

Агаркова Евгения Юрьевна, зав. лаб., к.т.н.
ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (Россия, г.Москва)

НАПРАВЛЕННЫЙ ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВО-УГЛЕВОДНОГО МОДУЛЯ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Аннотация. В статье описан новый подход в области гидролитических превращений компонентов молочной сыворотки, а именно направленный гидролиз лактозы с последующим протеолизом сывороточных белков. Установлены зависимости влияния режимов трансмембранной фильтрации и биокаталитической конверсии белково-углеводного модуля сыворотки на органолептические, физико-химические и биофункциональные свойства гидролизатов. Показано усиление антиоксидантных свойств гидролизатов, полученных по новой технологии по сравнению с традиционно полученным гидролизатом. Разработана технологическая схема гидролизата сывороточных белков с пониженным содержанием лактозы и повышенным содержанием белка.

Ключевые слова: гидролиз, ферменты, трансмембранная фильтрация, сывороточный белок, лактоза.

Agarkova Evgenia Yuryevna, Laboratory chief, Ph.D.
All-Russian Dairy Research Institute (Russia, Moscow)

THE DIRECTIONAL HYDROLYSIS OF PROTEIN-CARBOHYDRATE MODULE OF MILK WHEY

Abstract. The new approach in the field of hydrolytic conversion of milk whey components and namely the directed hydrolysis of lactose with the following proteolysis of whey proteins is described in the article. The dependence of the effect of regimes of transmembrane filtration and biocatalytic conversion of protein – carbohydrate whey module on organoleptic, physical-chemical and biofunctional properties of hydrolysates has been stated. The intensification of antioxidant properties of hydrolysates obtained according to the new technology comparing to the traditionally obtained hydrolysate was shown. The technological scheme of whey proteins hydrolysate with the reduced amount of lactose and increase amount of protein has been developed.

Key words: hydrolysis, ferments, transmembrane filtration, whey protein, lactose.

В молочной отрасли ухудшению состояния окружающей среды в первую очередь способствует сброс сыворотки в сточные воды, при этом многие ее

компоненты являются биологически ценными и могут быть использованы при получении различных функциональных ингредиентов и продуктов лечебно-профилактической направленности [1-3]. В первую очередь речь идет о молочных белках, содержание которых в сыворотке может колебаться в пределах от 0,4 до 1,0 % в зависимости от ее вида и способа производства продукта [4,5]. Для усиления функциональности белков молочной сыворотки может быть использован процесс ферментативного гидролиза. Ферментативный гидролиз имеет ряд преимуществ перед другими видами протеолиза, поскольку проходит при мягких условиях и практически не сопровождается повреждением аминокислот и снижением биологической ценности [6]. Белковые гидролизаты, полученные при ферментативной конверсии молочных белков, помимо антиоксидантных, иммуномодулирующих, гипотензивных и др. свойств, обладают также множеством важных функционально-технологических свойств, образующиеся в большей степени при степени гидролиза от 10 до 20 % [3,7,8].

В этой связи особенно актуальны исследования в области направленного протеолиза белков молочной сыворотки, позволяющие обеспечить получение гидролизатов, гарантированно обладающих функциональными свойствами с приемлемыми органолептическими характеристиками [8].

Целью исследований являлось определение условий мембранного концентрирования и направленного ферментативного протеолиза сывороточных белков с предварительным гидролизом лактозы для получения высокобелковых гидролизатов с доказанными функциональными свойствами.

В качестве объектов исследований определены сыворотка молочная подсырная, два типа рулонных полиэфирсульфоновых мембран (мембранные элементы с порогом задержки 5 и 20 кДа), установка для ультра- и микрофльтрации ООО «Альтаир», полученные белковые гидролизаты.

Для определения физико-химических показателей задействованы общепринятые методы исследований. Наличие горечи определяли органолептически согласно D. Spellman [9]. Определение степени гидролиза и общего количества свободных аминокислот (САК) определяли спектрофотометрическим методом согласно [10,11], антиоксидантной активности – флуоресцентным методом согласно [12].

