5,5	94,5
УПМ-20	5,49	90,5	31,98	0,88	2,8	97,2
УПМ-50	4,39	89,9	31,82	0,92	7,4	92,6
УПМ-100	4,39	86,9	31,01	1,12	10,2	89,8

Исследование молекулярно-массового распределения белковых веществ в полученных пробах пермеатов показало, что часть белковых веществ, проходящая через мембраны, соответствует протеозо-пептонной фракции молочной сыворотки (Молекулярная масса < 5000 Дальтон). При этом при использовании мембран УПМ-10 и УПМ-20 наблюдается минимальное присутствие в пермеате более крупных молекул сывороточных белков (Молекулярная

масса = 18000–20000 Дальтон). Хотя значения интегральной селективности для обеих мембран достаточно высокие (не ниже 90%), в дальнейшей работе была использована мембрана УПМ-20, отличающаяся более высокой производительностью по сравнению с УПМ-10 (соответственно 5,49 л/м²·ч и 2,2 л/(м²·ч)). Основные параметры процесса 5-кратного ультраконцентрирования фракции сывороточных белков на мембране УПМ-20 представлены в табл. 2.

Таблица 2

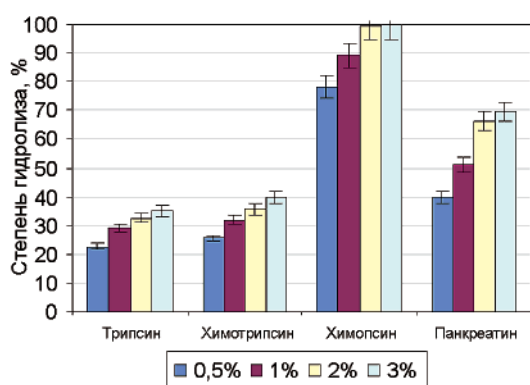
Основные параметры процесса 5-кратного ультраконцентрирования на мембране УПМ -20

Степень концентрирования	G, л/м ² ·ч	φ, %	Концентрация белка в концентрате, г/л
2	6,4	92	13,1 ± 0,7
3	5,8	91,5	19,5 ± 0,9
4	5,6	91,5	26 ± 1,3
5	5,5	90,5	32,3 ± 1,6

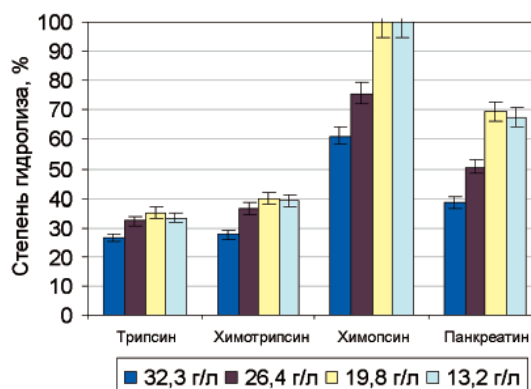
Ферментативный гидролиз можно осуществить с применением протеаз животного, растительного и микробного происхождения. Однако при получении белковых гидролизатов пищевого назначения предпочтение отдается использованию протеолитических ферментов животного происхождения, выделенных из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Для щелочных протеаз (трипсин, химо tripsин), а также комплексных препаратов, содержащих данные ферменты (химопсин, панкреатин), известны оптимальные условия проведения процесса (рН 7,2–8,0, $t = 45...50^{\circ}\text{C}$). В ходе гидролиза происходит освобождение аминокислот, что приводит к понижению рН. Ведение процесса при начальном значении рН 8,0 позволяет не проводить добавление

щелочи для рН-статирования, что уменьшает количество поступающих в конечный продукт солей.

Были исследованы зависимости степени гидролиза (рН 8,0, $t = 47^{\circ}\text{C}$) от начальной концентрации белка в растворе (13,2; 19,8; 26,4; 32,3 г/л, что соответствует степени ультраконцентрирования $n = 2,3,4,5$) и соотношения фермент-субстрат ($E/S = 0,5; 1; 2; 3\%$). Установлено, что максимальная степень гидролиза для всех серий проведенных экспериментов наблюдается при времени гидролиза $\tau = 3$ ч. Степень гидролиза оценивали по увеличению содержания низкомолекулярной пептидной фракции (Молекулярная масса < 2000 Да), не осаждаемой трихлоруксусной кислотой (рис. 1. а,б).



