УДК 637.14

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

[1]Просеков А.Ю., [1]Ульрих Е.В., [1]Носкова С.Ю., [2]Будрик В.Г., [2]Ботина С.Г., [2]Агаркова Е.Ю., [2]Мельникова Е.И.

[1]ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», Кемерово, e-mail: office@kemtipp.ru;
[2]ГНУ ВНИМИ «Россельхозакадемия»

Установлено, что гидролиз сывороточных белков может быть осуществлен при действии химических 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 50°С. В результате ферментативного гидролиза практически не происходит разрушения аминокислот и снижения биологической ценности конечного продукта. 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 Особенностью действия протеолитических ферментов является их специфичность по отношению к типу пептидной связи, что позволяет получать гидролизаты с различной степенью гидролиза белка, которые используются в хлебобулочной, молочной и других отраслях промышленности.

Ключевые слова: фермент, белок, гидролизат, молочная сыворотка

THE GETTING ENZYMATIC WHEY PROTEIN HYDROLYZATE USING PROTEOLITIC ENZYME

[1]Prosekov A.Y., [1]Ulrih E.V., [1]Noskova S.Y., [2]Budrik V.G., [2]Botina S.G., [2]Agarkova E.Y., [2]Melnikova E.I.

[1]Kemerovskij tehnologicheskij institut pishhevoj promyshlennosti, Kemerovo, e-mail: office@kemtipp.ru;
[2]GNU VNIMI «Rossel'hozakademija»

Found that the hydrolysis of whey proteins can be carried out by the action of chemical agents (alkali, acid) or enzyme preparations. However, the greatest interest is the enzymatic hydrolysis, which allows to obtain hydrolysates with desired properties. The advantage of the enzymatic hydrolysis of whey protein is a high speed under relatively mild conditions: atmospheric pressure and a temperature not exceeding 50°C. As a result of enzymatic hydrolysis is practically no destruction of amino acids and reducing the biological value of the end product. Depending on the content of amino acids, the molecular weight of the polypeptide fraction, presence of di-, tri-, and oligopeptides can be defined region of the most effective use of hydrolysates. Hydrolyzed whey protein is added to the confectionery and bakery products, products of the meat industry, they are a part of sports drinks and breast milk substitutes due to its high nutritional value, the absence of bitterness and low antigenic properties Feature of the proteolytic enzymes is their specificity in relation to the type of the peptide bond, which allows to obtain hydrolysates with different degrees of hydrolysis of the protein, which are used in bakery, dairy and other industries.

Keywords: enzyme, a protein hydrolyzate, whey

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 [1].

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 [2].

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 50°С (как правило, 34–50°С). 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 [3, 4]. 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 протеолитическими препаратами Protamex и Alcalase 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 деминерализации. Ее основные характеристики следующие: плотность – 1003 г/л, содержание сухих веществ – 8,1%, из них белков – 7,1 г/л, углеводов – 35,9 г/л. Ультрафильтрацию проводили в лабораторной ультрафильтрационной ячейке с использованием полисульфонамидных мембран.

В качестве ферментных препаратов были использованы препараты Protamex и Alcalase. 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

«Protamex» является протеазным комплексом, продуцируемым микроорганизмами рода Bacillus. Активность ферментативного препарата составляет 400 протеолитических единиц на 1 г, «Protamex» не образует горьких пептидов на любой стадии ферментативного гидролиза.

Использование «Protamex» для гидролиза сывороточных белков в заявленном способе позволяет провести гидролитическое расщепление белков до аминокислот и других составляющих компонентов, что обеспечивает лучшую усвояемость белкового компонента молочной сыворотки, а это, в свою очередь, повышает пищевую ценность готового продукта.

При этом глубина гидролиза составляет 41–72% от общего содержания белка. Это обеспечивает накопление в конечном продукте аминокислот, необходимых организму, в том числе незаменимых (триптофан, фенилаланин и тирозин, лизин, валин, изолейцин, треонин, метионин и цистеин), а также такой ценной аминокислоты, как таурин, что способствует приданию функциональных свойств конечному продукту.

Кроме того, использование фермента «Protamex», разрешенного для применения в пищевых производствах и пищевых системах, обеспечивает приятный вкус готовому продукту без наличия горечи в отличие от известных аналогичных продуктов и серо-бежевый или кремовый цвет.

«Alcalase» является ферментом, продуцируемым бактериями линии Bacillus. При гидролизе «Alcalase» протеиназой К наблюдается наименьшее остаточное содержание антигенных детерминант, однако при этом белки гидролизуются до высокого количества незаменимых аминокислот. Кроме того, использование фермента «Alcalase», разрешенного для применения в пищевых производствах и пищевых системах, обеспечивает приятный вкус готовому продукту без наличия горечи.

Технический результат заявляемого изобретения заключается в получении ферментативного гидролизата сывороточных

белков со сниженной потенциальной аллергенностью, что дает возможность его использования в гипоаллергенных смесях.

