УДК 637.147:663.15

ВЫБОР ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИЗАТОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ С НИЗКОЙ АЛЛЕРГЕННОСТЬЮ

Борисова Г.В., Новосёлова М.В., Бондарчук О.Н., Малова Ю.С.

Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, Кемерово, e-mail: galinanikit@yandex.ru

Выбраны ферментные препараты, ведущие к снижению аллергенных свойств молочной сыворотки. Подбор ферментных препаратов для гидролиза сырья проведён на основе анализа литературных данных по специфичности ферментов (сайты гидролиза) с помощью программы PeptideCutter (http://expasy.org.), а также данных эпитопного картирования аллергенов молочной сыворотки. В полученных гидролизатах каждой фракции определено количество оставшихся эпитопов, сайтов расщепления и свободных аминокислот на примере самой аллергенной фракции β-лактоглобулина (для других фракций наблюдалась аналогичная картина). Наиболее оптимальным с точки зрения остаточной антигенности и содержания свободных аминокислот являются следующие ферменты: Protamex, Alcalase и thermolysin. При анализе негорьких пептидов, выпускаемых компанией DSM, выбран фермент corolase (экзопептидаза). В итоге в процессе исследований выбраны 4 ферментных препарата: Protamex, Alcalase, thermolysin и corolase, которые при оптимальных ферментативных условиях позволят снизить аллергенность гидролизатов молочной сыворотки.

Ключевые слова: ферментативные препараты, гидролизаты молочной сыворотки, гидролизаты с низкой аллергенностью, протамекс, алкалаза, термолизин, аллергенные фракции, эпитопы

CHOICE ENZYME PREPARATION TO OBTAIN WHEY HYDROLYZATE LOW ALLERGENICITY

Borisova G.V., Novoselova M.V., Bondarchuk O.N., Malova Y.S.

Kemerovo Technological Institute of The Food Industry, Kemerovo, e-mail: galinanikit@yandex.ru

Selected enzymes, leading to a decrease in the allergenic properties of whey. Selection of enzyme preparations for hydrolysis of raw materials based on a review of published data on the specificity of enzymes (hydrolysis sites), using PeptideCutter (http://expasy.org.), as well as data epitope mapping allergen whey. In the resulting hydrolysates of each fraction determined the number of remaining epitopes cleavage sites and free amino acids in the example of the allergenic fractions β-lactoglobulin (for other factions, a similar picture). The best in terms of the residual antigenicity and free amino acids are the following enzymes: Protamex, Alcalase and thermolysin. By hydrolysis with proteinase K was observed minimal residual antigenic determinants, but the proteins are hydrolyzed to the high content of free amino acids, which is undesirable. In the analysis is not bitter peptides produced by DSM, selected enzyme corolase (exopeptidase). During the investigation, the four enzyme preparation: Protamex, Alcalase, thermolysin and corolase, which under optimal enzymatic conditions will reduce the allergenicity of whey hydrolysates.

Keywords: enzyme preparations, hydrolyzed whey, hydrolysates with low allergenicity, protameks, alcalase, thermolysin, allergenic fractions, epitopes

В нашей стране в молочной промышленности молокоперерабатывающие предприятия производят большие количества цельного и обезжиренного молока на сыр, творог и технический казеин, где в результате образуется побочный продукт – молочная сыворотка, которую в большинстве случаев сливают в канализацию как отходы производства, что является негативным с экологической точки зрения и просчетом с экономической.

Объемы получаемой молочной сыворотки теоретически достигают 90 % объема перерабатываемого молока: практически они несколько меньше из-за неполного сбора и технологических потерь. В сыворотку переходит около 50 % сухих веществ молока. По данным Международной молочной федерации из 120 млн т молочной сыворотки, получаемой в мире (в России – более 15 млн т), до 15 % сливается в канализацию, что приводит к безвозвратной потере около 400 тыс. т молочного белка и ряда других ценных компонентов молочного сырья [1].

В условиях дефицита и значительной стоимости молочного сырья молочную сыворотку целесообразно использовать полностью, в первую очередь для увеличения выпуска пищевых продуктов. Однако молочная сыворотка относятся к пищевым веществам, обладающим наибольшей аллергенной активностью.

Согласно базам данных IUIS, BioPep, Allergen Online, AllerMatch самыми аллергенными фракциями сыворотки, фракционный состав которой представлен в табл. 1, являются: α-лактальбумин, β-лактоглобулин и сывороточный альбумин.

β-лактоглобулин составляет около 12 % общего белка молока и 58 % сыворотки. Он обладает наибольшим аллергенным потенциалом среди сывороточных белков. Высокая иммунореактивность обусловлена его устойчивостью к протеолизу пепсином в кислой среде желудка [5].