Для обеспечения направленного гидролиза белков молочной сыворотки необходимо учитывать все факторы, влияющие на этот процесс. В молочной сыворотке, в частности в подсырной, содержится достаточно большое количество лактозы (до 6,0 %), что может оказать значительное влияние на процесс гидролиза. При проведении протеолиза белков сыворотки нейтральными протеазами отмечено снижение степени гидролиза при прочих равных условиях в среднем на 10 %, поэтому целесообразно минимизировать влияние массовой доли лактозы в исходном сырье. Это имеет непосредственную связь с усилением биологических свойств обрабатываемой сыворотки, поскольку появляется возможность получать пептиды требуемой длины, обладающие доказанными биологическими эффектами.

Для гидролиза лактозы нами был использован препарат очищенной лактазы Maxilact® (Максилакт), являющийся продуцентом штаммов молочных дрожжей *Saccharomyces (Kluveromyces) marxianus va. Lactis*.

На первом этапе осуществлялась подготовка подсырной сыворотки к гидролизу, суть которой заключалась в предварительной очистке обрабатываемой системы от жира и казеиновой пыли на сепараторе-сливкоотделителе, массовая доля белка в сыворотке составила 0,98 %.

Задачей данного этапа исследований являлось достижение максимальной степени гидролиза при различных значениях активной кислотности среды и массовой доли вносимого фермента. Для варьирования уровня активной кислотности использовали лимонную кислоту и 20%-ный раствор NaOH. Диапазон варьирования концентраций ферментного препарата от 0,04 до 0,12 %. В результате установлено, что наиболее рациональными условиями проведения гидролиза молочной подсырной сыворотки для снижения уровня лактозы можно считать продолжительность 3 часа, доза внесения фермента Максилакт 0,12 %, активная кислотность на начальной стадии инкубирования не ниже 6,5 ед. рН.

Далее обрабатываемая сыворотка была подвергнута диафильтрации с целью очистки от продуктов гидролиза лактозы. Для этого использовалась рулонная мембрана с порогом задержки 20 кДа. Концентрирование подсырной сыворотки проводили при постоянных параметрах, а именно температура 15 °С и давление $P_{\text{вх}}/P_{\text{вых}} = 0,50/0,44$ мПа.

На первом этапе провели ультрафильтрацию до массовой доли сухих веществ 6,23%, при этом количество лактозы и моносахаров снизилось на 0,11 %. Для удаления из концентрата лактозы и минеральных веществ проводили однократную промывку гидролизованной сыворотки деминерализованной водой, далее осуществляли повторное концентрирование. Из шести литров исходной сыворотки был получен один литр концентрата с содержанием белка 11,04 %. Физико-химические показатели продуктов концентрирования и исходной сыворотки представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Физико-химические показатели продуктов концентрирования

Наименование параметра	Наименование образца				
	Исходная сыворотка	Обр. 1	Обр. 2	Обр. 3	Обр. 4
Массовая доля белка, %	0,98	0,97	3,72	11,04	0,21
Массовая доля сухих веществ, %	6,3	6,32	6,23	13,1	3,48
Массовая доля лактозы, %	4,31	1,42	1,31	0,93	0,66

Обр.1 – сыворотка, подвергнутая гидролизу лактозы

Обр.2 – концентрат сыворотки, подвергнутой гидролизу лактозы

Обр.3 – концентрат, полученный после промывки

Обр.4 – пермеат, полученный после промывки

Как видно из данных таблицы 1, концентрат, полученный в результате гидролиза лактозы с последующей промывкой от продуктов ее гидролиза и

дальнейшего концентрирования, отличался достаточно высоким содержанием белка – 11,04 % и низким содержанием лактозы.

На основе ранее проведенных исследований были установлены оптимальные условия гидролиза УФ-концентрата молочных сывороточных белков с содержанием белка в системе 3,0 % в условиях нестатичного рН; а именно – продолжительность гидролиза 30-90 мин, доза ферментного препарата Alcalase 0,5 % и доза ферментного препарата Protamex 3,5 %, температура 51-55 °С, начальная величина рН 6,98-7,02.

С учетом того, что полученный концентрат отличается по составу и массовой доле белка, необходима корректировка условий проведения процесса гидролиза. Для этого был проведен эксперимент, сутью которого явилось достижение в полученном гидролизате степени гидролиза от 10 до 20 %, при котором образуются пептиды средней длины, обладающие доказанными биологическими эффектами [9]. Корректировка условий протеолиза состояла в исследовании зависимости степени гидролиза от продолжительности процесса и зависимости содержания свободных аминокислот (САК) от продолжительности процесса.