Результат исследования достигается тем, что в способе получения ферментативного гидролизата сывороточных белков, включающем получение белкового раствора, его пастеризацию, ферментативный гидролиз препаратами «Protamex» и «Alcalase», ультрафильтрацию полученных гидролизатов с разделением на фильтрат и концентрат, сушку. Перед внесением ферментов начальное значение pH белкового раствора устанавливают 5% водным раствором щелочи гидроксида калия. Раствор белка получают из сухого концентрата сывороточного белка, а гидролиз ведут при температуре (40–55)°С в течение 4,0 часов, с начальным pH 7,5–8,0 ед., ультрафильтрацию гидролизата осуществляют на мембранах с пропускной способностью 10 кДа (до массовой доли сухих веществ в концентрате 20–22%, после чего полученный концентрат пастеризуют при температуре (70–80)°С в течение 30 с и сушат на распылительной сушилке.

Экспериментально было установлено, что температура гидролиза составляет (40–55)°С. Отклонение в меньшую сторону ниже 40°С нежелательно, т.к. приводит к увеличенному содержанию остающихся в реакционной смеси негидролизованных высокомолекулярных белковых структур, что снижает выход получаемого продукта и приводит к снижению качества, повышению потенциальной аллергенности. Отклонение в большую сторону (свыше 55°С) также нежелательно, т.к. приводит к ускорению процесса термической инактивации ферментного препарата, что влечет за собой уменьшение выхода готового продукта. Кроме того, это приводит к перерасходу энергии на поддержание температуры в ходе процесса и последующее охлаждение готового продукта, что вызывает увеличение себестоимости продукта.

Проведение протеолиза «Protamex» и «Alcalase» при установлении начального pH 7,5–8,0 ед., которое в течение гидролиза постепенно снижается, позволяет не проводить в дальнейшем pH-статирование, что уменьшает количество солей, поступающих в продукт, и, следовательно, улучшает его качество.

Регулирование pH осуществляют 5%-м раствором щелочи КОН (гидроксида калия). Ультрафильтрационная обработка гидролизата позволяет удалить высокомолекулярную фракцию (ВМФ) – негидролизованный сывороточный белок и жир.

Экспериментально было установлено, что ультрафильтрация неочищенного гидролизата на мембранах с размерами пор 10 кДа позволяет получить гидролизаты белков молочной сыворотки как с максимальным выходом, так и с требуемым снижением остаточной антигенности. Использование мембран с большими размерами пор приводит к недопустимому увеличению остаточной антигенности, а мембраны с меньшей пористостью снижают выход гидролизата.

Пастеризация продуктов необходима для улучшения их микробиологических показателей. Уменьшение температуры пастеризации ниже заявленного диапазона значений приводит к возрастанию риска микробной контаминации гидролизатов и продуктов на его основе при их последующем хранении.

Заявляемая совокупность признаков позволяет получить ферментативные гидролизаты сывороточных белков с повышенной биологической и пищевой ценностью, улучшенным качеством и органолептическими свойствами, сниженной потенциальной аллергенностью. Это дает возможность их использования в гипоаллергенных смесях со сниженной аллергенностью по отношению к белкам молока.

В заявляемом изобретении степень удаления нерасщепленного белка контролируется методом жидкостной хроматографии. Это позволяет получить продукты более высокого качества с меньшим содержанием нерасщепленных белков и аллергенов.

Качественные преимущества получаемых гидролизатов заключаются в следующем:

– в низкой остаточной антигенности.

Благодаря этому гидролизаты в качестве белковых компонентов могут быть использованы для получения продуктов для профилактического питания детей и взрослых, предрасположенных к пищевой аллергии и непереносимости белков коровьего молока.

– в высокой биологической ценности.

Сбалансированное содержание незаменимых аминокислот в составе гидролизатов обеспечивает их высокую биологическую ценность, то есть максимально эффективное усвоение в организме и способность использоваться для построения собственных белков организма.

Способ получения ферментативного гидролизата сывороточных белков осуществляется следующим образом.

Сухой концентрат сывороточных белков (КСБ) растворяют при постоянном перемешивании в питьевой воде с температурой (40–45)°С, охлаждают и оставляют набухать в течение 3,0–6,0 часов при перемешивании каждые 30 минут. Полученный раствор сывороточных белков пастеризуют

при температуре 85°С с выдержкой 20 с, охлаждают и подают на ферментативный гидролиз.

Ферментативный гидролиз раствора сывороточных белков ведут с использованием ферментных препаратов «Protamex» и «Alcalase» в течение 4,0 часов.

Ферменты «Protamex» и «Alcalase» в количестве 4% от массы сухих веществ КСБ предварительно растворяют в питьевой воде с температурой (40–50)°С до образования раствора с массовой долей сухих веществ 3–6% и при постоянном перемешивании вносят в раствор сывороточных белков. Ферментативный гидролиз ведут при температуре (40–55)°С в течение 4,0 часов.

По окончании гидролиза полученные неочищенные гидролизаты охлаждают и направляют на ультрафильтрацию.