а



б

Рис. 1. Зависимость степени гидролиза: а – от соотношения E/S ($C_0 = 19,8$ г/л); б – от начальной концентрации белка в растворе ($E/S = 3\%$)

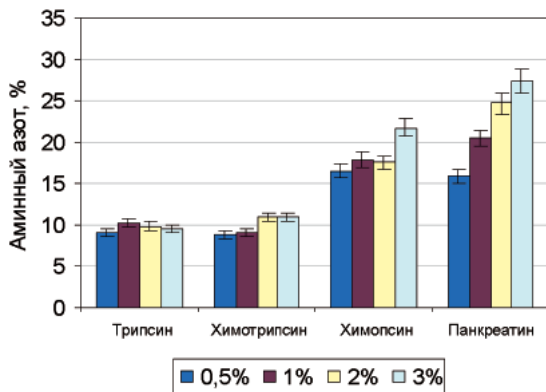
Гидролиз протеолитическими ферментами происходит с разрывом пептидных связей и образованием более коротких полипептидных цепей и свободных аминокислот, которые не аллергенны. Считается, что пептиды с молекулярной массой менее 1000–1800 Да сами по себе не являются антигенами. Методом гель-хроматографии установлено, что гидролиз используемыми ферментами протекает с образованием

20–100% коротких пептидов с молекулярной массой менее 2000 Дал.

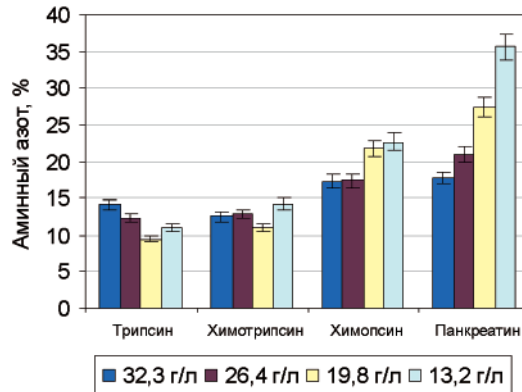
Из рис. 1 а и б видно, что наибольшая степень гидролиза (до 100%) достигается при действии химопсином при соотношении $E/S = 3\%$ в течение 3 ч. При этом начальная концентрация белка в растворе должна составлять 19–26 г/л, что соответствует 3–4-кратному концентрированию фракции сывороточных белков.

Известно, что качество белковых гидролизатов в значительной степени зависит от содержания в них свободных аминокислот. На рис. 2. а и б представлены данные по содержанию аминного

азота от общего содержания белка (%) в ферментативных гидролизатах, полученных при различных соотношениях E/S и различных начальных концентрациях субстрата.



а



б

Рис. 2. Зависимость содержания аминного азота: а – от соотношения E/S ($C_0 = 19,8$ г/л); б – от начальной концентрации белка в растворе (E/S = 3%)

Из рис. 2 а и б видно, что при действии ферментным препаратом панкреатином и соотношении E/S = 3% в течение 3 ч наблюдается более глубокий гидролиз с получением белкового гидролизата, содержащего 27–37% аминного азота. При этом начальная концентрация белка в растворе должна составлять 13,2–19,8 г/л, что соответствует 2–3-кратному концентрированию фракции сывороточных белков.

Таким образом, в результате действия на концентрат сывороточных белков ферментными препаратами трипсином, химотрипсином, химопсином и панкреатином получены ферментативные гидролизаты сывороточных белков с различными свойствами. При использовании комплексных ферментных препаратов (химопсин, панкреатин) наблюдается более глубокий гидролиз по сравнению с использованием монопрепаратов (трипсин, химотрипсин), а образующиеся ферментативные гидролизаты содержат не менее 17% аминного азота.

Список литературы

1. Максимюк Н.Н., Марьяновская Ю.В. О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов // *Фундаментальные исследования: материалы конференции.* – 2009. – №1. – С. 34–35.
2. Патент РФ №2375910 С1, 20.12.2009.
3. Токаев Э.С., Баженова Е.Н., Мироедов Р.Ю. Современный опыт и перспективы использования препаратов сывороточных белков в производстве функциональных напитков // *Молочная промышленность.* – 2007. – №10. – С. 55–56.
4. Severin S., Wenshui X. Milk biologically active components as nutraceuticals: review // *Food Sci Nutr.* – 2005. – Vol. 45 (7-8). – P. 645–656.
5. Sinha R., Radha C., Prakash J., Kaul P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation // *Food Chemistry.* – 2007. – Vol. 101. – P. 1484–1491.

Рецензенты:

Евдокимов И.А., д.т.н., профессор, зав. кафедрой прикладной биотехнологии Северо-Кавказского государственного технического университета, г. Ставрополь;

Иванкин А.Н., д.х.н., профессор, зав. кафедрой химии и биотехнологии МГУЛ, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 30.05.2011.