На графике рисунка 1 представлены сравнительные зависимости степени гидролиза от продолжительности процесса получения двух гидролизатов: полученного ранее (ГКСБ-1) и вновь разработанного (ГКСБ-2, обр.3). По данным рисунка 1 можно сделать вывод, что при получении ГКСБ-1 наибольшее значение степени гидролиза зафиксировано по истечении 90 мин, далее роста этого показателя не наблюдалось. Что касается ГКСБ-2, максимальная степень гидролиза отмечена по прошествии 120 мин процесса. Увеличение продолжительности инкубации в случае ГКСБ-2, с одной стороны связано с увеличением массовой доли белка в реакционной смеси, однако данный факт частично нивелируется за счет снижения лактозы более чем в 4 раза по сравнению с ГКСБ-1.

Одной из основных характеристик протеолиза молочного белка является наличие свободных аминокислот (САК).

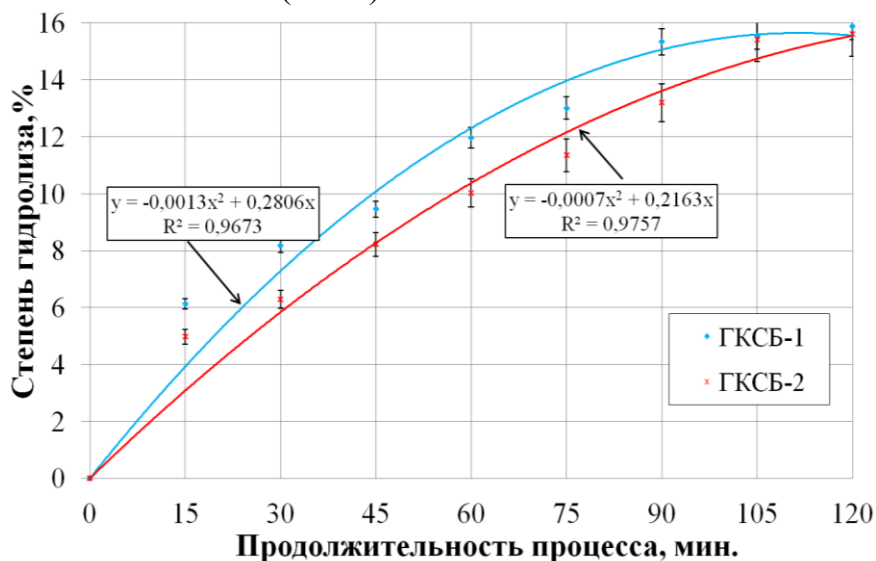


Рисунок 1 – Зависимости степени гидролиза от продолжительности процесса

Несмотря на то, что используемые ферментные препараты по субстратной специфичности подобраны таким образом, чтобы минимизировать наличие в смеси САК, в т. ч. горьких, тем не менее большая величина САК может негативно сказаться на органолептических характеристиках гидролизата.