Таблица 1

Фракционный состав сыворотки

Фракция	Содержание, %
β-лактоглобулин	58
α-лактальбумин	13
Иммуноглобулины	12
Сывороточный альбумин	6
Малые белки	12

В целях снижения антигенных свойств молочное сырье можно подвергнуть тепловой обработке. Однако термоденатурация способна приводить как к разрушению областей антигенных детерминант, так и агрегации белковых молекул, экспонированию ранее скрытых антигенных детерминант [4].

Наиболее перспективным подходом для снижения аллергенности молочных продуктов является биокаталитическая конверсия молочных белков, направленная на получение их гидролизатов с заданными молекулярно-массовым распределением и остаточной антигенностью. Особенностью действия протеолитических ферментов является их специфичность по отношению к типу пептидной связи, что позволяет получать гидролизаты с различной степенью гидролиза белка. Негативным моментом является то, что процесс гидролиза изменяет вкусовые качества продукта – в большинстве случаев гидролизаты горьковаты на вкус [2, 3].

В связи с вышесказанным целью исследований является выбор ферментных препаратов, ведущих к снижению аллергенных свойств сыворотки.

В данном исследовании целью является выбор ферментных препаратов, ведущих к снижению аллергенных свойств молочной сыворотки.

Материалы и методы исследования

Выбор ферментных препаратов для гидролиза сырья проводился на основе анализа литературных данных по специфичности ферментов (сайты гидролиза), с помощью программы PeptideCutter (http://expasy.org.), а также данных эпитопного картирования аллергенов молочной сыворотки.

С помощью баз данных IUIS, BioPep, Allergen Online, AllerMatch выбраны все аллергенные фракции сыворотки и их эпитопы. С баз данных NCBI и BioPep получены последовательности фракций сыворотки молока.

Результаты исследования и их обсуждение

В исследовании проводился теоретический гидролиз фракций сыворотки всеми известными и доступными ферментами – протеазами, исходя из специфичности каждого фермента (табл. 2), допустимых для применения в пищевой промышленности.

Таблица 2

Специфичность ферментов

Ферментный препарат	Происхождение	Специфичность
Tripsin	Porcine or cattle pancreas	C-терм. F,Y,W,M,L
Chymotripsin	Porcine or cattle pancreas	P1: Phe, Tyr, Trp
Alcalase Subtilisin	Bacillius licheniformis	P1: large uncharged amino acids – Val, Leu, Ile, Phe, Tyr,Trp
Alcalase glutamyl-endopeptidase	Bacillius licheniformis	P1- Glu, Asp
Neutrase	Bacillius amyloliquefacience	P’1 – Phe, Leu, Val
Thermolysin	Bacillius thermoproteolyticus	P1’: Ile, Phe, Leu, Val, Ala, Met
Protamex Subtilisin	Bacillius subtilis	(P1: незаряженные аминокислоты:)
Protamex Neutral protease	Bacillius subtilis	(P1:Phe, Leu, Val)
Пепсин (pH 1,3)	Porcine or cattle gastric mucosa	P1’: F, L, W,Y P1: нет R P2: нет P P3: нет H, K,R P2’: нет P
Пепсин (pH 2)	Porcine or cattle gastric mucosa	P1’: F, L P1: нет R P2: нет P P3: нет H, K,R P2’: нет P
Протеиназа К	-	P1: A,E,F,I,L,T,V,W or Y
LysC		P1: K
Asp-N-endopeptidase		P1: D

После чего проводили сопоставление полученных пептидов с имеющейся базой данных эпитопов (рис. 1 и 2).

В полученных гидролизатах каждой фракции определяли количество оставшихся эпитопов, сайтов расщепления и свободных аминокислот. В табл. 3 представлены результаты анализа на примере самой аллергенной фракции β-лактоглобулина (для других фракций наблюдалась аналогичная картина).

Рис. 1. Гидролиз ферментом thermolysin β-лактоглобулина (цветом и линией обозначены эпитопы, остающиеся после гидролиза)

Рис. 2. Гидролиз ферментами Protamex и Alcalase на примере β-лактоглобулина

Таблица 3

Сводная таблица результатов теоретического ферментативного гидролиза на примере β-лактоглобулина

Фермент	Количество оставшихся эпитопов	Количество сайтов расщепления	Количество свободных аминокислот
β-лактоглобулин: количество эпитопов – 300			
Thermolysin	13	67	30
Protamex Subtilisin	11	56	17
Protamex Neutral protease	42	41	11
Alcalase (subtilisin)	11	56	17
Neutrase	42	41	11
Протеиназа К	0	84	36
Трипсин	101	18	2
Химотрипсин (высокой специфичности)	152	10	1
Химотрипсин (низкой специфичности)	33	43	9
Пепсин (pH 1,3)	39	57	25
Пепсин (pH 2)	46	47	11
Asp-N-endopeptidase	126	11	1

Как видно из табл. 3, наиболее оптимальным с точки зрения остаточной антигенности и содержания свободных аминокислот являются следующие ферменты: Protamex, Alcalase и thermolysin. При гидролизе протеиназой К наблюдается наименьшее остаточное содержание антигенных детерминант, однако при этом белки гидролизуются до высокого содержания свободных аминокислот, что является нежелательным.