Неочищенные гидролизаты сывороточных белков (ГСБ) разделяют на ультрафильтрационной установке с пропускной способностью мембран 10 кДа, давлении 3 атм. на концентраты, содержащие высокомолекулярную фракцию (ВМФ), и фильтраты, содержащие низкомолекулярную фракцию (НМФ).

Сушку гидролизатов осуществляют при следующих режимах:

– температура воздуха на входе в сушильную башню – (150–170)°С;

– температура воздуха на выходе из сушильной башни – (70–90)°С.

Полученные сухие гидролизаты охлаждают, фасуют и направляют на хранение.

Окончательный контроль качества полученных гидролизатов осуществляется после проведения распылительной сушки хроматографическим и иммунохимическим методами. Аналитические определения проводят согласно стандартным методикам.

Следующие примеры иллюстрируют способ получения ферментативного гидролизата сывороточных белков.

Согласно гель-хроматографии, фракция главных сывороточных белков содержит белки с молекулярными массами 65–70 кДа (8,3%), 35–40 кДа (58,5%) и 14–18 кДа (33,2%), 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 отмывку от низкомолекулярных веществ методом диафильтрации. Для данного процесса были использованы мембраны УПМ-5, УПМ-10, УПМ-20, УПМ-50. 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 ограничились 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/м²·ч	φ, %	Содержание белковых веществ, г/л		Молекулярно-массовое распределение белковых веществ в пермеате, %	
			Концентрат	Пермеат	М = 18–20 кДа	М < 5 кДа
УПМ-5	2,0	92,8	32,73	0,69	1,8	94,1
УПМ-10	5,51	92,5	31,98	0,88	6,5	97,1
УПМ-20	4,49	84,9	31,82	0,92	7,1	90,6
УПМ-50	4,29	85,7	31,01	1,12	13,0	86,8

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 мембраны УПМ-10 наблюдается минимальное присутствие в пермеате более крупных молекул сывороточных белков (молекулярная масса = 18000–20000 Дальтон). Хотя значения интегральной селективности мембраны достаточно высокие (не ниже 90%), в дальнейшей работе была использована мембрана УПМ-10, отличающаяся более высокой производительностью по сравнению с УПМ-5 (соответственно 5,51 и 2,0 л/(м²·ч)). Основные параметры процесса 5-кратного ультраконцентрирования фракции сывороточных белков на мембране УПМ-10 представлены в табл. 2.

Таблица 2

Основные параметры процесса 5-кратного ультраконцентрирования на мембране УПМ-10

Степень концентрирования	G, л/м^2·ч	φ, %	Концентрация белка в концентрате, г/л
2	5,4	92	13,0 ± 0,3
3	4,4	91,5	18,5 ± 0,8
4	4,1	91,5	28 ± 1,4
5	4,8	90,5	32,8 ± 1,6

Ферментативный гидролиз можно осуществить с применением протеаз животного, растительного и микробного происхождения. Однако при получении белковых гидролизатов пищевого назначения предпочтение отдается использованию протеолитического фермента «Protamex». Для «Alcalase» известны оптимальные условия проведения процесса (pH 7,6–8,0, t = 40...50 °C). В ходе гидролиза происходит освобождение аминокислот, что приводит к понижению pH. Ведение процесса при начальном значении pH 8,0 позволяет не проводить добавление щелочи для pH-статирования, что уменьшает количество поступающих в конечный продукт солей.

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 40–100 % коротких пептидов с молекулярной массой менее 2000 Дал.

Таким образом, в результате действия на концентрат сывороточных белков ферментными препаратами «Protamex» и «Alcalase» получены ферментативные гидролизаты сывороточных белков с различными свойствами. Образующиеся ферментативные гидролизаты содержат не менее 19 % аминного азота.

Работа осуществляется при финансовой поддержке Министерства образования и науки в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы», государственный контракт № 12.527.11.0008.

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.

References

1. Maksimjuk N.N., Mar'janovskaja Ju.V. O preimushhestvah fermentativnogo sposoba poluchenija belkovyh gidrolizatov // Fundamental'nye issledovanija: materialy konferencii. 2009. no. 1. pp. 34–35.

2. Patent RF no. 2375910 S1, 20.12.2009.

3. Severin S., Wenshui X. Milk biologically active components as nutraceuticals: review // Food Sci Nutr. 2005. Vol. 45 (7-8). pp. 645–656.

4. Tokaev Je.S., Bazhenova E.N., Miroedov R.Ju. Sovremennyj opyt i perspektivy ispol'zovanija preparatov syvorotochnyh belkov v proizvodstve funkcional'nyh napitkov // Molochnaja promyshlennost'. 2007. no. 10. pp. 55–56.

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. pp. 1484–1491.

Рецензенты:

Кучер Н.А., д.ф-м.н., профессор, ФГБОУ ВПО «КемГУ», г. Кемерово;

Шевченко Т.В., д.т.н., профессор, ФГБОУ ВПО «КемТИПП», г. Кемерово.

Работа поступила в редакцию 29.04.2013.