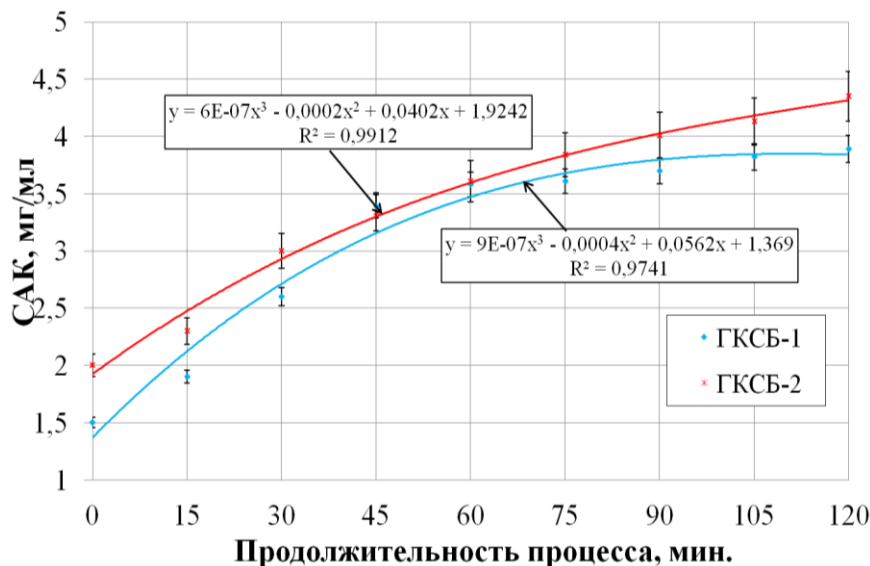


Рисунок 2 – Зависимости содержания САК от продолжительности процесса

На рисунке 2 представлены зависимости содержания от продолжительности процесса. Гидролизат ГКСБ-2 характеризуется большим, по сравнению с ГКСБ-1 содержанием САК на протяжении всего протеолиза. В случае ГКСБ-1, нарастание количества САК после 90 мин процесса практически не происходит, в то время как при получении ГКСБ-2 этот показатель нарастает на протяжении всего процесса.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что нецелесообразно проводить протеолиз ГКСБ-2 более 105 мин во избежание появления горького привкуса, поскольку по истечении этого времени достигается достаточная степень гидролиза, при которой в составе смеси прогнозируемо будут находиться пептиды средней длины. Таким образом, установлено, что при получении гидролизата по новой разработанной технологии необходимо увеличение продолжительности протеолиза на 15 мин. После получения ГКСБ-2 была проведена еще одна операция по УФ-концентрированию на мембране с порогом задержки 5 кДа с целью максимально возможного удаления свободных аминокислот.

Далее была проведена оценка двух образцов гидролизата сывороточных белков (ГКСБ-1 и ГКСБ-2). Были исследованы органолептические и антиоксидантные свойства полученных гидролизатов (таблицы 2 и 3).

Таблица 2 – Результаты тестирования органолептических показателей экспериментальной партии ГКСБ-1 и ГКСБ-2

Наименование показателя	Результаты тестирования	
	ГКСБ-1	ГКСБ-2
Внешний вид и консистенция	Однородная полупрозрачная жидкость с небольшим количеством белкового осадка	
Цвет	бледно-желтоватый	кремовый
Вкус	нейтральный, слегка солоноватый, с легким нестойким горьковатым послевкусием	нейтральный, с едва уловимым горьковатым послевкусием
Запах	свойственный молочной сыворотке	свойственный молочной сыворотке

По результатам органолептического тестирования экспериментальный образец ГКСБ-2 характеризовался запахом, свойственным молочной сыворотке, имел нейтральный вкус с нестойким легким горьковатым послевкусием. По сравнению с ранее полученным гидролизатом удалось практически полностью избежать наличия горького привкуса.

Сравнительные данные по исследованию антиоксидантной емкости гидролизатов представлены в таблице 3.

Выявлено повышение антиоксидантной емкости вновь полученного гидролизата как по отношению к кислородному, так и пероксильному радикалу, это связано, прежде всего, с повышением массовой доли белка в ГКСБ-2, а также подтверждает предположение о том, что удалось провести более направленный гидролиз белка путем удаления части лактозы.

Таблица 3 – Органолептические и биофункциональные свойства ГКСБ

	Наименование образца	Степень горечи	Антиоксидантная емкость, мМ	
			TEAC	ORAC
1	ГКСБ-1	+–	10,27±0,34	6,15±0,14
2	ГКСБ -2	–	22,57±0,28	15,05±0,16

На рисунке 3 представлена обобщенная скорректированная с учетом проведенных ранее исследований технологическая схема получения гидролизатов сывороточных белков с повышенным содержанием белка (до 12 %).