С помощью гель-проникающей хроматографии был проведен анализ негорьких пептидов, выпускаемых компанией DSM. После анализа данных белковых гидролизатов с помощью гель-хроматографии получили 4000 пептидов. На каждую последовательность белка (в данном случае интересовали последовательности β-лактоглобулина, α-лактальбумина и сывороточного альбумина) накладывали полученные пептиды и проводили анализ, в соответствии с которым выбрали фермент Corolase (экзопептидаза).

Таким образом, выбраны 4 ферментных препарата: Protamex, Alcalase, thermolysin и Corolase.

Дальнейшие исследования направлены на оптимизацию условий ферментативного гидролиза путем проведения многофакторных экспериментов и подбором мультиферментных композиций, обеспечивающих получение молочного сырья с низкой аллергенностью и привлекательными органолептическими характеристиками (отсутствие выраженной горечи).

Работа выполнена при поддержке научных исследований, проводимых целевыми аспирантами по научному направлению «Науки о жизни (Живые системы)» (Соглашение № 14.132.21.1781).

Список литературы

1. Головач Г.Н. Аллергенность белков молока и пути ее снижения / Г.Н. Головач, В.П. Курченко // Труд Белорусск. гос. ун-та. Сер: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2010. – Т. 5, Ч. 1. – С. 9–55.

2. Головач Т.Г. Антигенные свойства нативных и термообработанных сывороточных белков и их ферментативных частичных гидролизатов / Т.Г. Головач, В.П. Курченко, Л.И. Сурвило. // Труды БГУ. – 2011. – Т. 6, Ч. 1. – С. 209–223.

3. Радаева А. И. Рациональная переработка сыворотки / И.А. Радаева, А. Н. Петров, // Молочная промышленность. – 2001. – № 5. – С. 34–36. Головач, Т.Г. Антигенные свойства нативных и термообработанных сывороточных белков и их ферментативных частичных гидролизатов / Т.Г. Головач, В.П. Курченко, Л.И. Сурвило. // Труды БГУ. – 2011. –Т. 6, Ч.1. – С. 209–223.

4. Рытченкова О.В. Оптимизация процесса получения ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки с применением протеолитических ферментов / О.В. Рытченкова, А.А. Красноштанова // Фундаментальные исследования. – 2001. – № 8. – С. 663–666.

5. Goldman A.S. Milk allergy. I. Oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children / A.S. Goldman, D.W. Anderson, W.A. Sellers, S. Saperstein, W.T. Kniker, S.T. Halpern // Pediatrics – 1963. – Vol. 32. – P. 425–443.

References

1. Golovach G.N. Allergenicity of milk proteins and ways to reduce /. G.N. Golovach, V.P. Kurchenko // Proceedings of the Belarusian. State University. Ser: Physiological, Biochemical and Molecular Biology. 2010. Vol.5, Part 1. pp. 9–55.

2. Golovach T.G. Antigenic properties of native and heat-treated whey proteins and their partial enzymatic hydrolysates / T.G. Golovach, V.P. Kurchenko, L.I. Survilo. / / Proceedings of the BSU. 2011. T. 6, Part 1. pp. 209–223.

3. Radaeva A.I. Rational whey processing / I.A. Radaeva, A.N. Petrov, / /Dairy industry. 2001. no. 5. pp. 34 36.Golovach, TG Antigenic properties of native and heat-treated whey proteins and their partial enzymatic hydrolysates / T.G. Golovach, V.P. Kurchenko, L.I. Survilo. // Proceedings of the BSU. 2011. T. 6, Part 1. pp. 209–223.

4. Rytchenkova O.V. Optimizing the production process of enzymatic hydrolysates of whey proteins with the use of proteolytic enzymes / O.V. Rytchenkova, A.A. Krasnoshtanova // Fundamental study. 2001 no. 8. pp. 663–666.

5. Goldman A.S. Milk allergy. I. Oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children / A.S. Goldman, D.W. Anderson, W.A. Sellers, S. Saperstein, W.T. Kniker, S.T. Halpern // Pediatrics 1963. Vol. 32. pp. 425–443.

Рецензенты:

Кондратенко Е.П., д.с.-х.н., профессор кафедры технологии хранения и переработки сельскохозяйственной продукции ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт», г. Кемерово;

Просеков А.Ю., д.т.н., профессор, ректор ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», г. Кемерово.

Работа поступила в редакцию 07.11.2012.