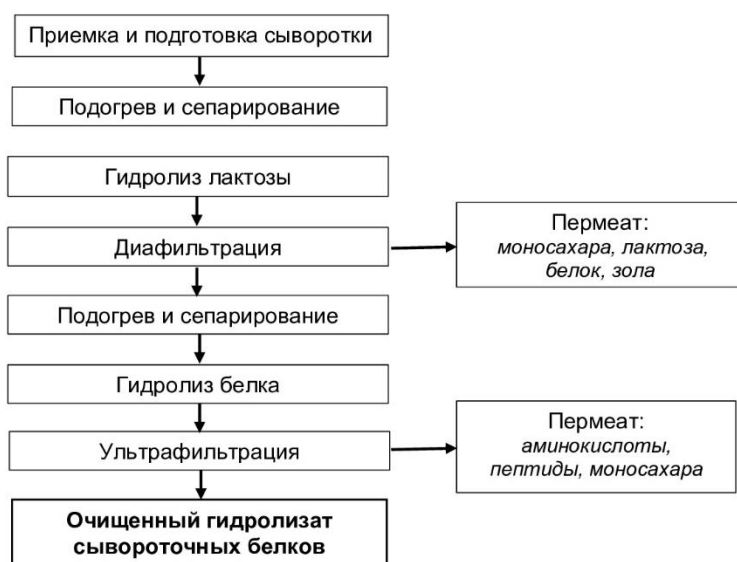


Рисунок 3 – Технологическая схема получения гидролизата сывороточных белков

Выводы.

Получены зависимости изменения физико-химических свойств молочной сыворотки от способа их модификации путем установления рациональных условий проведения гидролиза для снижения уровня лактозы - продолжительность 3 часа, доза внесения фермента Максилакт 0,12%, активная кислотность на начальной стадии инкубирования не ниже 6,5 ед. рН.

Выявлена нецелесообразность проведения гидролиза ГКСБ-2 более 105 мин во избежание появления постороннего привкуса, поскольку по истечении этого времени достигается достаточная степень гидролиза, при которой в составе смеси прогнозируемо будут находиться пептиды средней длины. Таким образом, при получении гидролизата по новой разработанной технологии необходимо увеличение продолжительности протеолиза на 15 мин.

Показана целесообразность использования гидролизата, полученного с использованием предварительного гидролиза лактозы и диафльтрации в качестве функционального пищевого ингредиента, поскольку зафиксировано улучшение органолептических характеристик и усиление антиоксидантных свойств по сравнению с ранее разработанным.

Разработана технологическая схема получения гидролизата сывороточных белков с повышенным содержанием белка с доказанными функциональными свойствами.

Список литературы

1. Донская Г.А. Биотехнологическая оптимизация нутриентного состава ферментированного молочного напитка // Вопросы питания. 2014. Т. 83. № 6. С.74-80.

2. Федотова О.Б., Макаркин Д.В., Соколова О.В., Дунченко Н.И. Разработка и исследования пищевой и биологической ценности и

потребительских свойств кисломолочного продукта с мукой, не содержащего глютен // Вопросы питания. 2019. Т. 88. № 2. С. 101-110.

3. Донская Г.А., Щекочихина А.С., Дрожжин В.М. Продукты долголетия // Молочная промышленность. 2019. № 11. С. 43-44.

4. Зобкова З.С., Фурсова Т.П., Зенина Д.В., Гаврилина А.Д., Шелагинова И.Р. Влияние пищевых добавок и функциональных ингредиентов на качество цельномолочной продуктов // Молочная промышленность. 2017. № 2. С. 50-52.

5. Mann B. et al. Bioactive peptides from whey proteins // Whey Proteins. Academic Press. 2019. P. 519-547.

6. Ghosh B.C., Prasad L.N., Saha N.P. Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis // Journal of food science and technology. 2017. Т. 54. № 6. P. 1476-1483.

7. Mulcahy E.M., Mulvihill D.M., O'Mahony J.A. Functional properties of whey protein conjugated with starch hydrolysis products of different dextrose equivalent values // Preparation, characterisation and functional applications of whey. 2017. P. 201.

8. Embiriekah S. et al. Antioxidant activity, functional properties and bioaccessibility of whey protein hydrolysates // International Journal of Dairy Technology. 2018. Т. 71. № 1. P. 243-252.

9. Spellman D., O'Cuinn G., Fitz R.J. Gerald Bitterness in Bacillus proteinase hydrolysates of whey proteins // Food Chemistry. 2009. № 114. P. 444-446.

10. Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid // Journal of agricultural and food chemistry. 1979. Т. 27. № 6. P. 1256-1262.

11. Chen L. et al. A novel colorimetric determination of free amino acids content in tea infusions with 2,4-dinitrofluorobenzene // Journal of Food Composition and Analysis. 2009. Т. 22. № 2. P. 137-141.

12. Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe // Journal of agricultural and food chemistry. 2001. Т. 49. № 10. P. 4619-4626.